

PAULA RENATA LOPES MOREIRA

**ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES
RAPD EM ESPÉCIES DE MORCEGOS DOS
GÊNEROS *EUMOPS*, *MOLOSSUS*,
EPTESICUS, *MYOTIS* E *ARTIBEUS*
(CHIROPTERA, MAMMALIA)**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Campus de São José do
Rio Preto, para obtenção do Grau de
Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Morielle Versute

São José do Rio Preto – SP

2004

À avó Maura e minha mãe Sônia, exemplos de vida.

*Agradeço a “predisposição genética” a ser
guerreira.*

*“A vida não é um corredor reto e tranquilo que nós percorremos livres e sem empecilhos,
Mas um labirinto de passagens, pelas quais nós devemos procurar nosso caminho, perdidos e confusos, de vez em quando presos em um beco sem saída.
Porém, se tivermos fé, uma porta sempre será aberta para nós, não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos, mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós.”*
(A. J. Cronin)

*Obrigada Flávia,
Por me mostrar um caminho.*

Agradecimentos

"Não se pode ensinar tudo a alguém, pode-se apenas ajudá-lo a encontrar por si mesmo."

(Galileu Galilei)

À minha orientadora, Prof. Dra. Eliana Morielle Versute, pelo seu entusiasmo, dedicação, pelo exemplo de seriedade e profissionalismo, por confiar no meu potencial e investir na minha formação;

Aos funcionários do Departamento de Biologia e Departamento de Zoologia e Botânica;

Aos funcionários da sessão de Pós-Graduação;

À Prof. Dra. Nívea Dulce J. C. Froes, pela disponibilização do microscópio de fluorescência;

Ao professor Dr. Francisco Langeani Neto pelo auxílio na análise filogenética;

À CAPES e a FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido;

À bibliotecária Elaine, pela correção das referências bibliográficas;

"Celebrar a vida é somar amigos, experiências e conquistas, dando-lhes sempre algum significado."

Aos amigos de Laboratório, Karina, Sandra, Mário, Maurício, Mateus, Renato e Jorge, pela amizade e companheirismo que construímos ao longo desses anos. Obrigada por me suportarem nos "raros" momentos de estresse e principalmente agüentarem minha tagarelice. Em especial à Karina, pela valiosa ajuda na técnica de Hibridação e por me auxiliar na "árdua" tarefa de "zero e um", à Sandra por também ajudar em "mais" uma matriz e Maurício pelas "consultorias computacionais".

Aos amigos, Flavinha, Nathalia, Marcelo, Joaquim, Patrícia e Aline, por tornarem os dias “ibilceanos” mais leves e o mestrado menos árduo...

Só existe uma coisa melhor do que fazer novos amigos: conservar os velhos."

(Elmer G. Letterman)

Dani, Flá, Lú e Tati, obrigada por fazerem parte de minha vida, me apoiarem em todos os momentos e me concederem a honra de “uma década” de amizade...

Daniela, pelo carinho, cumplicidade e por todos os momentos que passamos na faculdade e em casa, por ouvir minhas queixas, dividir as dúvidas e rir comigo em nossas sessões noturnas de “besteirol”, e pela ajuda no inglês. Obrigada também por emprestar a Izabel, aumentando o “número de orações”;

Luciane, obrigada pela troca de sugestões e valiosas informações, pelo carinho, incentivo, solidariedade nos momentos difíceis e nas horas alegres;

Aos amigos Júlio e Raquel, por todo carinho, apoio, incentivo e por me ajudarem a acreditar no meu potencial;

À Torcida Lopes, por acreditarem em mim, muito mais do que eu mesma.... Por todas as palavras de incentivo, pelo entusiasmo e vibração a cada conquista. Meu eterno porto seguro, para onde sempre volto.....

Ao meu irmão, Manoel torcedor e incentivador.

À minha irmã, Daniela pelo amor, cumplicidade, generosidade e compreensão. Obrigada principalmente pelo meu maior tesouro, meus sobrinhos Ana Beatriz e João Vitor, meus mascotes e torcedores;

E, como em tudo que faço em minha vida, a gratidão a: avó Maura, pelo amor e pelos valiosos conselhos, que me impulsionaram até aqui. E minha mãe Sônia, por me incentivar a vencer. Por abrir mão dos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada por todas as broncas “telefônicas” desde a graduação, se tivesse amolecido, eu não chegaria até aqui.

A Deus, por mais esta oportunidade.....

EXORTAÇÃO DA AURORA

*Ouve a exortação da aurora.
Cuida deste dia, pois ele é a vida, a própria vida
da vida.*

*Em seu breve curso residem todas as verdades e
a realidade da existência, a bênção do crescimento,
a glória da ação, o esplendor da beleza.
Pois, o ontem é apenas um sonho, e o amanhã,
apenas uma visão.
Mas o hoje bem vivido torna cada ontem um
sonho de felicidade, e cada amanhã uma
visão de esperança.
Portanto, olhe bem para este dia.*

(O texto acima tem 7.000 anos. Foi encontrado num
registro Veda, escrito em sânscrito e datava de 5.000 anos A.C.)

*“... existe uma providência
especial
na queda de um pardal.”
(William Shakespeare)*

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	13
1. A Ordem Chiroptera	13
2. Marcadores moleculares como ferramentas no estudo da variação genética	22
II. OBJETIVOS	29
III. MATERIAL É MÉTODOS	30
A. Para o Estudo Molecular	30
1. Espécies	30
2. Extração do DNA genômico para o experimento RAPD	32
3. Oligonucleotídeos.....	32
4. Amplificação do DNA	33
5. Detecção dos fragmentos.....	34
6. Análise dos dados.....	35
B. Para o Estudo Citogenético Molecular	37
1. Espécies	37
2. Culturas celulares	37
a) Preparação direta de medula óssea	37
b) Cultura de fibroblastos	38
3. Preparação da sonda	40
4. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente	41
IV. RESULTADOS	44

1. Padrão de Bandas Produzidas por RAPD.....	44
2. Similaridade Genética.....	60
3. Análise Filogenética.....	72
a) Árvore UPGMA	72
b) Árvore Neighbor-joining.....	73
4. Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente.....	76
V. DISCUSSÃO	81
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
VII. RESUMO	104
VIII. ABSTRACT	107
IX. ANEXO.....	110

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfil do gel de RAPD para o *primer 1* das espécies: 48
A- Molossus molossus, Molossus rufus, Myotis nigricans e Artibeus planirostris; *B- Eumops glaucinus, Eumops perotis e Eptesicus furinalis.*
- Figura 2.** Perfil do gel de RAPD para o *primer 10* das 49
espécies : *A- Molossus molossus , Molossus rufus, Eumops glaucinus e Eumops perotis B Myotis nigricans, Eptesicus furinalis e Artibeus planirostris.*
- Figura 3.** Gráfico de barras mostrando as frequências de 52
bandas polimórficas das espécies estudadas produzidas pelos 20 *primers*. (M.m.: *M. molossus*, M.n.: *M. nigricans*, A.p.: *A. planirostris*, E.f.: *E. furinalis*, E.g.: *E. glaucinus*, M.r.: *M. rufus* e E.p.: *E. perotis*).
- Figura 4.** Perfil do gel de RAPD para o *primer 2* das espécies: 54
Myotis nigricans, Eumops glaucinus, Eumops perotis e Eptesicus furinalis.
- Figura 5.** Perfil do gel de RAPD para o *primer 4* das espécies: 55
Molossus molossus, Molossus rufus, Eumops glaucinus e Eumops perotis.
- Figura 6.** Perfil do gel de RAPD para o *primer 6* das espécies: 56
Molossus molossus, Molossus rufus, Myotis nigricans e Artibeus planirostris.
- Figura 7.** Perfil do gel de RAPD para o *primer 7* das espécies: 57
Myotis nigricans, Eumops glaucinus, Eumops perotis e Eptesicus furinalis.
- Figura 8.** Perfil do gel de RAPD para o *primer 8* das espécies: 58
Myotis nigricans, Eumops glaucinus, Eumops perotis e Eptesicus furinalis.
- Figura 9.** Perfil do gel de RAPD para o *primer 11* das 59
espécies: *Molossus molossus, Molossus rufus, Myotis nigricans e Artibeus planirostris.*
- Figura 10.** Dendrograma gerado pelo método UPGMA com 70
base na distância genética de Nei (1978) calculada com base na análise dos 741 *loci* das sete espécies estudadas.

- Figura 11.** Dendrograma gerado pelo método UPGMA com base na distância genética de Nei (1978) calculada a partir da análise dos 193 *loci* (cinco *primers* mais polimórficos). 71
- Figura 12.** Árvore UPGMA com os valores de *bootstrap*, baseada na matriz de dados construída a partir dos 741 *loci* analisados. 74
- Figura 13.** Árvore Neighbor-joining com os valores de *bootstrap*, baseada na matriz de dados construída a partir dos 741 *loci* analisados. 75
- Figura 14.** Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos e núcleos interfásicos de *E. glaucinus* com sondas produzidas a partir das bandas monomórficas: A- 130 pb, B- 110 pb, C- 133 pb, D- 231 pb e E- 130 pb. 79
- Figura 15.** Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos e núcleos interfásicos de *A. planirostris* com sondas de 150 pb (A) e 485 pb (B e C), de *E. perotis* com sonda de 275 pb (D), de *E. furinalis* com sonda de 275 pb (E), e de *M. nigricans* com sonda de 226 pb (F). 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Discriminação dos espécimes coletados pela família, espécie, número de registro, sexo e procedência.	31
Tabela 2. <i>Primer</i> e número de bandas produzidas em cada espécie.	50
Tabela 3. Número de bandas totais (T), polimórficas (P) e freqüências relativas (Fr) e médias (Fm) das bandas polimórficas produzidas pelos <i>primers</i> nas sete espécies analisadas.	51
Tabela 4. Número de bandas identificadas como espécie-específicas e tamanho dos fragmentos a que correspondem.	53
Tabela 5. Valores médios da variação gênica (h) e do índice de Shannon (I) com base na análise dos <i>loci</i> produzidos pelas sete espécies (28 indivíduos) para os <i>primers</i> individuais.	65
Tabela 6. Espécies e valores médios da variação gênica (h) e do índice de Shannon (I) obtidos da análise dos 741 <i>loci</i> .	66
Tabela 7. Espécies e valores médios da variação gênica (h) e do índice de Shannon (I) obtidos da análise dos 193 <i>loci</i> detectados pelos cinco <i>primers</i> mais polimórficos.	67
Tabela 8. Identidade genética (valores representados acima da diagonal) e distância genética (valores representados abaixo da diagonal) segundo Nei (1978) entre as sete espécies, após a avaliação dos 741 <i>loci</i> .	68
Tabela 9. Identidade genética (valores representados acima da diagonal) e distância genética (valores representados abaixo da diagonal) segundo Nei (1978) entre as sete espécies, após a avaliação dos 193 <i>loci</i> identificados por cinco <i>primers</i> mais polimórficos.	69

I. INTRODUÇÃO

1. A ordem Chiroptera

A ordem Chiroptera representada pelos morcegos, compreende 18 famílias e cerca de 980 espécies agrupadas em duas subordens, Megachiroptera e Microchiroptera. A subordem Megachiroptera ocorre apenas no Velho Mundo, e está representada por uma única família, a Pteropodidae, com 42 gêneros e 169 espécies (Nowak, 1999). A subordem Microchiroptera apresenta distribuição mundial e é constituída pelas 17 famílias restantes, com uma representação no Novo Mundo de aproximadamente 290 espécies. Destas, cerca de 130 espécies são encontradas no Brasil e abrangem representantes de nove famílias: Molossidae, Phyllostomidae, Vespertilionidae, Emballonuridae, Noctilionidae, Mormoopidae, Natalidae, Furipteridae e Thyropteridae (Gregorin & Mendes, 1999).

Chiroptera é um dos mais antigos e divergentes grupos de mamíferos, e a maior representatividade é encontrada na maioria das regiões temperadas e tropicais do mundo. O sucesso do grupo deve-se, principalmente, à capacidade de exploração do meio aéreo, pois são animais com características morfofisiológicas particulares que possibilitam o voo e a ecolocalização. Externamente a característica mais evidente é a de apresentarem as extremidades anteriores modificadas em asas.

Entre os vertebrados, os morcegos compartilham com os pássaros e possivelmente com os répteis pterossauros a capacidade de voo sustentado (Smith, 1976).

A ecolocalização, fenômeno onde a laringe é capaz de produzir sons de frequências complexas com modulação e variação temporal, permitiu que os morcegos, animais de hábitos noturnos explorassem diversos tipos de abrigos e alimentos.

Embora os morcegos sejam extraordinariamente bem sucedidos e compreendam a segunda maior ordem de mamíferos, eles permanecem um dos grupos menos conhecidos em termos evolutivos. A delicadeza do esqueleto e a grande diversidade de habitats tem aparentemente contribuído para a escassez de fósseis. Esta insuficiência de registros tem dificultado a identificação das relações filogenéticas, sendo a evolução do grupo baseada, principalmente, nas características das espécies viventes. Os registros fósseis mais antigos são datados de aproximadamente 50 milhões de anos, na Europa e na América do Norte (Jones & Genoways, 1970).

A ordem Chiroptera tem sido extensivamente questionada sobre sua origem e evolução, atualmente aceita como monofilética (Baker **et al.**, 1991; Simmons **et al.**, 1991; Nikaido **et al.**, 2000; Jones **et al.**, 2002). Registros fósseis indicam que os quirópteros se estabeleceram no início do Eoceno e, segundo Smith (1976), a maioria

das famílias de Chiroptera originou-se aparentemente da radiação adaptativa dos embalonurídeos, rinolofídeos e vespertilionídeos.

Em estudos mais recentes comparando diferentes informações (morfológicas, citogenéticas, moleculares, entre outras), Simmons & Geisler (1998) sugeriram que Emballonuroidea não seja monofilética, porque uma das suas famílias, a Emballonuridae, ocupa uma posição basal em relação a todos os outros Microchiroptera.

Com base no grau de especialização morfológica, os embalonurídeos parecem ter chegado primeiro aos trópicos do Novo Mundo, seguidos dos vespertilionídeos. Portanto, a família Emballonuridae tem sido considerada por alguns autores como possível ancestral dos noctilionídeos, mormoopídeos e filostomídeos do Novo Mundo (Smith, 1976). As demais famílias neotropicais, ou seja, Natalidae, Thyropteridae e Furipteridae aparentemente derivaram do estoque vespertilionóideo.

Apesar da consideração anterior, Smith (1976) não descarta a hipótese de que os Chiroptera ancestrais datados do Eoceno foram a fonte a partir dos quais várias linhagens de Microchiroptera radiaram-se adaptativamente.

Os estudos taxonômicos em Chiroptera têm sido dificultados pelo elevado número de gêneros e espécies que compõem algumas famílias, como Vespertilionidae e Phyllostomidae, limitando as interpretações evolutivas ao nível do táxon estudado.

Nestas situações, a caracterização das espécies quanto a diferentes aspectos podem ajudar a identificação das mesmas e os dados obtidos, podem ser utilizados nas interpretações evolutivas.

Além disso, as descrições das espécies têm sido feitas, geralmente com base em características morfológicas e métricas, que muitas vezes, refletem apenas a adaptação do animal a diferentes nichos ecológicos.

O conhecimento de características genéticas, citogenéticas, moleculares, ecológicas e de comportamento dos quirópteros têm aumentado significativamente, pois tem ajudado a substanciar hipóteses de relacionamentos evolutivos, formuladas com base em considerações filogenéticas.

Os estudos em Chiroptera têm mostrado que as características citogenéticas e moleculares são importantes nas análises comparativas entre espécies de diferentes gêneros, fornecendo subsídios para propostas sobre a evolução dos Microchiroptera. Um exemplo é o trabalho de Volleth & Heller (1994), que envolveu a análise de cariótipos de 59 espécies pertencentes a 23 gêneros de Vespertilionidae. Com base neste trabalho Simmons (1998) e Simmons & Geisler (1998) propuseram a elevação da tribo Myotini para a categoria de subfamília, e a exclusão da subfamília Tomopeatinae de Vespertilionidae, que foi reconhecida como subfamília de Molossidae.

A família Phyllostomidae, embora classificada como segunda em número de espécies (143), supera todas as famílias neotropicais em número de gêneros (cerca de 49). É também uma das famílias mais estudadas do ponto de vista biológico, pois desperta o interesse dos estudiosos de Evolução porque representa a família mais diversificada em termos de estratégia alimentar (insetívoros, onívoros, frugívoros, nectarívoros, carnívoros e sanguívoros). Apesar de haver estudos em representantes das diferentes subfamílias, pela grande diversidade de formas que representam, as interpretações evolutivas têm limitado-se ao nível do táxon estudado (geralmente gêneros e espécies).

No Brasil há registros da ocorrência de 78 espécies pertencentes a 31 gêneros de Phyllostomidae. Apesar do fato de que os Emballonuridae possam ter sido os ancestrais dos Phyllostomidae, os poucos estudos comparativos realizados não têm conseguido evidenciar o relacionamento entre os membros das duas famílias. Apesar desta incerteza, a origem monofilética da família é suportada por inúmeros dados de natureza morfológica, citogenética, bioquímica e molecular, obtidos em estudos realizados em táxons geralmente inferiores ao nível de subfamília (Patton & Baker, 1978; Baker **et al.**, 1989, 1991; Van Den Bussche, 1992; Gimenez **et al.**, 1996).

Um gênero de Phyllostomidae muito especulado é *Artibeus*. A sistemática das espécies deste gênero é ainda motivo de

muita controvérsia decorrente, muitas vezes, da falta de informações adequadas sobre a distribuição geográfica e a variação nos diferentes táxons. Apesar de alguns estudos fornecerem informações que auxiliam a identificação e o reconhecimento das 19 espécies que compõem o gênero, uma caracterização mais precisa para cada uma delas é ainda necessária (Owen, 1988; Lim & Wilson, 1993; Pumo **et al.**, 1996; Taddei **et al.**, 1998).

A família Molossidae é também uma família com origem no Velho Mundo e que ocorre nas Américas. É composta de 86 espécies insetívoras, sendo a terceira maior em número de espécies.

À semelhança de Phyllostomidae, a sistemática de algumas espécies de Molossidae é incerta. Muitas questões relativas à sistemática e distribuição não estão ainda bem estabelecidas, pois não há muitos estudos envolvendo análises representativas dos táxons, pela dificuldade em se coletar esses animais, devido às suas características de comportamento e hábito. Entre os estudos mais abrangentes para molossídeos podemos citar o de Eger (1977) para *Eumops*, Freeman (1981), que realizou um estudo multivariado em diferentes espécies, Dolan (1989) que analisou espécies de *Molossus* e, Gregorin (2000), que analisou filogeneticamente os diferentes gêneros de Molossidae.

Embora as espécies do gênero *Molossus* sejam as mais frequentemente encontradas em muitas regiões, a caracterização específica muitas vezes não é fácil. As cinco espécies que compõem o

gênero *Molossus* (*M. molossus*, *M. rufus*, *M. sinaloe*, *M. pretiosus*, *M. currentium*) são morfológicamente muito semelhantes, e os crânios das diferentes espécies são difíceis de serem distinguidos. Inicialmente as maiores espécies de *Molossus* foram agrupadas juntas (*M. rufus*, *M. sinaloe* e *M. pretiosus*) e separadas das menores (*M. molossus*, *M. currentium*). Alguns autores na tentativa de melhor caracterizar as espécies associaram à característica de tamanho, outras, como tipo, comprimento e coloração do pêlo. No Brasil são encontradas quatro espécies: *M. molossus*, *M. rufus*, *M. pretiosus* e *M. currentium*. A distinção morfológica entre elas é difícil. Através das análises morfométricas constatou-se que as principais características externas e cranianas distintivas entre *M. rufus* e *M. molossus* são relativas ao tamanho. *M. rufus* é proporcionalmente maior que *M. molossus*. Embora o tamanho seja a condição distintiva mais evidente, há dificuldades na identificação quando se comparam as formas extremas das espécies.

Uma outra espécie de *Molossus* muito próxima morfológicamente a *M. rufus* é *M. pretiosus*, considerada como co-específica com *M. rufus* por Handley (1966) e espécie distinta de *M. rufus* por Jones **et al.** (1971) e Freeman (1981). Até recentemente não havia nenhuma descrição da ocorrência de *M. pretiosus* no Brasil, até Gregorin & Taddei (2000) registrarem a ocorrência da espécie no estado do Mato Grosso. *M. currentium*, embora com registro em áreas marginais do

território brasileiro tem similaridade morfológica com *M. molossus* (Gregorin & Taddei, 2002).

A família Vespertilionidae, com distribuição no Velho Mundo e Novo Mundo, constitui um grupo bastante diversificado e contém cerca de um terço das espécies de morcegos (Koopman, 1993). A proposta mais recente de classificação para os Vespertilionidae foi apresentada por Simmons (1998), e nela foram reconhecidas cinco subfamílias: Vespertilioninae (27 gêneros e 180 sp), Myotinae (2 gêneros e 86 sp.), Miniopterinae (1 gênero e 10 sp.), Murinae (2 gêneros e 16 sp.) e Kerivoulinae (1 gênero e 22 sp.).

Nas Américas há registro da ocorrência de 74 espécies de Vespertilionidae, das quais 19 ocorrem no Brasil (Taddei & Aguiar, 1995). As espécies que ocorrem no Brasil pertencem aos gêneros *Eptesicus* (4 sp.), *Histiotus* (3 sp.), *Lasiurus* (5 sp.), *Myotis* (6 sp.) e *Rhogeessa* (1 sp.). As espécies dos gêneros *Eptesicus* (32), *Histiotus* (4), *Lasiurus* (7) e *Rhogeessa* (7) estão incluídas na subfamília Vespertilioninae, enquanto que a subfamília Myotinae constitui-se pelas espécies de *Myotis* (85) e *Lasionycteris* (1).

Em decorrência do grande número de espécies da família a sistemática ao nível familiar é controversa, e o reconhecimento das espécies dos gêneros com elevado número de espécies como *Eptesicus* e *Myotis*, não é simples.

O gênero *Myotis* é um dos gêneros de Mammalia com maior número de espécies, distribuídas por todos os continentes e encontradas em uma ampla variedade de situações ecológicas. Embora exista na literatura uma série de informações sobre a ecologia, comportamento e fisiologia de *Myotis*, a sistemática e os relacionamentos filogenéticos da maioria das espécies ainda não estão bem esclarecidos.

Taxonomicamente *Myotis* diferencia-se dos outros quatro gêneros de vespertilionídeos brasileiros: *Lasiurus*, *Eptesicus*, *Histiotus* e *Rogheessa* por apresentar dois dentes incisivos superiores praticamente de igual tamanho, característica compartilhada também por *Histiotus* e *Eptesicus* e, três pré-molares superiores e inferiores, característica presente somente em *Myotis*.

A espécie *M. albescens* é morfologicamente muito semelhante a *M. nigricans*. As diferenças consideradas na separação das duas espécies não são sempre evidentes. Os limites de cada uma das características para as duas espécies são determinados visualmente. Considerando que a maioria das características morfológicas são adaptativas a diferentes nichos ecológicos, situações como as observadas em *M. albescens* e *M. nigricans* também ocorrem com outras espécies de *Myotis*, evidenciando a necessidade de estudos que considerem outras características que possam auxiliar nas interpretações sistemáticas.

Em situações como as observadas para *Artibeus*, *Molossus*, *Eumops*, *Myotis* e *Eptesicus*, a caracterização das espécies

quanto à outros aspectos, como por exemplo moleculares, podem ajudar sobremaneira a identificação das espécies.

A escolha do conjunto de características a ser avaliado depende do problema taxonômico que está sendo considerado. Em Chiroptera a evolução não ocorreu na mesma taxa em todas as linhagens, assim, alguns dados que são altamente informativos em algumas partes de uma árvore filogenética, podem não ser para outras. Por isso muitos pesquisadores têm procurado combinar os vários tipos de dados nas suas análises e assim fornecer resolução e estabilidade nos resultados das interpretações e hipóteses filogenéticas.

O uso de técnicas moleculares na sistemática de alguns grupos de morcegos tem fornecido informações úteis, que na maioria das vezes não são obtidas pelos estudos morfológicos, permitindo assim a reavaliação das hipóteses de relacionamentos, e com isso propiciado grandes avanços na taxonomia de Chiroptera (Bickham *et al.*, 1991; Sinclair *et al.*, 1995; Baker *et al.*, 2000; Van Den Bussche *et al.*, 2001).

2. Marcadores moleculares como ferramentas no estudo da variação genética.

O potencial evolutivo de uma população é determinado pelo grau de variação genética. Desse modo, a quantidade de variação genética de uma população é um parâmetro fundamental nos estudos evolutivos.

O estudo da variabilidade genética é baseado no uso de marcadores. Até meados da década de 60, os marcadores utilizados eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual. Marcadores fenotípicos são fáceis de serem identificados, mas em alguns casos difíceis de serem avaliados com precisão, principalmente por causa da interferência do meio ambiente ou de genes modificadores.

Os recentes avanços na biologia molecular abriram novas perspectivas para a pesquisa em conservação de espécies e para os estudos de biologia populacional e taxonômicos. Pela primeira vez a variação encontrada em plantas ou animais pôde ser analisada ao nível do DNA. Diferenças nas seqüências gênicas podem ser diretamente observadas e descritas com um grau de precisão impraticável há pouco tempo atrás.

O surgimento da técnica de PCR na década de 80 desenvolvida por Mullis & Faloona (1987), permitindo a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, provocou uma verdadeira revolução nas técnicas de biologia molecular, facilitando muito o trabalho de laboratório.

PCR (Polymerase Chain Reaction – reação da polimerase em cadeia), é uma técnica poderosa, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico, pela extensão simultânea do *primer* nas fitas complementares de DNA, na

presença da enzima DNA polimerase. Ela baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (*primers*) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação.

Esta tecnologia abriu caminho para uma mudança no paradigma genético básico: o da inferência do genótipo a partir do fenótipo, onde Mendel foi pioneiro, para a análise genética direta da variação na seqüência de DNA. Um dos aspectos mais fundamentais da revolução causada pela PCR foi a possibilidade de gerar grandes quantidades de DNA, através da amplificação de segmentos específicos do genoma, que podem ser facilmente detectados em gel de eletroforese através de corantes específicos.

Atualmente, muitos métodos estão disponíveis para analisar a diversidade molecular em espécies animais e vegetais. Essas metodologias diferenciam-se pela técnica utilizada para revelar a variabilidade ao nível de DNA, e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, populações e espécies, facilidade de uso, consistência e reprodutibilidade (Milach, 1998).

AFLPs, RAPDs, SCARs, são exemplos das muitas técnicas baseadas em PCR que abriam novas e inúmeras possibilidades de utilização do polimorfismo encontrado na molécula de DNA.

Como a técnica de RAPD é baseada na amplificação de segmentos múltiplos e aleatórios do DNA genômico, ela tem a vantagem

de usar pequenas quantidades de DNA, não requerer conhecimento prévio do genoma e fornecer um grande número de marcadores (Hadrys **et al.**,1992), permitindo análises genéticas rápidas de organismos pequenos e de grande número de indivíduos em tempo relativamente curto. Devido ao fato dessa técnica não necessitar de clonagem, sequenciamento de nucleotídeos ou hibridação por *Southern blot*, ela tem permitido a detecção rápida e efetiva dos polimorfismos e marcadores genéticos em uma grande quantidade de plantas e animais. É uma técnica rápida e relativamente barata quando comparada com as demais classes de marcadores moleculares (van Heusden & Bachmann, 1992).

Uma vez que os *primers* são de tamanho intermediário (na ordem de 10 pares de base), múltiplos fragmentos amplificados em diferentes graus (de diferentes *loci*) estão usualmente presentes para cada *primer* em cada genoma. Dessa forma, o número de locus que pode ser examinado é ilimitado. Pelo fato dos *primers* consistirem de seqüências casuais, não discriminando entre regiões codificadoras e não codificadoras, é razoável supor ser esta uma técnica de amostragem do genoma mais casual que os métodos convencionais (Lynch & Milligan, 1994).

Esses fragmentos produzidos por RAPD, podem ser separados por tamanho sobre um gel de eletroforese e visualizados por corantes específicos, eliminando a necessidade de sondas radioativas. Esta técnica, diferentemente das convencionais permite amostrar o

genoma em um caminho altamente aleatório (Williams **et al.**, 1990). Assim, como cada *primer* dirige a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente, em diversos pontos do genoma, o resultado é a presença de várias bandas no gel. Esta técnica pode detectar altos níveis de polimorfismos de DNA e pode, após serem caracterizados, produzir excelentes marcadores genéticos espécie-específicos, que podem ser utilizados na caracterização das diferentes espécies (Welsh & McClelland, 1990; Williams **et al.**, 1990).

Além disso, os segmentos RAPD uma vez amplificados e separados por eletroforese podem ser facilmente isolados do gel, mantidos na forma de uma biblioteca genômica *in vitro* sem necessidade de vetores, e amplificados via PCR sempre que necessário. Estes segmentos podem ser utilizados como sondas para a detecção de RFLP em locus de cópia única ou em *locus* hipervariáveis, dependendo do seu conteúdo em termos de número de cópias nas seqüências internas (Grattapaglia & Sederoff, 1994).

Os dados experimentais de mapeamento genético em diversas espécies indicam que os *loci* de marcadores RAPD estão distribuídos ao acaso ao longo do genoma, sem evidências de agrupamento de marcadores em regiões específicas. As seqüências internas dos segmentos amplificados pertencem a todas as classes de abundância de DNA no genoma, desde seqüências de cópia única até

altamente repetitivas (Williams **et al.**, 1993; Grattapaglia & Sederoff, 1994; Plomion **et al.**, 1995).

Apesar das inúmeras vantagens dos marcadores RAPD, eles têm algumas limitações. Um deles é a de serem herdados como marcadores dominantes (Williams **et al.**, 1990), sendo esta a maior desvantagem da técnica, pois este modelo de herança não permite identificar os produtos de diferentes *loci*. Ao se observar uma banda RAPD no gel não é possível distinguir se aquele segmento originou-se a partir de uma ou de duas cópias da seqüência amplificada.

Assim, podem fornecer algum viés em alguns parâmetros genéticos, quando comparados com outros marcadores multi - alélicos e co-dominantes (Lynch & Milligan, 1994).

Apesar dessas limitações, os marcadores RAPD, como já mencionado, apresentam várias vantagens quando comparados com outros marcadores moleculares, entre elas: (1) os experimentos são simples e rápidos, não sendo necessárias grandes preparações, tais como isolamento de sondas de DNA clonado, *Southern blots*, ou sequenciamento de nucleotídeos; (2) não requer conhecimento prévio de seqüências específicas para os *primers*, podendo ser usada uma série de *primers* universais; (3) não utiliza sondas radioativas; (4) necessita de baixa quantidade de DNA genômico para a análise; (5) permite a visualização de grande quantidade de polimorfismos; e (6) não requer

experiência aprofundada em biologia molecular e nem instalações sofisticadas de laboratório (Halward **et al.**, 1992).

Além das vantagens citadas, pela natureza dos dados dos marcadores RAPD, eles também têm sido utilizados em estudos filogenéticos (van de Zande & Bijlsma, 1995; Millan **et al.**, 1996; Marillia e Scoles, 1996) e epidemiológicos (Garcia **et al.**, 1998), demonstrando uma boa aplicabilidade também nestas áreas.

Assim, pela abrangência das aplicações da técnica de RAPD e pelos muitos aspectos evolutivos ainda não esclarecidos em diversos táxons de Chiroptera, vimos justificada a proposta de utilização da técnica RAPD em morcegos, onde são pouco os estudos com essa metodologia.

II. OBJETIVOS

Com base no exposto na Introdução e, na ênfase em obter informações que possam colaborar na caracterização e identificação das espécies de morcegos, pretendeu-se:

- a) Obter através da técnica de RAPD, marcadores moleculares espécie-específicos que possam ser utilizados para a caracterização de espécies de Molossidae, Vespertilionidae e Phyllostomidae, e
- b) Verificar através de hibridação *in situ* fluorescente, a especificidade desses marcadores, a fim confirmar a homologia e testar a aplicabilidade desses marcadores como sonda nos processos de hibridações.

III. MATERIAL E MÉTODOS

A. Para o Estudo Molecular

1. Espécies

Foram analisados no presente estudo, quatro espécimes (dois machos e duas fêmeas) de cada uma das sete espécies pertencentes a três famílias de Chiroptera: *Eumops perotis*, *Eumops glaucinus*, *Molossus molossus*, *Molossus rufus* (Molossidae), *Eptesicus furinalis* e *Myotis nigricans* (Vespertilionidae) e *Artibeus planirostris* (Phyllostomidae) (Tabela 1).

Os 28 espécimes analisados foram obtidos em coletas realizadas em área urbana e rural da região de São José do Rio Preto e Araçatuba/SP, através do procedimento usual com redes do tipo “mist-nets”, dispostas nas possíveis rotas de vôo e saídas de abrigo. Após capturados, os animais foram transportados ao laboratório e processados para o estudo molecular e citogenético. Todos os exemplares foram depositados na Coleção de Quirópteros do Departamento de Zoologia e Botânica do IBILCE-UNESP – SJRP.

Tabela 1. Discriminação dos espécimes coletados pela família, espécie, número de registro, sexo e procedência. M= macho; F= fêmea.

Família	Espécie	Número de Registro(CFC)	Sexo	Procedência
Molossidae	<i>M. molossus</i>	247	M	S.J. Rio Preto
		560	M	Bady Bassit
		290	F	S.J. Rio Preto
		306	F	S.J. Rio Preto
	<i>M. rufus</i>	288	M	S.J. Rio Preto
		291	M	Cedral
		292	F	Cedral
		435	F	S.J. Rio Preto
	<i>E. glaucinus</i>	246	M	S.J. Rio Preto
		285	M	S.J. Rio Preto
		269	F	S.J. Rio Preto
		355	F	S. J. Rio Preto
	<i>E. perotis</i>	323	M	S. J. Rio Preto
		384	M	Bady Bassit
		385	F	Bady Bassit
		394	F	S.J. Rio Preto
Vespertilionidae	<i>M. nigricans</i>	584	M	S.J. Rio Preto
		591	M	S.J. Rio Preto
		485	F	Araçatuba
		670	F	S.J. Rio Preto
	<i>E. furinalis</i>	295	M	S. J. Rio Preto
		297	M	S.J. Rio Preto
		294	F	S.J. Rio Preto
		296	F	S.J. Rio Preto
Phyllostomidae	<i>A. planirostris</i>	265	M	Nova Aliança
		688	M	S.J. Rio Preto
		272	F	Neves Paulista
		672	F	S.J. Rio Preto

2. Extração do DNA genômico para o experimento RAPD

O DNA genômico total foi extraído de fragmentos de pulmão, rim ou fígado, obtidos durante o procedimento de retirada de biopsia para a iniciação de culturas celulares. O procedimento de extração do DNA envolveu a lise das células com tampão de lise (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % Tween 20), após maceração do tecido, seguida de digestão enzimática por proteinase K (200 µg/ml) *overnight*. A solução viscosa obtida foi centrifugada, as proteínas precipitadas com acetato de potássio (5 M) e o DNA precipitado pela adição de etanol absoluto gelado. O DNA obtido foi recolhido, diluído em tampão TE (10 mM Tris/1 mM EDTA) e após ser feita uma estimativa da concentração em espectrofotômetro, foi estocado à -20° C.

3. Oligonucleotídeos

Para a amplificação do DNA e verificação dos polimorfismos RAPD foi utilizada uma série de 20 *primers* sintetizados artificialmente pela Life Technologies do Brasil Ltda., selecionados segundo seu conteúdo G+C (em %) e com base na consistência em amplificar um grande número de bandas analisáveis e reproduzíveis. Os *primers* estão discriminados a seguir pelos códigos de referências e seqüências de bases, como indicado abaixo.

Primer 1: GAA ACG GGT G (60%) Primer 11: CAG GCC CTT C (70%)
Primer 2: CAG CAC CCA C (70%) Primer 12: TGG GGC TGT C (70%)
Primer 3: GTT GCG ATC C (60%) Primer 13: CCC GTT GCC T (70%)
Primer 4: ACA CCG GAA C (60%) Primer 14: GTC CGG AGT G (70%)
Primer 5: GAC TGC CTC T (60%) Primer 15: TTC AGG GCA C (60%)
Primer 6: GTG ACC GAG T (60%) Primer 16: TGT GGC AGC A (60%)
Primer 7: AGC AGC GCA C (70%) Primer 17: ACA GCC TGC T (60%)
Primer 8: AGA CGA TGG G (60%) Primer 18: GGT CGA TCT G (60%)
Primer 9: GAC GTG GTG A (60%) Primer 19: GGG TAA CGC C (70%)
Primer 10: GTG AAT GCG G (60%) Primer 20: TGC GAG AGT C (60%)

4. Amplificação do DNA

As reações de amplificação foram realizadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR), segundo protocolo descrito por Willians **et al.** (1990), com modificações. As amostras foram preparadas em volumes de 15 μ l contendo a seguinte mistura de reagentes e concentração: $MgCl_2$ (1,5 mM), dNTPs (200 μ M), *primer* (50 pmol), BSA (0,5 μ g/ml), DNA genômico (25 ng) , Taq DNA polimerase (1U) e tampão de reação e água em volume variável.

A reação de PCR foi feita em ciclador Perkin Elmer (gene Amp PCR System 2400), utilizando-se um ciclo inicial de 3 minutos a 94^o C, para a inativação de possíveis proteases ainda ativas que possam

interferir na reação enzimática, seguido de 43 ciclos de amplificação com 30 segundos a 94⁰ C para desnaturação do DNA, 1 minuto a 35⁰ C para o anelamento dos *primers* e 2 minutos a 72⁰ C para a extensão das cadeias. Ao final do último ciclo, a temperatura de 72⁰ C foi mantida por 5 minutos permitindo a extensão final das cadeias de DNA com fita simples recém – sintetizadas.

Todas as amplificações foram repetidas pelo menos uma vez para verificação da reprodutibilidade das bandas.

5. Detecção dos fragmentos

Para a separação e identificação dos fragmentos amplificados, uma amostra de 7ul de cada produto de amplificação por PCR foi aplicada em gel de poliacrilamida 8% (Bis-Acrilamida 30%, TBE 10X, Glicerol, APS 10% e TEMED). Em aparelho de eletroforese vertical, na presença de tampão TBE 1X (Trizma Base, Ácido Bórico e EDTA 0,5 M, pH 8,0) o gel foi exposto a uma corrente constante de 124 volts por 4,5 horas à temperatura de 25⁰C. Os fragmentos gerados por amplificação foram visualizados após a coloração do gel com nitrato de prata. Os géis foram secos e preservados envoltos em película de celofane.

6. Análise dos dados

As bandas produzidas em cada amplificação e para cada indivíduo foram analisadas diretamente no gel quanto à presença ou ausência, intensidade e tamanho, este estimado da comparação com um marcador de tamanho molecular padrão (100 pb DNA Ladder – BioLabs).

O tamanho de cada um dos fragmentos amplificados foi estimado em pares de bases, através do cálculo da distância entre o fragmento e a banda do DNA marcador de peso molecular mais próxima.

Para uma padronização na análise das bandas foram adotadas as seguinte premissas:

1^a) a interpretação das bandas nos géis é inambígua, ou seja, “alelos” de *loci* diferentes não migram na mesma posição em um gel, e o investigador é totalmente capaz de fazer a correspondência entre bandas de diferentes indivíduos e espécies, tanto no mesmo gel, quanto em géis diferentes;

2^a) cada locus pode ser tratado como um sistema de dois alelos, com um dos alelos sendo amplificado pela PCR. O alelo “nulo” tem a sua amplificação impedida devido a perda ou ao não reconhecimento de um sítio de iniciação. Este fato é o responsável pelo comportamento dominante dos marcadores RAPD.

Foram consideradas todas as bandas nítidas e/ou fortemente coradas que ocorreram em no mínimo um indivíduo (3,6%) e nas duas amplificações com o mesmo *primer*. As bandas amplificadas

apenas nos quatro indivíduos de uma mesma espécie foram consideradas espécie-específicas.

As bandas analisadas diretamente no gel foram identificadas por números e registradas para cada indivíduo. Com os dados de presença (1) ou ausência (0) das bandas foi construída uma matriz binária, que foi utilizada na análise numérica e filogenética.

Para as análises numéricas foi utilizado o software Popgene versão 1.31. Através delas foram calculadas as porcentagens de polimorfismos obtidos com cada *primer* e no conjunto de *primers*, para as espécies separadamente e para o conjunto de espécies.

Também foram calculados os índices de diversidade gênica segundo Nei (1973), da diversidade de Shannon (Lewontin, 1972), assim como da identidade genética e as distâncias genéticas entre as espécies. Os dados também foram usados para uma análise de cluster através de UPGMA (incluído no software Popgene).

As análises filogenéticas foram feitas através do software PAUP, versão 4.0b/0, utilizando-se os algoritmos UPGMA e Neighbor – joining e, como medida de apoio estatístico, foi feito o teste de bootstrap com 1000 réplicas.

B. Para o Estudo Citogenético Molecular

1. Espécies

No presente estudo foram analisadas preparações cromossômicas de seis exemplares pertencentes a seis espécies, ou seja, *E. glaucinus*, *E. perotis*, *M. rufus*, *E. furinalis*, *M. nigricans* e *A. planirostris*.

2. Culturas celulares

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de medula óssea e cultura de fibroblastos, conforme protocolos apresentados em Varella-Garcia & Taddei (1989) e Morielle – Versute & Varella – Garcia (1995).

a) Preparação direta de medula óssea

Nos animais submetidos ao estudo citogenético foram injetados subcutânea e dorsalmente, 0,2ml de suspensão de fermento glicosado para cada 25 g de peso corporal. Após cerca de 24 horas injetou-se intra-peritonalmente, 0,2 ml de colquicina 0,05%, para cada 25 g de peso corporal, para inibir a formação do fuso mitótico nas células estimuladas.

Decorridos 30 a 40 minutos da injeção de colquicina, os animais foram mortos, seus úmeros removidos e a medula recolhida em um tubo de centrifuga através de lavagens com solução salina de Hanks (NaCl, glicose, Na₂HPO₄, KCl, KH₂PO₄ e vermelho fenol) e auxílio de

uma seringa. As massas celulares foram desfeitas por sucessivas aspirações com a própria seringa e a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e foram acrescentados ao precipitado 8ml de solução hipotônica de KCl 0,075M a 37°C. Após 30 minutos de incubação a 37°C a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 8 ml de fixador metanol – ácido acético 3:1.

Após repouso de 15 minutos, a suspensão foi centrifugada, desprezou-se o sobrenadante e novo volume de fixador foi adicionado. Essa operação foi repetida mais duas vezes, sempre ressuspendendo-se o precipitado em 0,5 – 1,0 ml de fixador. O material foi então, pingado em lâminas molhadas e geladas.

b) Cultura de fibroblastos

As culturas de fibroblastos foram obtidas a partir do cultivo de fragmentos de pulmão obtidos em condições assépticas, após incisão torácica.

Os pulmões retirados foram colocados em frasco contendo meio de cultura Ham F-10 completo (10% de soro fetal bovino, penicilina 1.000.000 U/ml, quemisetina 40.000 mg/ml e anfotericina B 5ug/ml) e conduzido à geladeira, onde permaneceu por 24 horas.

O frasco com os pulmões foi levado para uma câmara de fluxo laminar, onde a biópsia foi transferida para uma placa de petri

contendo meio de cultura completo. Ela foi recortada várias vezes e os recortes foram transferidos à superfície inferior de um ou mais frascos de cultivo de células, nos quais foram adicionados 2 ml de meio Ham F-10 completo. Os frascos foram incubados em estufa a 37⁰ C por 3 dias, após o que foram observados ao microscópio invertido para verificação de aderência ao substrato, e proliferação celular. Na presença de crescimento celular, mais 3ml de meio foram adicionados. Os frascos foram novamente conduzidos à estufa e observados diariamente para verificar alterações do pH do meio, ocorrência de contaminação por fungos e bactérias e o índice de proliferação celular. Na presença de contaminação ou ausência de crescimento, os frascos foram descartados.

Quando o frasco estava forrado de células foi feita a replicagem da cultura para obtenção de maior número de células. Para isso retirou-se o meio do frasco e lavou-se a cultura com 5 ml de Hanks sem cálcio e magnésio. Acrescentou-se 1ml de solução de tripsina /EDTA à 37⁰C por 1 minuto. Retirou-se a tripsina e adicionou-se 5 ml de meio completo. Agitou-se fortemente o frasco para que as células se desprendessem. Metade do conteúdo do frasco, cerca de 2,5 ml foi transferido para outro frasco. Posteriormente, o volume dos frascos foi completado para 5 ml com meio completo e os frascos retornaram à estufa. As culturas com índices mitóticos elevados foram interrompidas através da adição de colquicina e após hipotonização e fixação das células. O material obtido foi pingado em lâminas molhadas e geladas.

3. Preparação da sonda

As sondas que foram utilizadas no procedimento de hibridação foram obtidas a partir dos fragmentos amplificados, identificados inicialmente pela análise visual do gel, como espécie-específicos.

As bandas contendo os fragmentos RAPD identificados foram coletadas diretamente do gel de poliacrilamida. Os fragmentos presentes na banda foram reamplificados com o mesmo *primer* que os gerou. Para a visualização dos fragmentos após o procedimento de hibridação eles foram marcados. A marcação ocorreu pela incorporação durante a amplificação, de dNTP marcado com biotina (Biotin -14- dATP Gibco brl).

As sondas obtidas foram preparadas para a hibridação. Esta preparação envolveu a adição ao DNA marcado, de DNA de esperma de Salmão (LifeTechnologies) e de Cot-1 DNA Humano (Invitrogen), que juntos suprimem regiões repetitivas e facilitam a ligação da sonda às regiões de afinidade.

Para cada 1 μ g de DNA marcado foram adicionados 50 μ g de DNA de esperma de salmão. O DNA foi purificado pela adição de 1/10 volumes de acetato de sódio 3 M, 2,5 volumes de etanol absoluto gelado, congelamento a -20°C *overnight* e centrifugação por 30 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco e dissolvido em 100 μ l de tampão TE (concentração final: 10 ng DNA/ μ l de

TE). Para cada 50 ng de DNA marcado e purificado foram adicionados 2,5 μ g de Cot – 1 DNA humano. Após nova precipitação com acetato de sódio 3 M, etanol absoluto gelado, e centrifugação por 30 minutos a 12.000 rpm, o precipitado de DNA foi seco a 37 ° C por 15 minutos, dissolvido em 100 μ l de mistura de hibridação (50% formamida, 10% w/v dextran sulfato, 1% v/v tween 20 em 2x SSC) e incubado a 37° C por 5 minutos. Após uma rápida centrifugação (2 segundos) a sonda foi congelada a –20° C até o momento de uso.

Para a hibridação, a sonda foi desnaturada em banho a 75°C por 10 minutos, incubada em gelo por 5 minutos e centrifugada por 5 segundos. Em seguida, a sonda foi colocada em banho a 37° C por 30 – 45 minutos para o “pré – anelling” das sequências repetitivas. Posteriormente, foi incubada em gelo por 5 minutos, centrifugada por 5 segundos e mantida no gelo até o uso. Para cada lamínula 26 x 72 mm foram aplicados 20 μ l de sonda em cada lâmina.

4. Hibridação *in situ* fluorescente

O procedimento de hibridação *in situ* fluorescente seguiu o protocolo rotineiramente utilizado no laboratório para hibridação genômica.

Lâminas com 14 dias de preparação, mantidas à temperatura ambiente, foram pré- tratadas em uma série de alcóois (70, 85 e 100%) por 2 minutos cada à temperatura ambiente, secas, passadas

em ácido acético 70% por um minuto e enxaguadas duas vezes, por quatro minutos em PBS (1x). Após nova desidratação na série de álcoois, elas foram secas e limpas com solução de Rnase (1 μ l da solução mãe – 10 mg/ml – para 99 μ l de 2xSSC pH 7,0), aplicada sobre as lâminas que foram cobertas com lamínulas de plástico e incubadas por 30 minutos a 37⁰ C em câmara úmida com 2xSSC, pH 7,0. Em seguida, as lamínulas foram removidas e as lâminas lavadas três vezes em 2xSSC pH 7,0, 5 minutos cada. Após passagem rápida em solução de pepsina (50 ml de água, 42 μ l de HCl 12 N e 50 μ l de pepsina solução estoque a 8%), as lâminas foram desnaturadas em solução de formamida 70% pH 7,0 a 70⁰ C por 2,5 minutos. A desnaturação foi interrompida pela lavagem das lâminas em uma série de álcoois gelados e, após secarem, foram colocadas para hibridar com a sonda de fragmento em câmara úmida a 37⁰ C por 48 horas. Depois da hibridação, as lâminas foram lavadas em formamida 50% em solução de 2XSSC a 42⁰ C por 2 minutos cada, e em um banho de 2xSSC a 42⁰ C por 2 minutos. Em seguida foram colocadas em solução bloqueadora I (5% w/v leite em pó desnatado em washing buffer I) à temperatura ambiente por 20 minutos e enxaguadas em washing buffer I (4xSSC e 0,05% v/v Tween 20) à temperatura ambiente por 5 minutos.

Para a detecção, as lâminas foram incubadas com FITC-avidina produzido pela Vector, diluído em bloqueador I na concentração 2 μ l : 1000 μ l a 37⁰C, por 20 minutos. Após lavagem por 5 minutos em

washing buffer I e washing buffer II (tampão TNE e 0,05% v/v tween 20), adicionou-se anti-avidina também da Vector em bloqueador II (5% v/v de leite em pó desnatado em washing buffer II) na concentração 2 μ l : 200 μ l e com washing buffer II a 37⁰ C, 5 minutos cada, passadas em um banho de PBS (1x) à temperatura ambiente, desidratadas na série de álcoois, secas e coradas com iodeto de propídeo (IP) 0,3 μ g/ml e diamidino-fenilindole 0,5 μ g/ml (DAPI).

Foram analisadas todas as metáfases completas presentes na lâmina, assim como os núcleos presentes em três campos diferentes de cada uma das metades da lâmina. As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência da Zeiss com lâmpada de 50 watt, em filtro apropriado. Os resultados foram documentados em filme 400 asa (Kodak e Sanssung).

IV. RESULTADOS

1. Padrão de bandas produzidas por RAPD

Foram critérios para a análise das bandas, intensidade suficiente para uma visualização nítida e distinção de bandas adjacentes, reprodutibilidade e observação por mais de uma pessoa. Todas as bandas com as condições pré-estabelecidas e observadas em um único indivíduo, isto é, com uma frequência de 3,6% foram consideradas. A inespecificidade da maioria das bandas com frequência baixa foi descartada pela repetição de algumas amplificações. Assim, as frequências das bandas variaram de 3,6 a 75,0% no conjunto de espécies, e de 25 a 100% em cada espécie.

As Figuras 1 e 2 representam produtos de amplificação do DNA genômico com os *primers* 1 e 10, para as sete espécies analisadas. As imagens foram escolhidas para ilustrar os aspectos gerais das bandas produzidas. Nas amplificações que esses géis representam, assim como nas demais (não ilustradas), foram observadas variações na intensidade das bandas, refletindo diferenças na quantidade dos produtos de amplificação dos fragmentos, e variações no tamanho dos fragmentos produzidos que variaram de 500 a 100 pares de bases (pb).

A análise dos géis e das bandas produzidas por RAPD permitiu verificar que os vinte *primers* decaméricos aleatórios foram

hábéis para produzir um número satisfatório de bandas para as análises propostas.

As bandas, identificadas e reconhecidas pelos tamanhos dos fragmentos em pares de bases (pb) e produzidas pelos vinte *primers*, foram identificadas por números (1 a 741). O registro das bandas quanto a presença ou ausência no gel foi feito para cada indivíduo e espécie separadamente. A presença e a ausência da banda foram representadas por 1 e 0 respectivamente. Esses dados foram usados para a construção de uma matriz binária, que foi utilizada na análise estatística e filogenética para representar a variação genética específica (representada pelos quatro indivíduos analisados) e da população (representada pelas sete espécies e 28 indivíduos). Os dados foram analisados com o auxílio do programa Popgene 1.31.

Conforme pode ser visualizado na Tabela 2, puderam ser observadas no conjunto de indivíduos, espécies e *primers*, um total de 741 bandas. Todos os *primers* utilizados geraram bandas em número igual ou superior a 25, com uma média geral para o conjunto de indivíduos e *primers*, de 37.

Ao observamos os *primers* e as espécies individualmente, cada uma delas representando os quatro indivíduos analisados, podemos notar que o número total de bandas produzidas variou em cada espécie. A espécie que apresentou maior número de

bandas foi *M. molossus* (369) e a com menor número foi *E. glaucinus* (239).

Os dados da Tabela 3 mostram, além do número total de bandas produzidas pelos *primers* individuais, o número de bandas polimórficas e as frequências relativas e médias observadas em cada espécie. Note que as cinco maiores frequências médias de bandas polimórficas foram produzidas pelos *primers* 1, 7, 8, 18 e 19. Contudo, quando analisamos as espécies separadamente, os *primers* que produziram as maiores frequências não foram necessariamente os mesmos cinco anteriores, indicando que houve variação na detecção dos polimorfismos dos indivíduos das espécies pelos diferentes *primers*. Para a espécie *M. molossus*, os cinco *primers* mais polimórficos foram, em ordem decrescente de frequência, o 8, 16, 19, 7 e 12. Para a espécie *M. nigricans* o *primer* mais polimórfico foi o 5 (59%), enquanto que para *E. perotis* foi o 15 (42,8%) (Tabela 3).

A análise das frequências de bandas polimórficas de cada espécie, no conjunto de 20 *primers*, evidenciou também, que a espécie mais polimórfica é *M. molossus* (43,0 %), seguida de *M. nigricans* (40,1%), *A. planirostris* (32,9%), *E. furinalis* (31,4%), *E. glaucinus* (29,4%), *M. rufus* (28,5%) e *E. perotis* (23, 1%) (Tabela 3 e Figura 3).

Todos os 741 fragmentos amplificados pelos 20 *primers* foram polimórficos quando considerados o conjunto de espécies, 5 foram monomórficos para mais de uma espécie e 8 monomórficos para uma

única espécie, estes últimos avaliados como fragmentos/bandas espécie-específicos. As bandas monomórficas foram identificadas pelos *primers* 2, 4, 6, 7, 8 e 11. Lembramos aqui, que três deles (2, 7 e 8) estão incluídos entre os que apresentaram a maior frequência média de bandas polimórficas.

A espécie para a qual foi detectado o maior número de bandas monomórficas espécie-específica foi *M. nigricans*, com 4 bandas, cujos tamanhos dos fragmentos correspondem a 130, 150, 226 e 275 pb. Duas bandas foram monomórficas para *M. molossus* (133 e 485 pb) e uma banda foi monomórfica para *E. furinalis* (110 pb) e *E. glaucinus* (231 pb) (Tabela 4, Figuras 4 a 9 e Anexo 1).

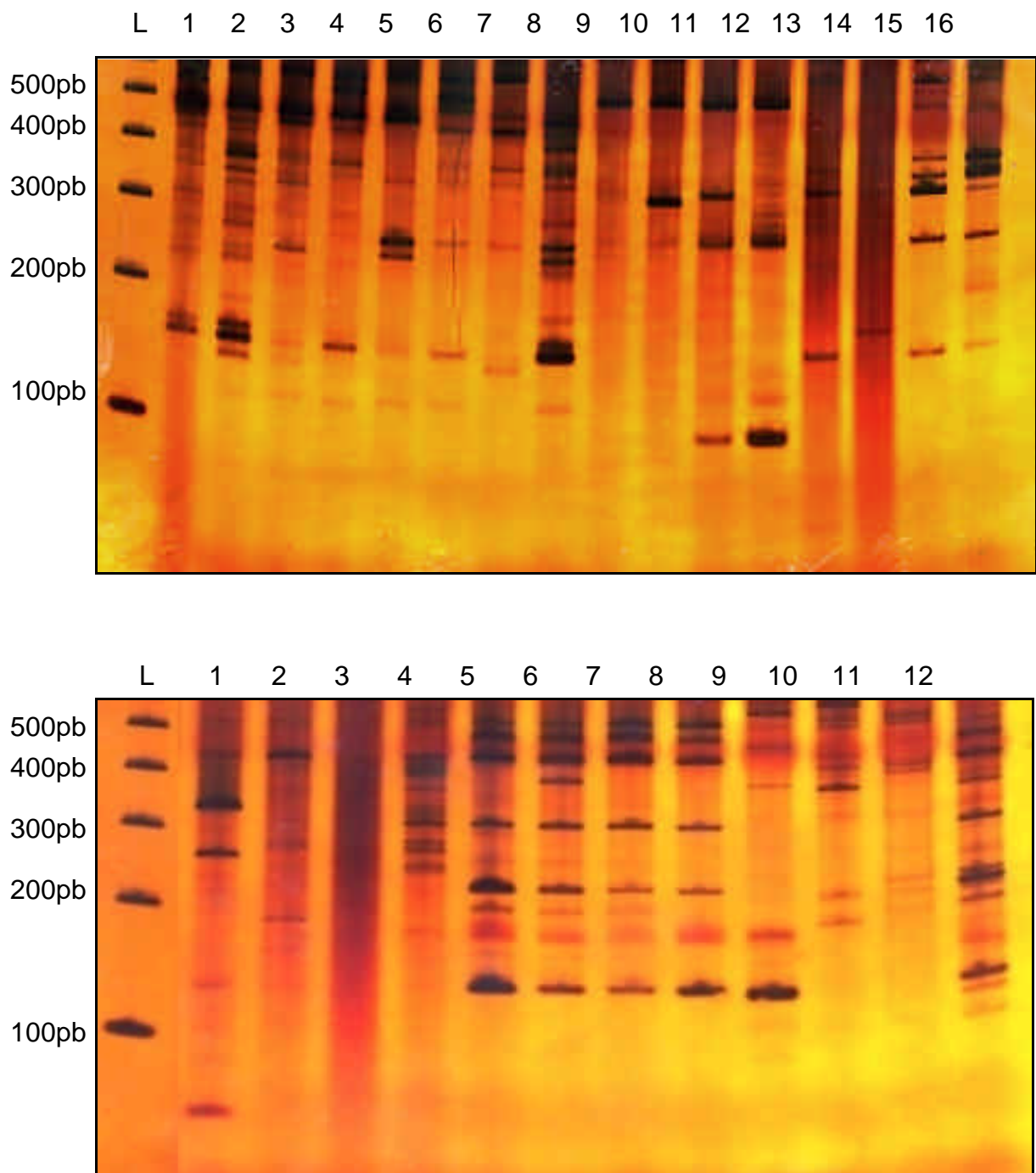


Figura 1: Perfil do gel de RAPD para o primer 1 de 28 indivíduos (14M e 14F) das espécies: **A- *Molossus molossus*** (colunas 1-4), ***Molossus rufus*** (colunas 5-8), ***Myotis nigricans*** (colunas 9-12) e ***Artibeus planirostris*** (colunas 13-16) e **B- *Eumops glaucinus*** (1-4), ***Eumops perotis*** (colunas 5-8) e ***Eptesicus furinalis*** (9-12). A coluna L contém padrão de peso molecular (100pb).

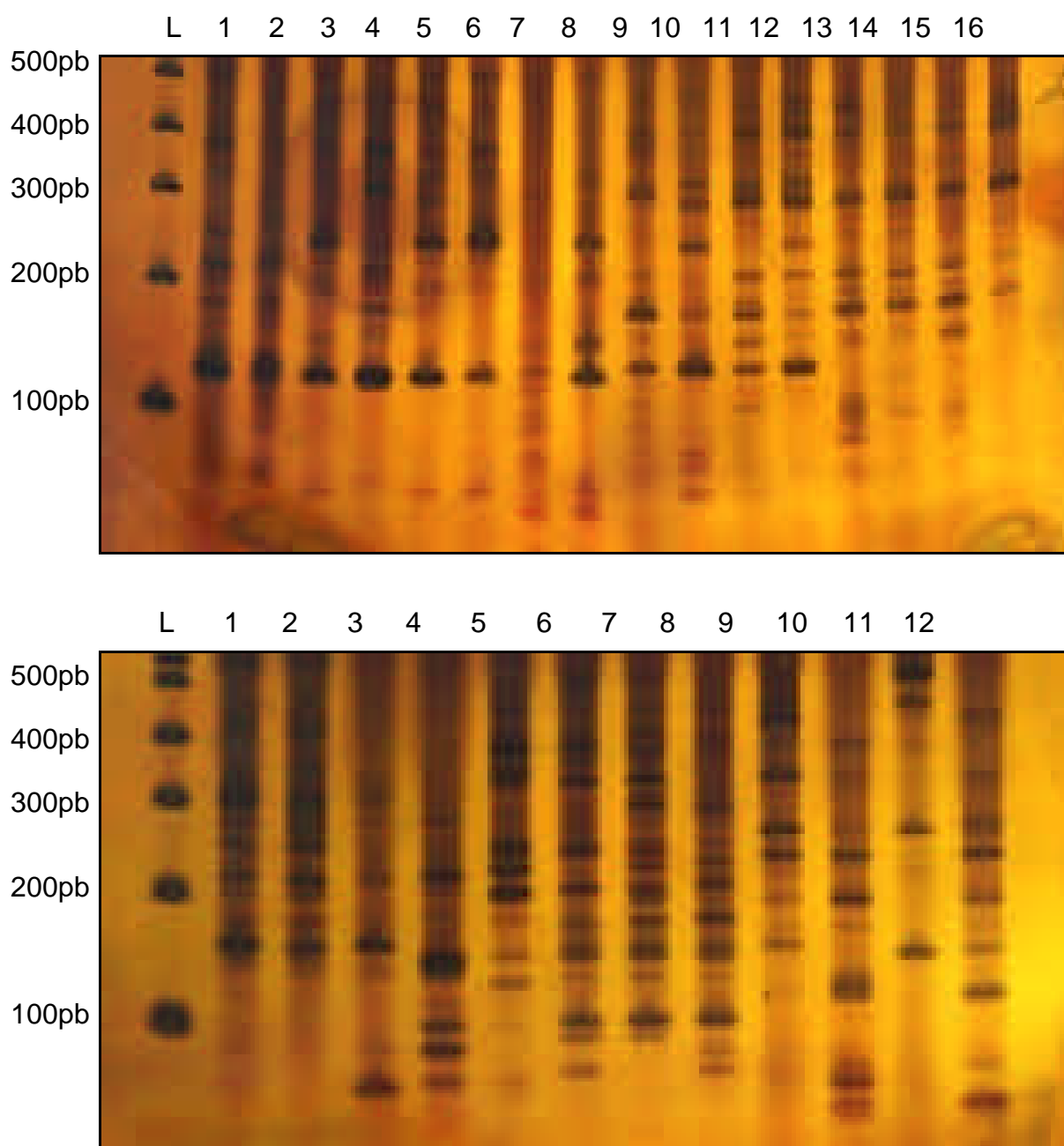


Figura 2: Perfil do gel de RAPD para o *primer* 10 de 28 indivíduos (14M e 14F) das espécies: **A-** *Molossus molossus* (colunas 1-4), *Molossus rufus* (colunas 5-8), *Eumops glaucinus* (colunas 9-12) e *Eumops perotis* (colunas 13-16); **B-** *Myotis nigricans* (colunas 1-4), *Eptesicus furinalis* (colunas 5-8) e *Artibeus planirostris* (colunas 9-12). A coluna L contém padrão de peso molecular (100pb). M = macho, F = fêmea.

Tabela 2. *Primer* e número de bandas produzidas em cada espécie e no conjunto de espécies. M.m= *M. molossus*, M.r.= *M. rufus*, E.g. = *E. glaucinus*, E.p.= *E. perotis*, M.n.= *M. nigricans*, E.f.= *E. furinalis*, A.p.= *A. planirostirs*.

Primer	Espécie							Total
	<i>M. m</i>	<i>M. r.</i>	<i>E. g.</i>	<i>E. p.</i>	<i>M.n.</i>	<i>E. f.</i>	<i>A. p.</i>	
1	17	18	13	10	13	14	10	33
2	18	17	17	17	22	13	5	38
3	24	8	13	5	20	15	13	48
4	18	11	12	11	23	14	16	42
5	15	8	15	14	24	10	9	39
6	25	16	12	16	12	15	8	39
7	28	19	17	20	26	16	12	45
8	26	26	23	22	29	12	19	42
9	17	6	14	10	18	13	10	38
10	22	13	12	7	18	17	14	41
11	14	10	15	16	18	14	17	35
12	18	15	7	13	12	21	10	33
13	17	12	7	12	13	17	14	36
14	13	10	11	10	17	7	16	38
15	9	11	11	15	22	13	9	35
16	19	9	3	8	15	15	17	29
17	19	16	12	9	20	9	13	35
18	19	15	13	11	16	14	11	35
19	20	9	3	13	18	19	17	35
20	11	11	9	7	6	9	8	25
Total	369	260	239	246	362	277	248	741

Tabela 3. Número de bandas totais (T), polimórficas (P) e frequências relativas (Fr) e médias (Fm) das bandas polimórficas produzidas pelos *primers* nas sete espécies analisadas. * = cinco maiores frequências

Primer	Espécies								
	M. molossus		M. rufus		E. glaucinus		E. perotis		
	P	Fr	P	Fr	P	Fr	P	Fr	
1	33	12	36,3	17	51,5	13	39,4	12	36,3
2	38	17	44,7	13	34,2	19	50,0	15	39,5
3	48	22	45,9	8	16,7	11	22,9	3	6,3
4	42	12	28,6	8	19,1	6	14,3	7	16,7
5	39	10	25,6	6	15,4	15	38,4	13	33,4
6	39	6	15,4	12	30,7	11	30,8	8	20,6
7	45	24	53,4	15	33,4	16	35,3	15	33,4
8	42	35	83,4	15	35,7	24	57,1	17	40,4
9	38	14	36,8	6	15,8	14	36,8	4	10,6
10	41	20	48,7	12	29,3	8	19,6	2	4,8
11	35	13	37,1	4	11,4	15	42,8	13	37,1
12	33	17	51,5	13	39,4	7	21,2	7	21,3
13	36	17	47,2	11	30,6	7	19,4	6	16,7
14	38	13	34,3	9	23,6	11	29,0	6	15,8
15	35	7	20,0	9	25,8	11	31,5	15	42,8
16	29	16	55,2	9	31,1	1	3,5	2	6,9
17	35	17	48,6	9	25,8	12	34,3	8	22,8
18	35	18	51,4	15	42,8	9	25,7	5	14,3
19	35	19	54,3	9	25,8	1	2,8	11	31,4
20	25	10	40,0	11	44,0	7	28,0	2	8,0
Total	741	319		211		218		171	
Fm		43,0		28,5		29,4		23,1	

Cont. Tabela 3. Número de bandas totais (T), polimórficas (P) e frequências relativas (Fr) e médias (Fm) das bandas polimórficas produzidas pelos *primers* nas sete espécies analisadas. * = cinco maiores frequências

Primer	Espécies							Fm
	M. nigricans		E. furinalis		A. planirostirs			
	P	Fr	P	Fr	P	Fr		
1	33	13	39,4	13	39,4	10	30,3	39,0*
2	38	10	26,3	11	29,0	5	13,1	34,0
3	48	16	33,4	13	27,0	15	31,3	26,0
4	42	19	45,2	13	31,0	16	38,1	27,6
5	39	23	59,0	8	20,6	9	23,0	30,8
6	39	7	18,0	13	33,4	8	20,6	30,2
7	45	21	46,7	14	31,2	12	26,7	37,0*
8	42	23	54,7	10	23,8	19	45,2	48,6*
9	38	16	42,2	11	29,0	10	26,3	28,2
10	41	18	43,9	9	22,0	13	31,8	28,5
11	35	8	22,8	12	34,3	17	48,6	33,4
12	33	10	30,3	18	54,6	10	30,3	35,4
13	36	9	25,0	15	41,7	14	38,4	31,4
14	38	16	42,2	6	15,7	16	42,2	28,9
15	35	18	51,5	11	31,5	7	20,0	31,7
16	29	14	48,2	12	41,3	16	55,2	34,5
17	35	17	48,6	7	20,0	12	34,3	33,4
18	35	16	45,8	14	40,0	11	31,5	36,0*
19	35	17	48,6	15	42,8	16	45,8	36,0*
20	25	6	24,0	8	32,0	8	32,0	29,6
Total	741	297		233		244		
Fm		40,1		31,4		32,9		

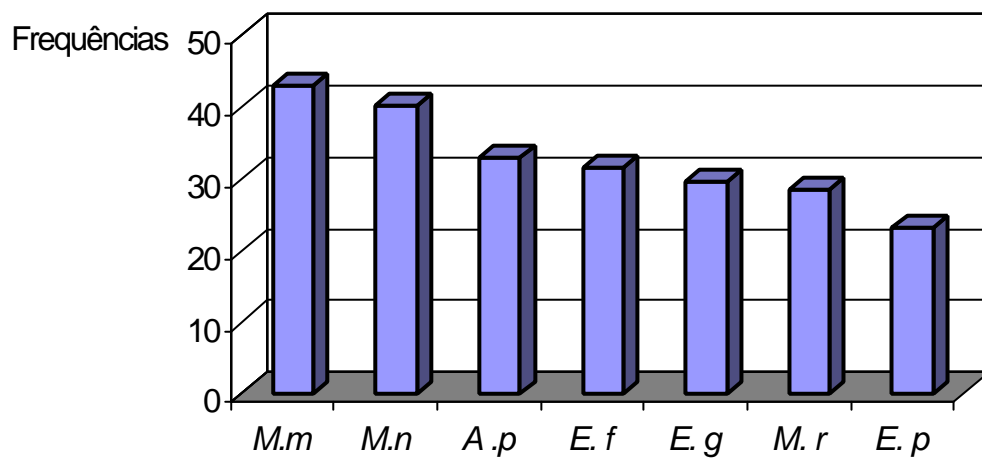


Figura 3. Gráfico de barras mostrando as frequências de bandas polimórficas produzidas pelos 20 *primers* nas espécies estudadas. (*M.m*: *M. molossus*, *M.n*: *M. nigricans*, *A.p*: *A. planirostris*, *E.f*: *E. furinalis*, *E.g*: *E. glaucinus*, *M.r*: *M. rufus* e *E.p*: *E. perotis*).

Tabela 4. Número de bandas identificadas como espécie- específica e tamanho dos fragmentos a que correspondem.

Primer	Espécie			
	<i>E.glaucus</i>	<i>M. molossus</i>	<i>E.furinalis</i>	<i>M.nigricans</i>
2	-	-	-	1/275pb
4	1/231pb	1/485pb	-	-
6	-	1/133pb	-	1/150pb
7	-	-	1/110pb	-
8	-	-	-	1/130pb
11	-	-	-	1/226pb

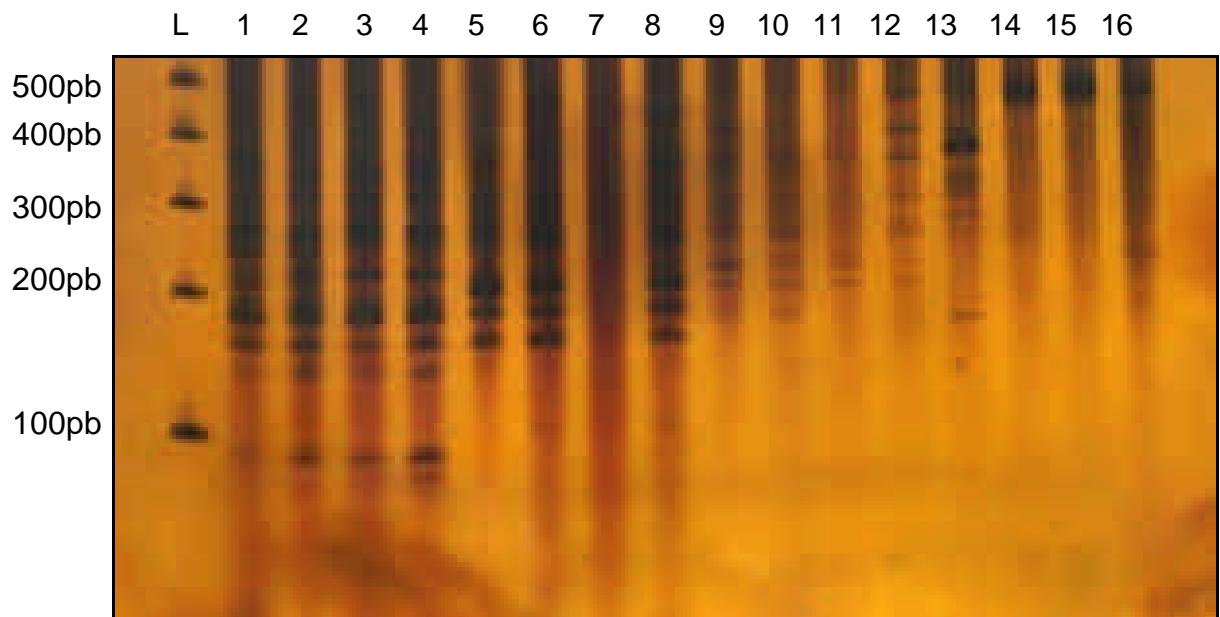


Figura 4: Perfil do gel de RAPD para o *primer 2* de 16 indivíduos (8M e 8F) das espécies: *Myotis nigricans* (colunas 1-4), *Eumops glaucinus* (colunas 5-8), *Eumops perotis* (colunas 9-12) e *Eptesicus furinalis* (colunas 13-16). A coluna L contém o padrão de peso molecular (100pb). A seta aponta para a banda do fragmento monomórfico de 275pb. M = macho, F = fêmea.

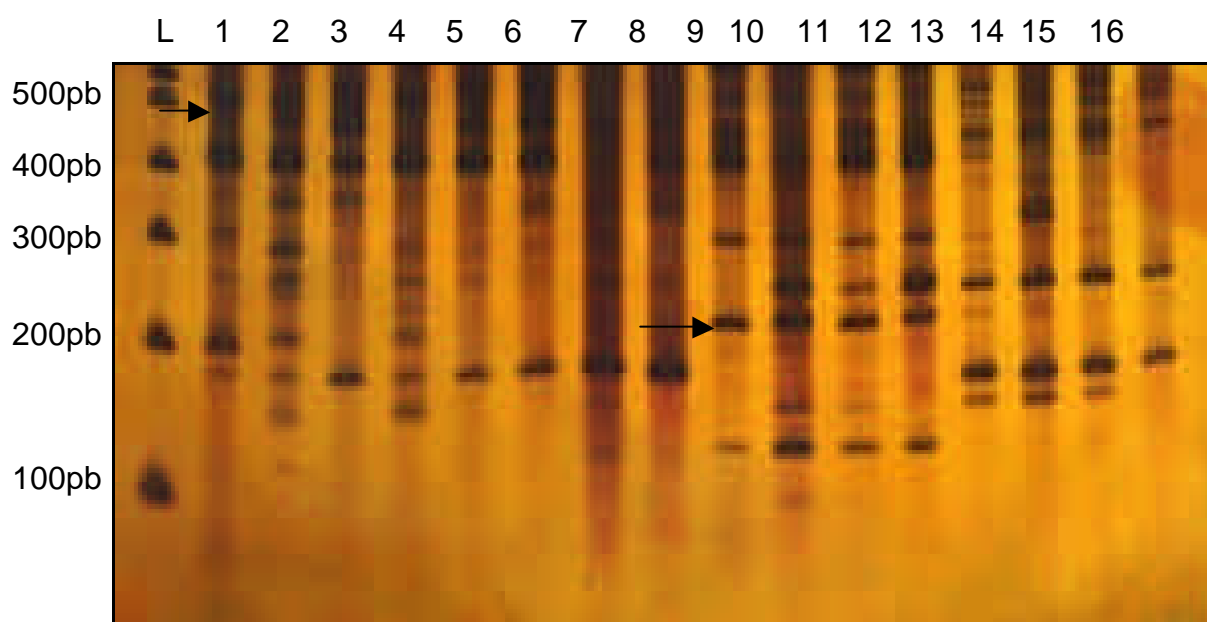


Figura 5: Perfil do gel de RAPD para o *primer* 4 de 16 indivíduos (8M e 8F) das espécies: *Molossus molossus* (colunas 1-4), *Molossus rufus* (colunas 5-8), *Eumops glaucinus* (colunas 9-12) e *Eumops perotis* (colunas 13-16). A coluna L contém o padrão de peso molecular (100pb). As setas apontam para as bandas dos fragmentos monomórficos de 231 pb e 485pb. M = macho, F = fêmea.

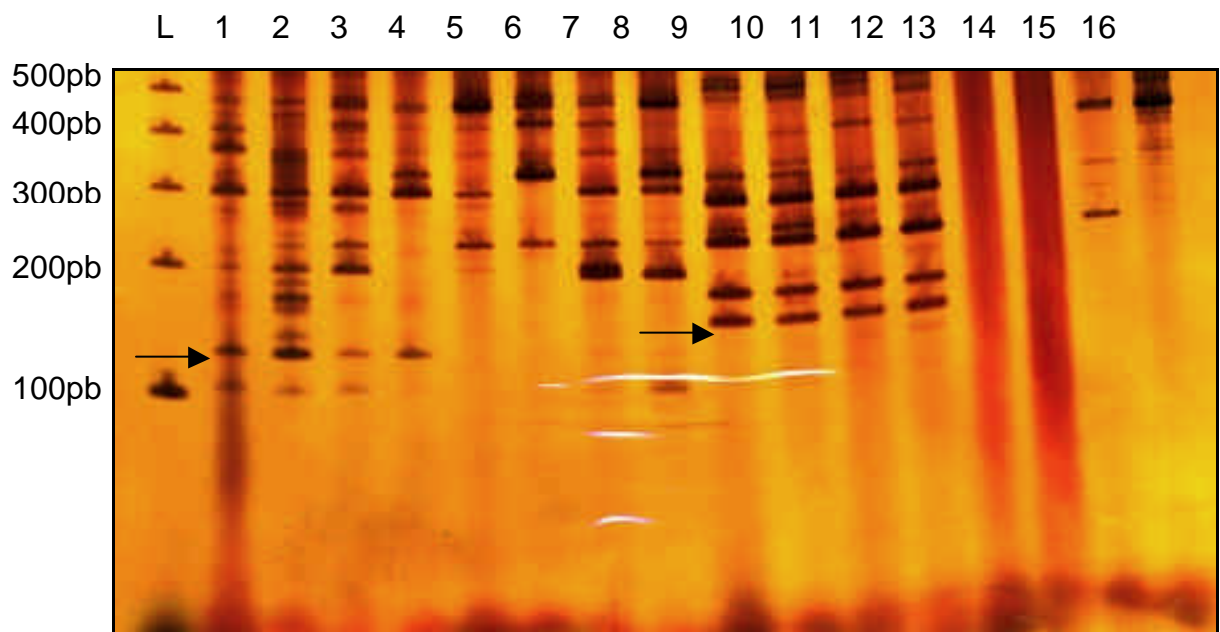


Figura 6: Perfil do gel de RAPD para o *primer* 6 de 16 indivíduos (8M e 8F) das espécies: ***Molossus molossus*** (colunas 1-4), ***Molossus rufus*** (colunas 5-8), ***Myotis nigricans*** (colunas 9-12) e ***Artibeus planirostris*** (colunas 13-16). A coluna L contém padrão de peso molecular (100pb). As setas apontam para as bandas dos fragmentos monomórficos de 133pb e 150pb. M = macho, F = fêmea.

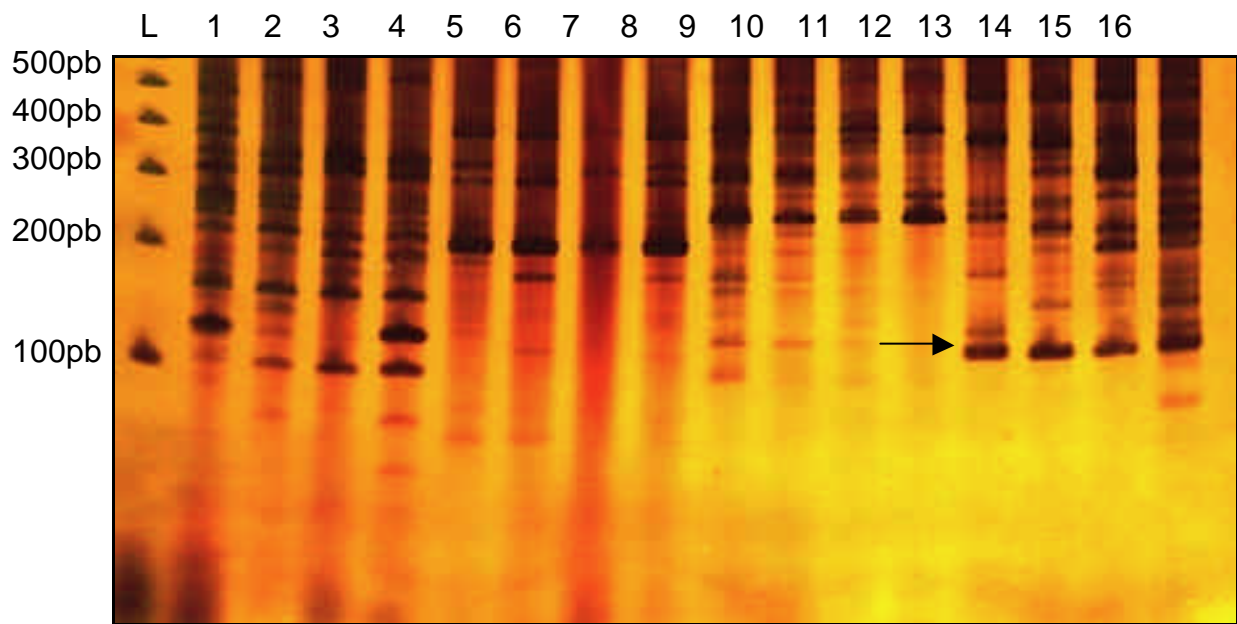


Figura 7: Perfil do gel de RAPD para o *primer 7* de 16 indivíduos (8M e 8F) das espécies: *Myotis nigricans* (colunas 1-4), *Eumops glaucinus* (colunas 5-8), *Eumops perotis* (colunas 9-12) e *Eptesicus furinalis* (colunas 13-16). A coluna L o contém padrão de peso molecular (100pb). A seta aponta para a banda do fragmento monomórfico de 110pb. M = macho, F = fêmea.

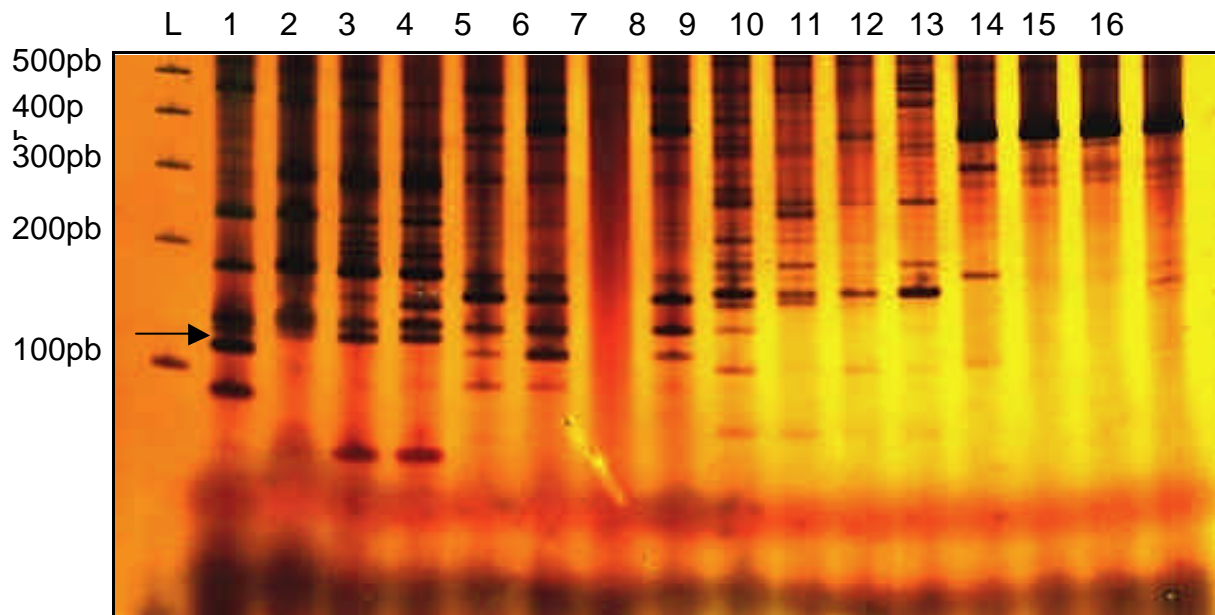


Figura 8: Perfil do gel de RAPD para o *primer* 8 de 16 indivíduos (8M e 8F) das espécies: *Myotis nigricans* (colunas 1-4), *Eumops glaucinus* (colunas 5-8), *Eumops perotis* (colunas 9-12) e *Eptesicus furinalis* (colunas 13-16). A coluna L contém o padrão de peso molecular (100pb). A seta aponta para a banda do fragmento monomórfica de 130 pb. M = macho, F = fêmea.

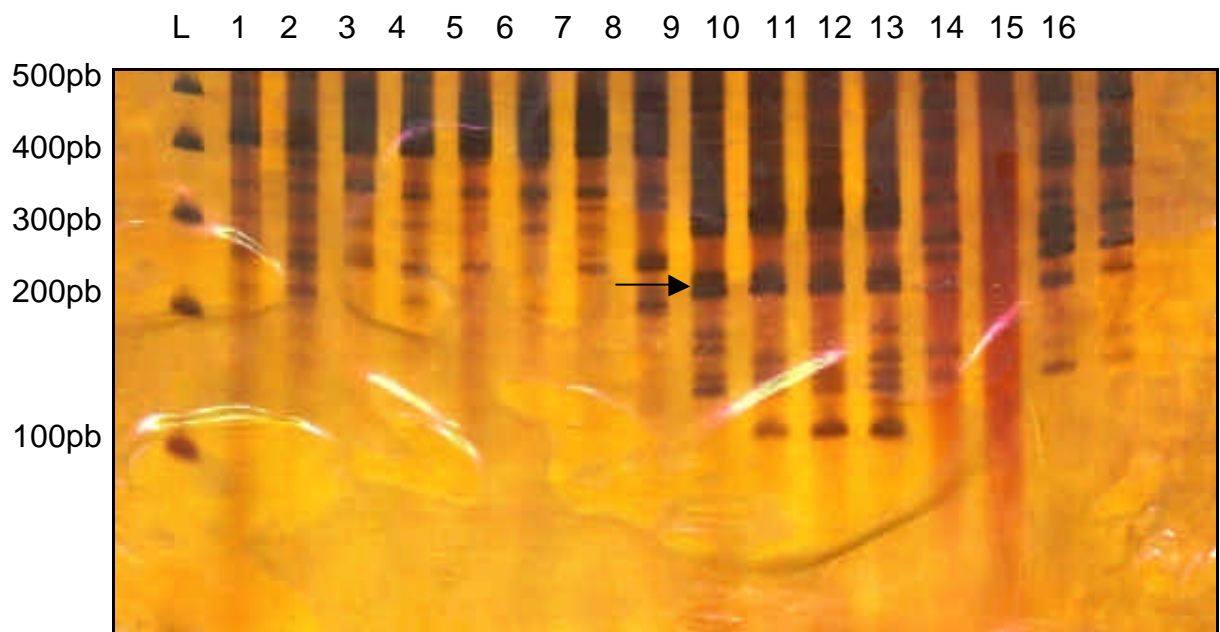


Figura 9: Perfil do gel de RAPD para o *primer* 11 de 16 indivíduos (8M e 8F) das espécies: ***Molossus molossus*** (colunas 1-4), ***Molossus rufus*** (colunas 5-8), ***Myotis nigricans*** (colunas 9-12) e ***Artibeus planirostris*** (colunas 13-16). A coluna L contém o padrão de peso molecular (100pb). A seta aponta para a banda do fragmento monomórfico de 226pb. M = macho, F = fêmea.

2. Similaridade Genética

Os resultados das análises da variação genética efetuadas pelos cálculos dos índices de diversidade gênica segundo Nei (1973), diversidade de Shannon (Lewontin, 1972), da identidade genética e da distância genética segundo Nei (1978) estão apresentados nas Tabelas 5 a 9 .

Pelo método de Nei (1973), a diversidade gênica pode ser analisada em seus dois componentes, ou seja, dentro e entre as populações e, a diversidade total da população é representada pela soma das duas.

No presente trabalho foram considerados os valores obtidos na análise da população, representada pelas sete espécies, e na análise das espécies separadamente.

O segundo índice de diversidade, o de Shannon, é mais geral. Ele leva em conta dois componentes, a riqueza e a uniformidade da amostra. Ao analisarmos a diversidade pelo programa Popgene, os dois índices são gerados simultaneamente.

Os valores médios da diversidade gênica (h) segundo Nei (1973) e Shannon (I) obtidos na análise dos 28 espécimes para cada *primer* estão apresentados na Tabela 5. Ao observarmos os valores podemos notar que eles correlacionam-se positivamente com os valores observados para as frequências relativas das bandas polimórficas, ou seja, quanto maior o número de polimorfismos, maior a diversidade

gênica. Entretanto, não necessariamente os *primers* com as maiores frequências polimórficas foram os que detectaram a maior diversidade (Tabelas 3 e 5). Os maiores valores de divergência genética foram observados para os primers 1,7,8,18 e 19.

Apesar da diversidade aplicando-se o índice de Shannon ter sido maior que a obtida por Nei, ela acompanhou este último.

Os valores médios da diversidade gênica das espécies avaliada pelos 741 loci também variaram (Tabela 6). A espécie com maior variação gênica foi *M. molossus*, seguida de *M. rufus*, *E. furinalis*, *A. planirostris*, *E. glaucinus*, *M. nigricans* e *E. perotis*. Observando novamente a Figura 3, vamos notar que a espécie *M. molossus*, além de ser a mais polimórfica é também a que apresenta a maior variação gênica. As outras cinco espécies variaram nos valores de polimorfismos e variabilidade gênica.

Quando consideramos as sete espécies juntas (população) observamos que a variação genética (gênica) sobe. Individualmente o maior valor de variação como vimos, foi observado em *M. molossus*, e foi de 0,146. No conjunto de espécies a variação alcançou o valor de 0,219 (Tabela 6).

Os índices de diversidade também foram calculados a partir dos resultados parciais considerando-se somente os dados de cinco *primers* mais polimórficos (1,2,7, 8 e 18). Juntos eles produziram 193 bandas (*loci*). A Tabela 7 apresenta os valores de diversidade obtidos.

Alguns valores foram superiores aos obtidos para a mesma espécie com os 20 *primers*, porém, outros foram menores. A espécie com maior variabilidade foi também *M. molossus*, seguida de *E. glaucinus*, *M. rufus* e *M. nigricans*, *E. perotis*, *E. furinalis* e *A. planirostris*. À exceção de *M. molossus*, todas as outras espécies diferiram quanto à situação de variabilidade (diversidade) em relação à variação detectada pelos 20 *primers*. Entretanto, a diversidade da população nas duas situações foi muito parecida (0,219 com os 20 *primers* e 0,251 com os cinco *primers* mais polimórficos).

As Tabelas 8 e 9 apresentam os resultados das comparações que permitiram determinar os valores de identidade e da distância genética entre as espécies nas duas situações analisadas, ou seja para os 20 *primers* (741 *loci*) e para os cinco *primers* mais polimórficos (193 *loci*).

Como pode ser notado, os valores de identidade genética entre as espécies, após a análise dos 741 *loci* foram altos e variaram de 0,937 (93,7%) a 0,819 (81,9%). O maior valor foi observado entre *E. glaucinus* e *A. planirostris*, e o menor entre *M. rufus* e *E. perotis*. Observe que para algumas espécies, a similaridade genética entre as espécies congênicas foi menor que para algumas espécies de gêneros diferentes.

A relação de proximidade entre as espécies, com base nas distâncias genéticas pode ser mais facilmente observada no

dendrograma da Figura 10. Note que as espécies foram divididas em dois grupos, um constituído unicamente pela espécie *E. perotis*, e outro maior, constituído pelas outras seis espécies. As espécies de *Molossus* foram agrupadas juntas, assim como *E. glaucinus* e *A. planirostris*, *E. furinalis* e *M. nigricans* foram colocadas em ramos separados, porém *E. furinalis* está mais próximo de *E. glaucinus* e *A. planirostris* que *M. nigricans*.

Quando foram considerados apenas os cinco *primers* mais polimórficos, os valores de identidade genética apresentaram algumas alterações (Tabela 9). Entretanto, o maior valor de identidade genética, observado entre as espécies *E. glaucinus* e *A. planirostris* (0,940) e o menor (0,754), observado para as espécies *M. rufus* e *E. perotis* foram identificados para as mesmas espécies nas duas situações, ou seja, com os 20 e com os cinco *primers* mais polimórficos.

Os agrupamentos determinados com base nas distâncias genéticas está apresentado na Figura 11. Da mesma forma que no agrupamento anterior, as espécies foram separadas parcialmente em dois grupos. Entretanto, os grupos estão constituídos diferentemente. Um deles é representado pelas espécies de *Molossus* e o outro, maior, pelas outras cinco espécies.

As espécies *M. nigricans* e *E. perotis* foram separadas das espécies *E. glaucinus*, *E. furinalis* e *A. planirostris*, e diferente da situação anterior, *A. planirostris* foi agrupado com *E. furinalis*.

E. glaucinus apesar de relacionado às duas últimas espécies, foi colocado em ramo separado.

Tabela 5. Valores médios da variação gênica (h) e do índice de Shannon (I) com base na análise dos loci produzidos pelas sete espécies (28 indivíduos) para os *primers* individuais.

Primer	h	I
1	0,208	0,347
2	0,245	0,394
3	0,168	0,290
4	0,211	0,346
5	0,186	0,316
6	0,237	0,381
7	0,245	0,401
8	0,319	0,490
9	0,188	0,317
10	0,234	0,381
11	0,237	0,380
12	0,228	0,367
13	0,196	0,326
14	0,152	0,277
15	0,204	0,346
16	0,264	0,423
17	0,222	0,360
18	0,207	0,347
19	0,208	0,346
20	0,214	0,357

Tabela 6. Espécies e valores médios da variação gênica (h) e do índice de Shannon (I) obtidos da análise dos 741 *loci*.

Espécie	h	I
<i>M. molossus</i>	0,146	0,222
<i>M. rufus</i>	0,133	0,205
<i>E. glaucinus</i>	0,106	0,219
<i>E. perotis</i>	0,083	0,184
<i>M. nigricans</i>	0,101	0,211
<i>E. furinalis</i>	0,108	0,165
<i>A. planirostris</i>	0,106	0,359
População	0,219	0,359

Tabela 7. Espécies e valores médios da variação gênica (h) e do índice de Shannon (I) obtidos da análise dos 193 *loci* detectados pelos cinco *primers* mais polimórficos.

Espécie	h	I
<i>M. molossus</i>	0,163	0,246
<i>M. rufus</i>	0,136	0,205
<i>E. glaucinus</i>	0,146	0,219
<i>E. perotis</i>	0,124	0,184
<i>M. nigricans</i>	0,136	0,211
<i>E. furinalis</i>	0,109	0,165
<i>A. planirostris</i>	0,097	0,149
População	0,251	0,401

Tabela 8. Identidade genética (valores representados acima da diagonal) e distância genética (valores representados abaixo da diagonal) segundo Nei (1978) entre as sete espécies, após a avaliação dos 741 *loci*.

Espécie	<i>M. m.</i>	<i>M. r.</i>	<i>E. g.</i>	<i>E. p.</i>	<i>M. n.</i>	<i>E. f.</i>	<i>A. p.</i>
<i>M. m.</i>	****	0,924	0,893	0,831	0,831	0,855	0,902
<i>M. r.</i>	0,079	****	0,888	0,819	0,842	0,860	0,915
<i>E. g.</i>	0,113	0,119	****	0,901	0,869	0,897	0,937
<i>E. p.</i>	0,186	0,199	0,104	****	0,825	0,853	0,860
<i>M. n.</i>	0,185	0,172	0,141	0,192	****	0,857	0,876
<i>E. f.</i>	0,147	0,151	0,109	0,159	0,155	****	0,916
<i>A. p.</i>	0,104	0,089	0,066	0,150	0,132	0,088	****

Tabela 9. Identidade genética (valores representados acima da diagonal) e distância genética (valores representados abaixo da diagonal) segundo Nei (1978) entre as sete espécies, após a avaliação dos 193 *loci* identificados por cinco *primers* mais polimórficos.

Espécie	<i>M. m.</i>	<i>M. r.</i>	<i>E. g.</i>	<i>E. p.</i>	<i>M. n.</i>	<i>E. f.</i>	<i>A. p.</i>
<i>M. m.</i>	****	0,907	0,853	0,792	0,783	0,849	0,885
<i>M. r.</i>	0,098	****	0,834	0,754	0,786	0,826	0,885
<i>E. g.</i>	0,159	0,182	****	0,918	0,866	0,924	0,937
<i>E. p.</i>	0,234	0,283	0,085	****	0,804	0,875	0,855
<i>M. n.</i>	0,244	0,241	0,144	0,218	****	0,866	0,845
<i>E. f.</i>	0,164	0,191	0,079	0,133	0,144	****	0,940
<i>A. p.</i>	0,122	0,122	0,065	0,157	0,169	0,061	****

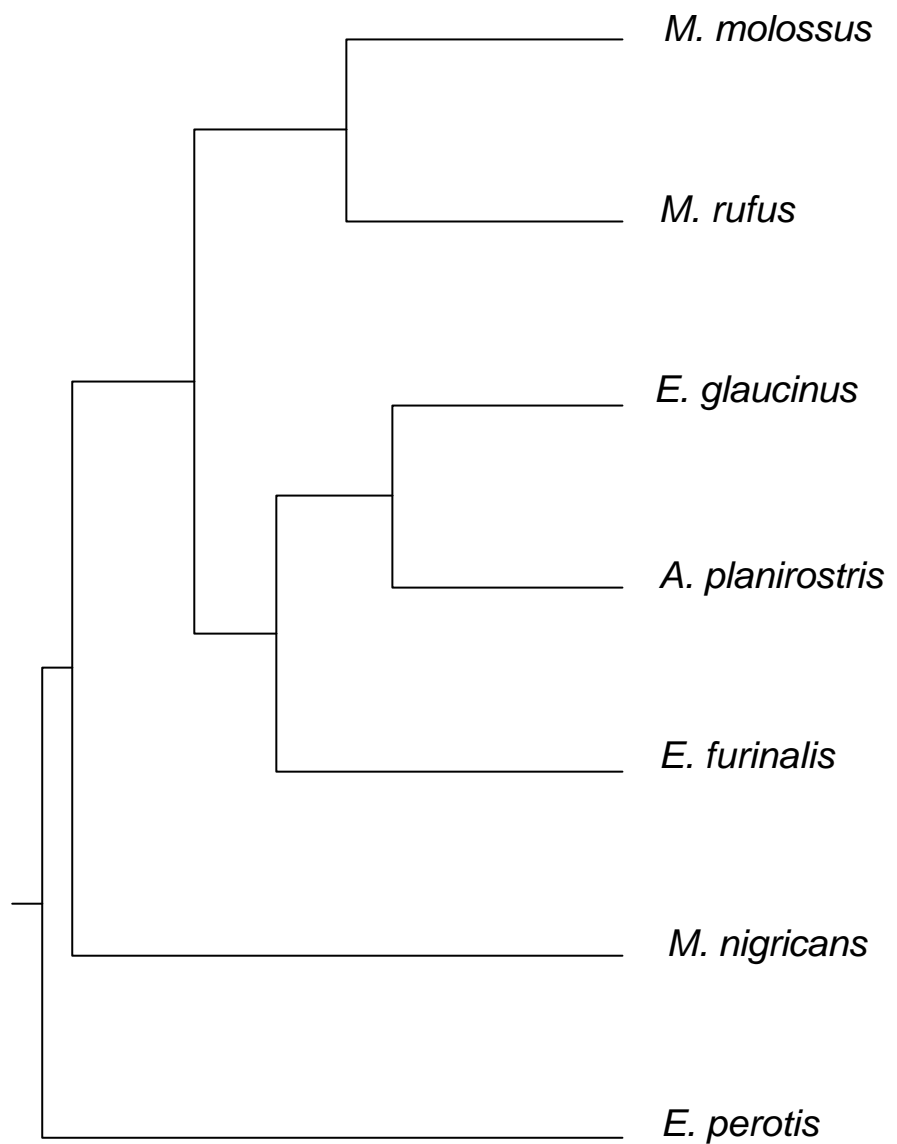


Figura 10. Dendrograma gerado pelo método UPGMA com base na distância genética de Nei (1978), calculada a partir da análise dos 741 *loci* das sete espécies estudadas.

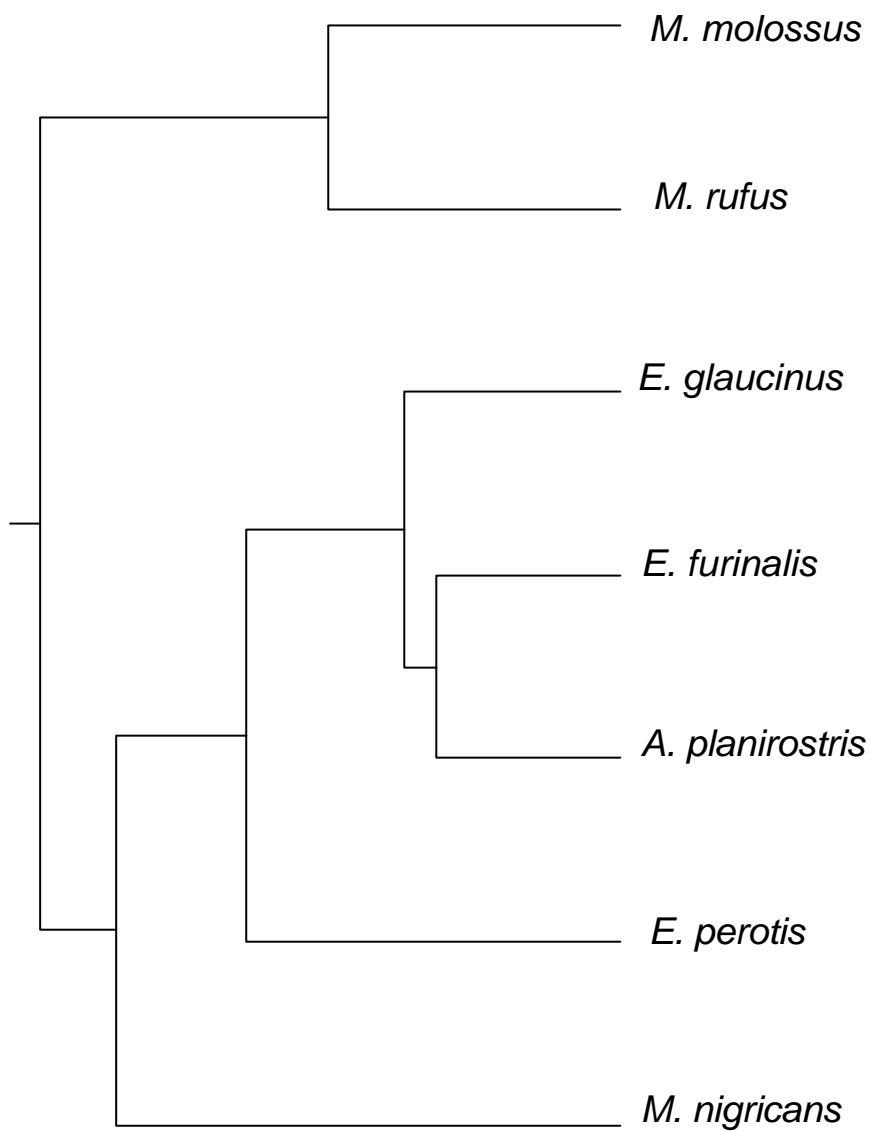


Figura 11. Dendrograma gerado pelo método UPGMA com base na distância genética de Nei (1978) calculada com base na análise dos 193 *loci* (cinco *primers* mais polimórficos)

3. Análise Filogenética

Na análise filogenética com base nos dados obtidos foram utilizados o algoritmos UPGMA e *Neighbor-joining* e aplicado o método de *bootstrap* (com 1000 réplicas). As análises foram baseadas nos dados dos 741 *loci*. Os resultados produziram as duas árvores filogenéticas mostradas nas Figuras 12 e 13.

a) Árvore UPGMA

A árvore gerada pelo método UPGMA foi semelhante à obtida na análise realizada através do programa Popgene. Esse fato era esperado pois a análise de agrupamento que aquele programa utiliza é baseada nas distâncias e no mesmo algoritmo.

Na análise efetuada pelo PAUP, pudemos testar o grau de confiabilidade da árvore através do *bootstrap*, cujos valores percentuais de cada nó interno estão mostrados nas Figura 12. Todos os valores foram superiores a 50%, sendo que o maior valor foi observado na posição dicotômica onde estão as espécies de *Molossus* (94%).

Observando a árvore pode ser notado que a espécie *E. perotis* representa o ramo mais periférico, sendo portanto, a mais diferenciada entre as espécies analisadas. Apesar de *M. nigricans* estar contida no nó que estão também as outras cinco espécies, ela é a mais

distante quando se comparam as seis espécies. A espécie *E. glaucinus* aparece mais proximamente relacionada a *A. planirostris* e *E. furinalis* do que a *E. perotis*. Estas últimas, embora próximas taxonomicamente, foram colocadas em ramos diferentes.

As espécies *M. molossus* e *M. rufus* estão muito próximas na filogenia, apresentando também uma maior proximidade com *E. glaucinus* do que com *E. perotis*.

b) Árvore Neighbor-joining

Na árvore gerada pelo método de neighbor-joining nenhum valor de *bootstrap* foi inferior a 59% (Figura 13). Nela as espécies de *Molossus*, apesar de próximas, apareceram como dois ramos periféricos distintos, diferentemente do observado na árvore UPGMA. Por outro lado, na posição de dicotomia dos ramos que agrupou as outras cinco espécies, o valor de *bootstrap* foi de 100%, indicando que essas espécies estão mais relacionadas evolutivamente do que com as espécies de *Molossus*. A árvore anterior havia separado as cinco espécies, ao nível do nó de dicotomia com o valor de *bootstrap* de 66%.

As duas espécies de *Eumops* estão proximamente relacionadas, assim como as duas espécies de vespertilionídeos, ou seja, *M. nigricans* e *E. furinalis* que compartilham o mesmo nó de dicotomia.

A espécie *A. planirostris* aparece, diferentemente ao observado na árvore anterior, mais distante de *E. glaucinus*, assim como das outras três espécies (*E. perotis*, *M. nigricans* e *E. furinalis*).

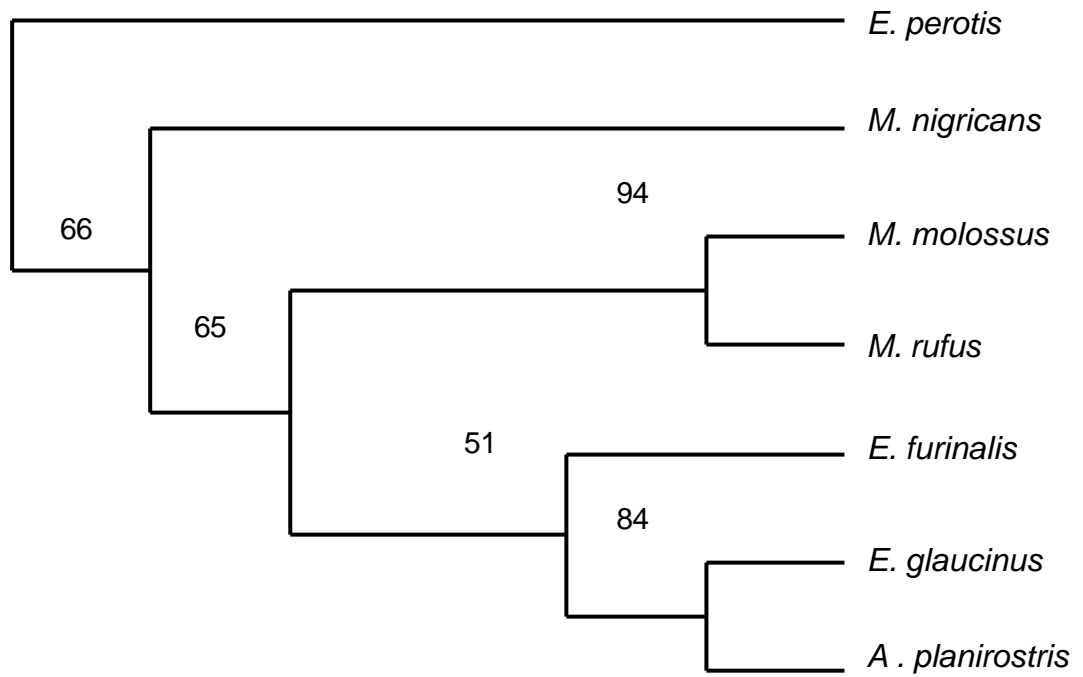


Figura 12. Árvore UPGMA com os valores de bootstrap, baseada na matriz de dados construída a partir dos 741 *loci* analisados.

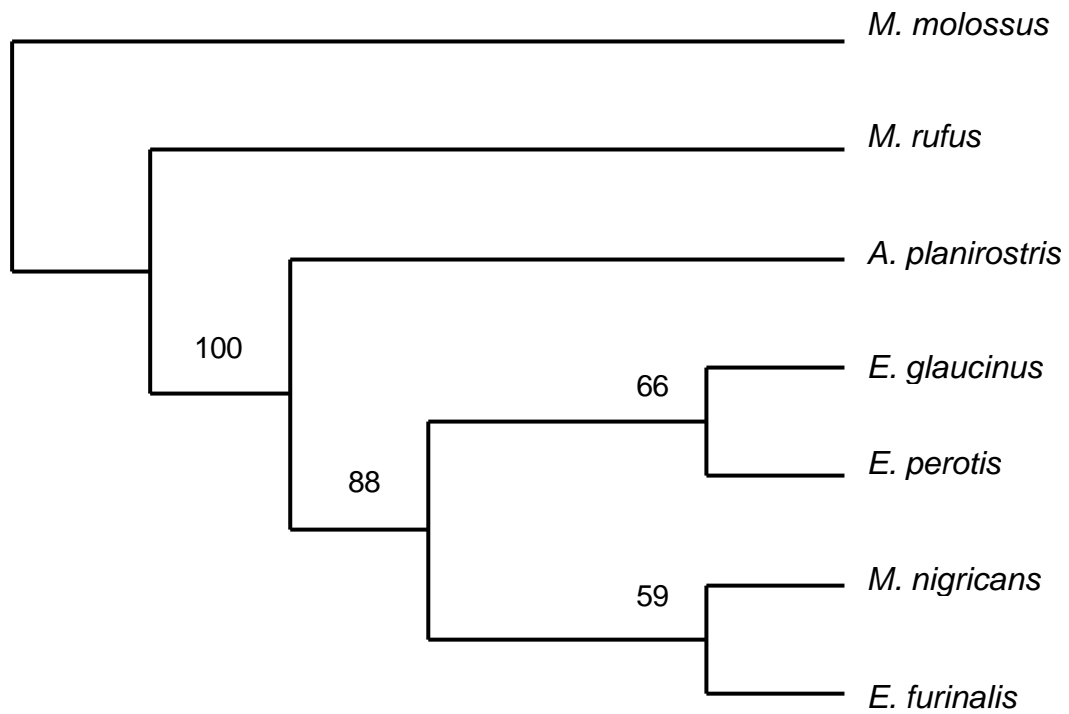


Figura 13. Árvore neighbor-joining com os valores de bootstrap, baseada na matriz de dados construída a partir dos 741 *loci* analisados.

4. Hibridação *in situ* Fluorescente

No experimento de hibridação foi avaliada a aplicação dos fragmentos (bandas) reconhecidos como espécie-específicos, como sondas em procedimentos de hibridação cromossômica e nuclear, e testada a especificidade das bandas.

Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 10, onde pode ser observado que foram avaliados todos os oito fragmentos monomórficos, ou seja, os fragmentos identificados pelos *primers* 2, 6, 8 e 11 em *M. nigricans* (fragmentos de 130, 150, 226 e 275 pb), pelos *primers* 4 e 6 em *M. molossus* (fragmentos de 133 e 485 pb), pelo *primer* 7 em *E. furinalis* (fragmento de 110 pb) e pelo *primer* 4 em *E. glaucinus* (fragmentos de 231 pb).

Após a reamplificação dos oito fragmentos na presença de um nucleotídeo marcado com biotina (Biotin -14- dATP Gibco brl) e posterior associação com outros dois tipos de DNA (de esperma de salmão e cot- 1 DNA Humano), os quais suprimem regiões de DNA repetitivo, o fragmento denominado sonda, foi hibridado aos cromossomos das preparações celulares das seis seguintes espécies: *E. glaucinus*, *E. perotis*, *M. rufus*, *A. planirostris*, *M. nigricans* e *E. furinalis*. Note pela Tabela 10, que as hibridações envolveram o uso da sonda sobre cromossomos metafásicos e núcleos da espécie que a originou, bem como de espécies diferentes.

Apesar do tamanho pequeno dos fragmentos, todos foram observados hibridados com o DNA nuclear e/ou dos cromossomos. Entretanto, as hibridações foram mais facilmente visualizadas no núcleos interfásicos. Com algumas variações, os sinais de hibridação apresentarem-se como uma pequena marcação fluorescente no interior dos núcleos e, sobre ou ao redor de alguns cromossomos nas metafases (Figuras 14 e 15). A marcação desaparecia rapidamente enquanto observada sob a luz ultra violeta, dificultando até mesmo o registro das imagens.

Como vimos, todos os fragmentos hibridaram com o DNA cromossômico ou nuclear, indicando que o método de detecção e preparação dos fragmentos produzidos por RAPD para utilização como sonda, tem aplicabilidade nos estudos de hibridação *in situ* fluorescente. Porém, também com base nestes resultados, pudemos observar que os fragmentos monomórficos reconhecidos como espécie-específicos no experimento de RAPD, não foram confirmados nesta condição no experimento de hibridação.

Nem todos os fragmentos foram testados para todas as situações, ou seja, a sonda ser aplicada sobre os cromossomos da espécie que a gerou, e sobre os cromossomos das outras espécies. Porém, nas três situações onde foi possível a utilização da sonda sobre os cromossomos da espécie que a gerou as hibridações foram positivas.

Tabela 10. Resultados das hibridações *in situ* fluorescentes com as sondas espécie-específicas aplicadas sobre os cromossomos e núcleos interfásicos de seis espécies.

Espécie	Sonda/primer	Preparação Cromos.	Resultado Núcleo Cromos.	
<i>M. nigricans</i>	130pb/primer 8	<i>E. glaucinus</i>	+	+
		<i>M. rufus</i>	+	-
	150pb/primer 6	<i>E. furinalis</i>	+	-
		<i>A. planirostris</i>	+	+
	226pb/primer 11	<i>A. planirostris</i>	+	+
		<i>M. nigricans</i>	+	+
275pb/primer 2	<i>E. furinalis</i>	+	-	
	<i>E. perotis</i>	+	-	
<i>M. molossus</i>	133pb/primer 6	<i>E. perotis</i>	+	-
		<i>E. glaucinus</i>	+	-
	485pb/primer 4	<i>A. planirostris</i>	+	+
<i>E. furinalis</i>	110pb/primer 7	<i>E. furinalis</i>	+	-
		<i>E. perotis</i>	-	-
		<i>E. glaucinus</i>	+	-
<i>E. glaucinus</i>	231pb/primer 4	<i>E. perotis</i>	+	-
		<i>E. glaucinus</i>	+	+

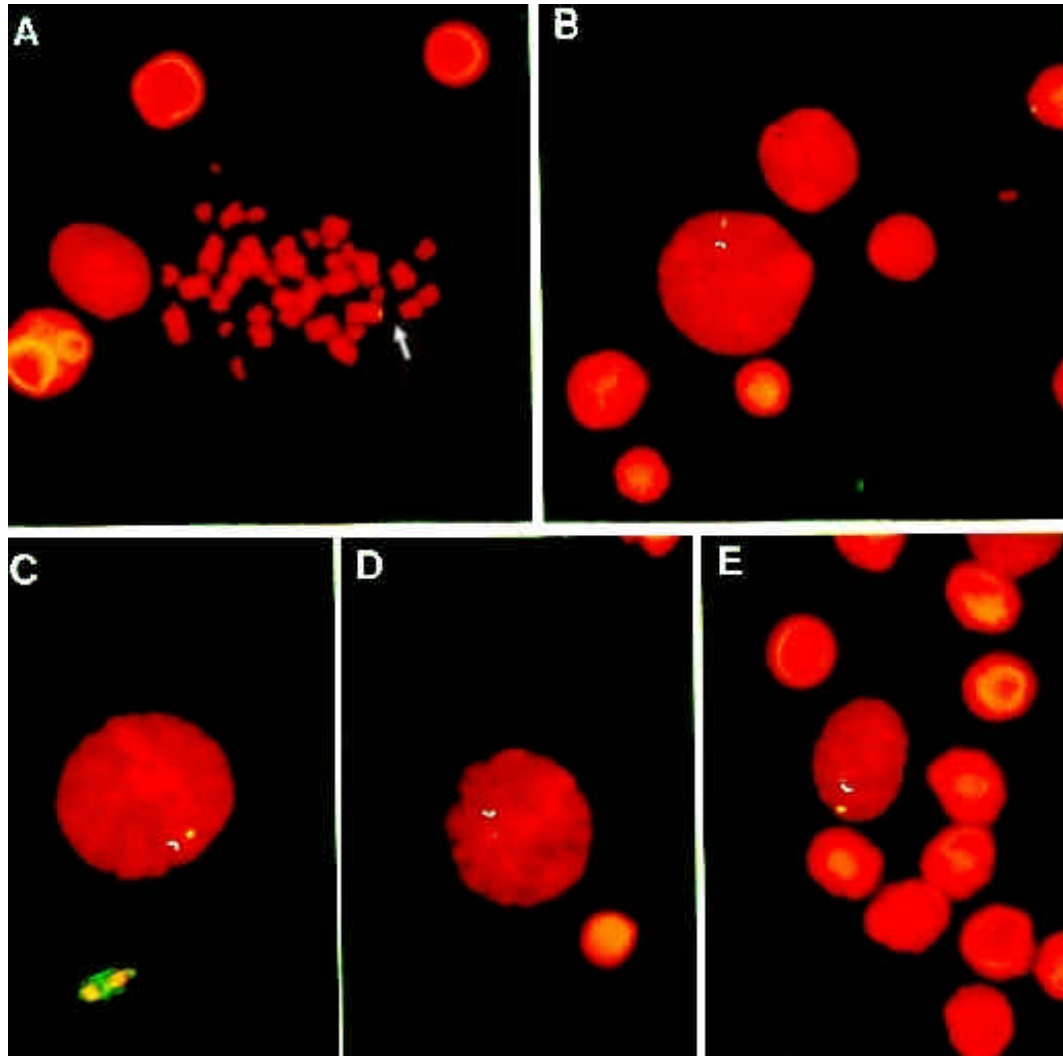


Figura 14. Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos e núcleos interfásicos de *E. glaucinus* com as sondas produzidas a partir das bandas monomórficas: A- 130 pb, B- 110 pb, C- 133 pb, D- 231 pb e E- 130 pb. As setas brancas apontam as marcações fluorescentes. Aumento 1000x.

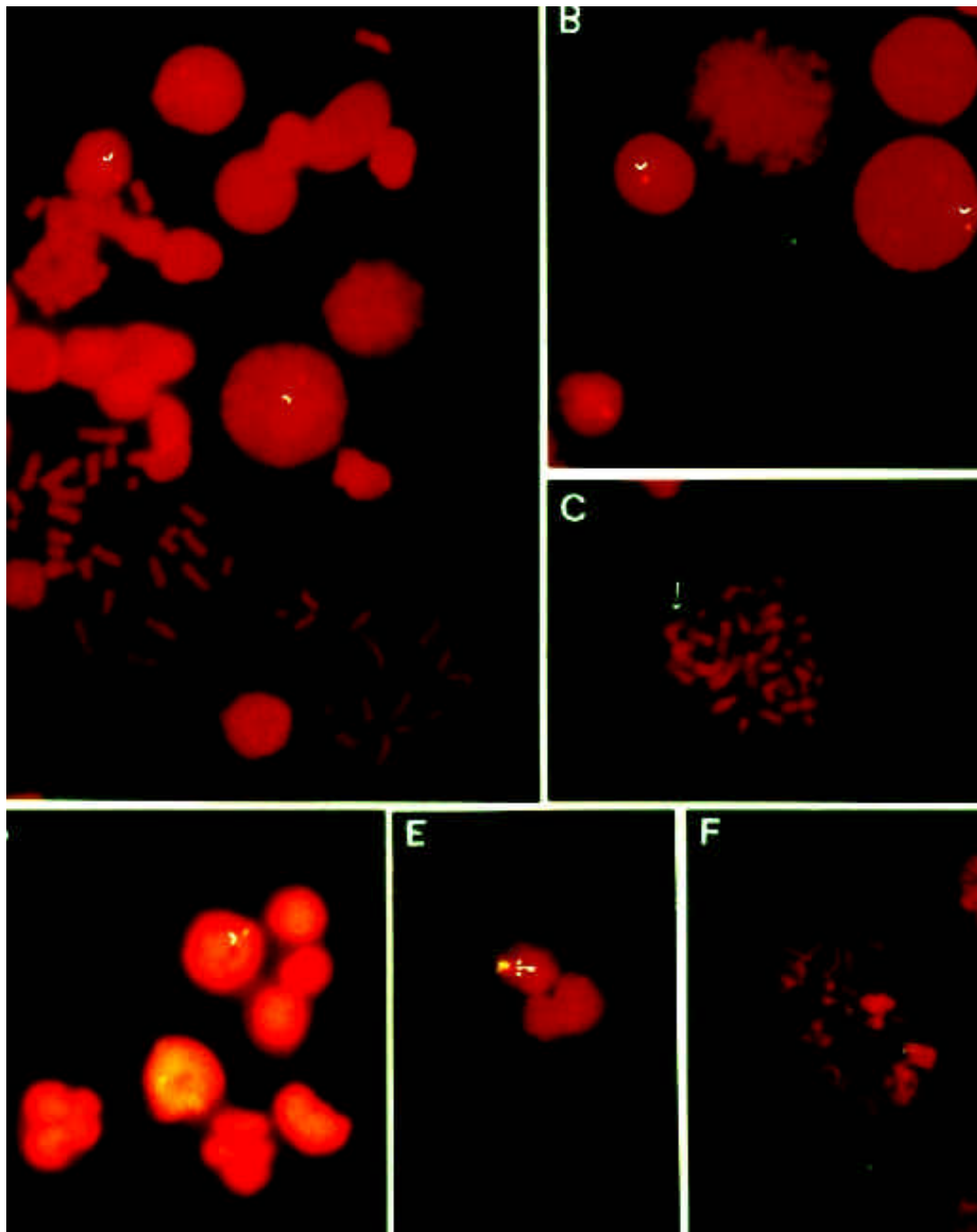


Figura 15. Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos e núcleos de *A. planirostris* com as sondas de 150 pb (A) e 485 pb (B e C), de *E. perotis* com a sonda de 275 pb (D), de *E. furinalis* com a sonda de 275 pb (E), e de *M. nigricans* com a sonda de 226pb (F). As setas brancas apontam as marcações fluorescentes.

V. DISCUSSÃO

Para o entendimento da evolução das espécies, a descrição da variação dentro e entre populações, e a habilidade para distinguir as causas potenciais da distribuição da variação observada são aspectos importantes e nem sempre determinados. Apesar de ser esta uma característica de fundamental importância nos estudos evolutivos, muitas vezes não é possível estimar a variação populacional representativa de uma determinada espécie. Situações como esta podem ser observadas em organismos onde o estudo de população é dificultado, como é o caso dos Chiroptera, representativos dos únicos organismos vertebrados mamíferos com capacidade de vôo e com hábitos noturnos e migratórios.

Pelos aspectos destacados acima, um estudo de populações de morcegos não é fácil de ser conduzido, portanto, pouco se conhece sobre a dinâmica dos genes nas populações (Burland & Wilmer, 2001).

Tendo em vista que o reconhecimento das espécies de Chiroptera tem sido feito basicamente através de análises de características morfológicas externas e cranianas, e pela dentição, e que há diferenças nessas características que são atribuídas a variação geográfica apenas, a identificação de um marcador que auxilie na identificação das espécies de modo prático e rápido, certamente facilitará os estudos taxonômicos comparativos e as interpretações evolutivas.

Os dados de literatura evidenciam que a técnica de RAPD e os resultados produzidos de sua aplicação, têm identificado um grande número de polimorfismos genéticos em várias espécies de vertebrados, e que quando analisados por métodos quantitativos e qualitativos apropriados, fornecem informações interessantes sobre a dinâmica de populações, bem como dos aspectos evolutivos (Almeida **et al.**, 2001, 2003; Dergan **et al.**, 2002; Prioli **et al.**, 2002). As informações obtidas têm sido particularmente importantes em grupos de animais com hábitos migratórios, em especial dos grandes mamíferos cetáceos, bem como em animais domésticos com elevado número de raças (Martinez & Pastene, 1999; Semyenova **et al.**, 2001).

Em alguns grupos de vertebrados, os marcadores RAPD tem propiciado a identificação de subespécies, dentro das espécies, permitindo até mesmo em algumas situações diferenciar espécies relacionadas taxonomicamente (Comincini **et al.**, 1996; Callejas & Ochando, 1998; Mamuris **et al.**, 1999; Echeverrigaray **et al.**, 2001).

Dada a ampla variação encontrada nas diferentes características que têm sido avaliadas para as espécies incluídas no presente estudo, e os aspectos ainda não esclarecidos dos relacionamentos taxonômicos e sistemáticos que as envolvem, o presente trabalho foi elaborado principalmente com a finalidade de avaliar o potencial taxonômico da técnica de RAPD para essas espécies de Chiroptera.

No presente estudo, cada unidade taxonômica representada por quatro indivíduos, foi considerada como representativa da variação de uma população daquela espécie e comparada com as demais. O número de indivíduos analisados pode não ter sido o apropriado, mas o número grande de *loci* obtidos nas amplificações deve ter minimizado os erros da amostragem.

A análise da variabilidade genética pela técnica de RAPD em 28 espécimes de morcegos, representantes de sete espécies e três famílias de Chiroptera, produziram um total de 741 bandas RAPD, com uma variação de 500 a 100 pares de bases de comprimento, bem como na intensidade.

O número de fragmentos observados foi relativamente alto quando comparado com os dados da literatura, o que pode ter sido devido aos critérios adotados no presente trabalho para a seleção de bandas, ao número de *primers* testados e, especialmente, ao método de separação dos fragmentos.

A maioria dos estudos com a técnica de RAPD utilizam o gel de agarose em concentração variável de 1,4 a 2,0% para a separação dos fragmentos amplificados. No presente estudo foi utilizado o gel de poliacrilamida. Apesar da facilidade de preparo e posterior visualização e registro das bandas, o número de bandas visíveis no gel de agarose é significativamente menor que os observados em géis de poliacrilamida. As diferenças têm sido interpretadas como sendo devidas

à resolução da malha produzida durante a polimerização dos dois compostos. O número elevado de bandas foi importante e deu consistência ao estudo efetuado, facilitando a interpretação dos resultados.

Uma das principais fontes de erro na análise dos dados gerados por RAPD, além do comportamento dominante dos marcadores, é o papel essencial da concentração de DNA na amostra, assim como do *primer*. Isto é decorrente da competitividade já demonstrada em alguns estudos, das bandas pelo mesmo ou diferentes *primers* (Hallden **et al.**, 1996). Este é um dos fatores que explicam as diferenças na intensidade das bandas que migram na mesma posição no gel, bem como é um dos responsáveis por cerca de 14% da variação observada como polimorfismos. Por isso, quanto maior o número de bandas analisadas menor deverá ser o erro de interpretação dos resultados

A importância de se basear as análises na combinação de diferentes *primers*, produzindo coletivamente um grande número de bandas foi discutida por Megnegneau **et al.** (1993). Segundo os autores, bandas similares em diferentes indivíduos podem ser causadas por fragmentos diferentes de DNA de mesmo tamanho, uma vez que a técnica não diferencia sequência. Portanto, a utilização de um grande número de bandas pode diluir os erros ocasionais de interpretação não afetando as conclusões gerais.

Em relação aos tamanhos dos fragmentos, em função das premissas estabelecidas para análise das bandas, assim como do gel escolhido, as bandas analisadas situaram-se no gel, na área que compreendia os fragmentos de 500 a 100 pb. Apesar de serem relativamente pequenos quando comparados com os tamanhos dos fragmentos observados e analisados em outros trabalhos de RAPD, em função do grande número de bandas produzidas pelo método, o observador pode selecionar aquelas que são mais robustas (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A análise dos números e frequências de bandas polimórficas nas diferentes espécies mostrou que houve diferença na detecção de polimorfismos pelos diferentes *primers*, bem como houve diferenças nas frequências de polimorfismos entre as diferentes espécies. Dos vinte *primers* utilizados 14 deles produziram um número de bandas polimórficas superior a 30%.

A diferença na detecção de polimorfismos deve-se, principalmente, à diferenças nas sequências dos *primers* e no DNA da amostra e, à especificidade do *primer* pelas sequências a serem amplificadas (homologias) (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Em relação às espécies, as duas mais polimórficas foram *M. molossus* (43%) e *M. nigricans* (40,1%). Contudo, essas não ultrapassaram 50%. A espécie menos polimórfica foi *E. perotis* (23,1%) e,

as outras quatro espécies tiveram uma frequência de polimorfismos entre 28,5 e 32,9% .

A avaliação do polimorfismo de DNA produzido por RAPD nos indivíduos analisados pôde mostrar uma variabilidade maior que alguns marcadores cromossômicos. A similaridade na morfologia e padrões de bandas cromossômicas entre diferentes táxons é uma característica de Chiroptera (Warner **et al.**, 1974; Bickham, 1979; Varella-Garcia **et al.**, 1989; Volleth & Heller, 1994; Morielle-Versute **et al.**, 1996).

Os polimorfismos cromossômicos são muito raros, havendo poucos estudos que referem a sua ocorrência. Quando são detectados eles relacionam-se a variação na quantidade da heterocromatina constitutiva ou a pequenas diferenças na posição do centrômero, indicando a ocorrência de pequenas inversões pericêntricas (Warner **et al.**, 1974; Baker **et al.**, 1985).

Com relação às espécies analisadas, as de *Molossus* em particular, além de serem morfologicamente semelhantes, apresentam cariótipos e padrões de bandas cromossômicas idênticos (Morielle-Versute **et al.**, 1996). Porém, já as duas espécies de *Eumops*, ou seja *E. glaucinus* e *E. perotis* têm cariótipos diferentes. Aparentemente, a variabilidade que caracteriza o gênero também ocorre nos cariótipos. Pelo menos três das nove espécies do gênero têm cariótipos diferenciados (Warner **et al.**, 1974; Morielle **et al.**, 1988; Morielle-Versute **et al.**, 1996; Trierveiler **et al.**, 2002). Interessante porém, é o fato de que

o cariótipo de *E. perotis* é muito semelhante ao das espécies *M. molossus* e *M. rufus* (Morielle-Versute **et al.**, 1996). *E. perotis* foi das sete espécies, como vimos, a menos polimórfica.

O conservacionismo cariotípico também é característico das espécies de *Myotis* (Bickham, 1979; Bickham **et al.**, 1986). Porém, quando são observadas as espécies de *Eptesicus*, uma variação nos cariótipos pode ser notada, especialmente entre as espécies de diferentes continentes (Willians, 1978; Freitas **et al.**, 1992).

Diferentemente das bandas polimórficas, as bandas presentes exclusivamente nos quatro indivíduos de apenas uma das setes espécies, foram consideradas monomórficas, reconhecidas como espécie-específicas. Nesta condição foram observadas oito bandas. Bandas espécie-específicas já foram detectadas em experimentos RAPD em alguns grupos de vertebrados e foram importantes para o reconhecimento dessas espécies (Comincini **et al.**, 1996; Callejas & Ochando, 1998; Mamuris **et al.**, 1999; Echeverrigaray **et al.**, 2001).

Contudo, com base nos resultados do presente estudo, esses oito fragmentos exclusivos observados somente nos quatro indivíduos de quatro espécies (*M. molossus*, *M. nigricans*, *E. furinalis* e *E. glaucinus*), não foram espécie específicos quando hibridados aos cromossomos das outras espécies. Todos os fragmentos utilizados como sonda sobre os cromossomos e núcleos da espécie que o gerou e das outras espécies hibridaram ao DNA cromossômico e/ou nuclear.

Os estudos que envolvem a comparação de bandas geradas pelos experimentos Ap-PCR ou RAPD têm a suposição de que as bandas de mesmo tamanho e posição no gel são homólogas. Esta suposição está correta e aplica-se quando os táxons estudados são proximamente relacionados mas, é menos provável quando os táxons são distanciados (gêneros diferentes). Tanto a suposição de homologia como a especificidade da banda pode ser testada por experimentos de hibridação.

Alguns estudos têm confirmado a similaridade entre fragmentos de DNA que co-migram nos géis, de forma que isso tem sido aceito como uma premissa de forma geral (Espinosa & Borowsky, 1998).

Contudo, Espinosa & Borowsky (1998), através da técnica de RAPD e de *Southern blot* verificaram que quando os produtos de amplificação de um dado táxon foram utilizados como sonda sobre os produtos de amplificação do mesmo táxon, as bandas exibiram um forte sinal de hibridação. Porém, quando as sondas foram aplicadas sobre os fragmentos de um táxon diferente, poucas bandas marcaram, e a intensidade de marcação foi menor. Os autores atribuíram esses resultados a diferenças nos sítios de ligação para o *primer*, bem como nas sequências de DNA.

Estes mesmos autores verificam também, que uma pequena fração de produtos amplificados utilizados como sondas hibridaram com fragmentos que estavam na mesma posição na

membrana de hibridação dos diferentes táxons, mas que não haviam sido visualizadas no gel pelo brometo de etídeo. Portanto, estes resultados poderiam explicar os obtidos em nosso estudo de hibridação *in situ* fluorescente.

Provavelmente, os fragmentos monomórficos no experimento RAPD não foram visualizados no gel das outras espécies por não terem sido corados pelo nitrato de prata, ou por algumas das razões responsáveis pelos erros nas interpretações a que os experimentos de RAPD estão sujeitos (competitividade das bandas pelo *primer*, concentração de DNA e *primer*, hetero ou homozigossidade da banda, entre outras).

Apesar da pouca intensidade do sinal fluorescente observado, do pouco tempo de fluorescência, e dos resultados não terem confirmado a especificidade da sonda, pudemos confirmar a aplicabilidade da utilização dos fragmentos gerados por RAPD como sondas em experimento de hibridação *in situ* fluorescente. O sinal fraco provavelmente foi devido ao tamanho pequeno dos fragmentos, que não puderam incorporar em grande quantidade o nucleotídeo marcado.

A presença de variabilidade dentro da espécie (entre populações e entre os indivíduos das populações) e entre espécies é essencial para a sobrevivência e o sucesso frente as mudanças ambientais. Contudo, para o reconhecimento dos limites de variação de uma espécie é preciso a caracterização das mesmas quanto a diferentes

aspectos, principalmente aqueles onde ela pode ser mais facilmente observada.

Quando foram efetuados os cálculos dos índices de diversidade genética entre as espécies, os quais utilizaram todas as informações geradas pelos diferentes *primers* e indivíduos, observamos que nem sempre a espécie mais polimórfica é a que apresenta a maior diversidade. A espécie *M. molossus* foi a mais polimórfica e a mais variável geneticamente. Porém, não foi *M. nigricans* a segunda mais diversificada. Esta posição foi ocupada por *M. rufus*, que foi a sexta mais polimórfica.

Da mesma forma que o observado com os polimorfismos, houve diferença na detecção da variabilidade pelos diferentes *primers*. Quando foram consideradas todas as bandas produzidas pelos 28 indivíduos para cada *primer*, os maiores índices de diversidade foram registrados para os *primers* 8, 16, 7, 2, 6 e 11.

De forma geral, quanto mais polimorfismos, maior a variabilidade genética, mas não necessariamente, é maior a diversidade genética da população.

Os valores de diversidade obtidos a partir de cinco *primers* mais polimórficos apresentaram pequena variação em relação aos dados dos 741 *loci*, indicando que a análise considerando todos os 20 *primers*, apesar das diferenças nas frequências de polimorfismos é representativa da variação da população analisada.

Perda ou ausência de variabilidade podem ter diferentes significações. Os poucos estudos de marcadores moleculares em populações de morcegos têm mostrado que a estrutura genética tem padrões diferentes se as espécies analisadas são sedentárias ou altamente migratórias. Em geral, nas espécies migratórias a população é pouco estruturada geneticamente, enquanto que nas espécies sedentárias ele é mais complexo (Burland & Wilmer, 2001).

Os valores de similaridade e distância genética obtidos com base nos dados dos 20 *primers* variaram de 0,937 (93,7%) a 0,819 (81,9%) para a similaridade e de 0,066 (6,6%) a 0,199 (19,9%) para a distância. A maior similaridade e conseqüentemente, a menor distância, foi observada entre as espécies *E. glaucinus* e *A. planirostris* e, a menor similaridade e maior distância entre as espécies *M. rufus* e *E. perotis*. Apenas *A. planirostris*, pertence a família diferente das outras três espécies. Os valores observados foram semelhantes aos obtidos para algumas espécies de morcegos, analisadas com base na sequência do gene citocromo B (Bradley & Baker, 2001).

Esses índices de similaridade genética (valores de identidade genética e da distância genética) obtidos a partir dos dados dos 20 *primers*, e o dendrograma produzido no agupamento por UPGMA, através do programa Popgene, seguiram a mesma sequência de proximidade mostrada na árvore filogenética gerada por UPGMA após *bootstrap* (com 1000 réplicas), a partir do programa PAUP.

A confiabilidade dos resultados pode ser observada pela obtenção de uma só árvore e pelos valores de *bootstrap*, superiores a 50%. Já a análise por Neighbor-joining, também com um *bootstrap* de 1000 réplicas, gerou uma árvore com agupamento diferente do anterior. Os dois agrupamentos podem ser interpretados com base nos resultados obtidos no presente trabalho e em outros obtidos em diferentes estudos.

Apesar de estarem agrupados taxonomicamente na mesma família, as espécies de *Eumops* comportaram-se diferentemente das outras duas espécies de molossídeos (*M. molossus* e *M. rufus*). Os resultados das análises de similaridade genética mostraram que os indivíduos da espécie *E. glaucinus* estruturam-se geneticamente mais próximos aos indivíduos de *A. planirostris*, do que aos indivíduos da espécie congênica *E. perotis*. Interessantemente e diferente ao observado nas espécies de *Molossus*, *E. glaucinus* e *E. perotis* apresentam cariótipos e padrões de bandas distintos (Morielle-Versute **et al.**, 1996) e, apesar de compartilharem homologias cromossômicas com *A. planirostris*, seus cariótipos estão estruturalmente organizados de forma diferente (Faria, 2003).

A taxonomia do gênero *Eumops* reconhece para *E. glaucinus*, duas sub-espécies: *E. g. glaucinus* e *E. g. floridanus*, e pela variação que apresentam tem sido considerada por alguns autores, como uma espécie politípica (Eger, 1977). Os valores de diversidade observados para ela foram semelhantes aos observados em outras

espécies, contudo, ela está geneticamente estruturada mais proximamente a *A. planirostris*, que à outras espécies do gênero (*E. perotis*) e da família (*M. rufus* e *M. molossus*). *E. perotis* é facilmente distinguida de *E. glaucinus* por características morfológicas e cromossômicas. Sua identificação é dificultada quando é comparada com as formas da espécie *E. dabbnei*, que também ocorre no Brasil. *E. glaucinus* é morfológicamente semelhante a *E. auripendulus*, para a qual também são reconhecidas duas subespécies.

Estes dados evidenciam a necessidade de uma melhor caracterização das espécies de *Eumops* para facilitar o reconhecimento das diferentes espécies. Esse comportamento de *E. glaucinus*, ou seja relacionar-se morfológica, anatômica e cromossômicamente com espécies de outros gêneros, também foi observada por Gregorin (2003), ao analisar caracteres morfológicos da língua de várias espécies, evidenciado que as espécies de *Eumops* apesar de estarem incluídas no mesmo táxon, têm estratégias evolutivas diferentes.

A relação de proximidade mostrada pelas duas árvores para espécies de *Molossus* era esperada e também evidenciam que, *M. molossus* e *M. rufus* apresentam diferenças quanto a variação genética, que foi maior na espécie *M. molossus*. As duas espécies são distinguidas taxonomicamente pelo tamanho. *M. molossus* é uma das menores espécies de *Molossus*. As dificuldades na sua identificação ocorrem quando têm que ser comparada com *M. currentium*, uma outra

espécie pequena que ocorre no Brasil (Gregorin & Taddei, 2002). *M. rufus* é uma forma grande, para qual a dificuldade de identificação ocorre quando é comparada com formas da espécie *M. pretiosus*, para a qual foi feito recentemente o primeiro registro no Brasil (Gregorin & Taddei, 2000).

Em relação às espécies *M. nigricans* e *E. furinalis*, muito pouco pode ser discutido, pois são espécies taxonomicamente distintas. Apesar de *Myotis* ser um dos gêneros mais diversificados de Chiroptera, eles apresentam como já destacado, um conservacionismo cromossômico muito grande, similaridades morfológicas e ecológicas (Bickham, 1979; Ruedi & Mayer 2001). Geneticamente ele comportou-se como *E. perotis*, sendo colocado muito próximo à este nas duas árvores. Sua proximidade em relação à outra espécie de vespertilionídeo, *E. furinalis* reforça o seu relacionamento evolutivo e taxonômico com esta última.

Em relação a *E. furinalis*, o fato de ter sido agrupado com as outras duas espécies mais diferenciadas geneticamente (*E. glaucinus* e *A. planirostris*) reforça e está de acordo com outros dados da literatura, em especial os cromossômicos que também têm mostrado variação para o gênero (Willians, 1978; Freitas *et al.*, 1992).

A espécie *A. planirostris* mostrou que ela varia como outras espécies de morcegos de famílias diferentes, mas que a variação é semelhante à observada nos gêneros com grande complexidade

taxonômica. As espécies do gênero *Artibeus* são incluídas na tribo Stenodermatinae de Phyllostomidae. A sistemática do complexo de espécies da tribo aliada à complexidade do gênero *Artibeus* tem gerado várias hipóteses de relacionamento evolutivo para os Stenodermatinae (Van den Bussche, 1993). De forma geral, elas são conflitantes e envolvem primariamente o reconhecimento das espécies do gênero *Artibeus* e de alguns subgêneros, reconhecidos por alguns autores como gêneros e espécies distintas de *Artibeus*.

No Brasil, quatro espécies de grandes *Artibeus* já foram registradas: *A. fimbriatus*, *A. obscurus*, *A. planirostris* e *A. lituratus*. Essas espécies são de difícil identificação, ocorrem em simpatria em algumas regiões e, particularmente, *A. planirostris* (ou *A. jamaicensis*) apresenta considerável variação geográfica (Taddei **et al.**, 1998). Apesar de Taddei **et al.** (1998) terem estudado os limites de variação para representantes dessas espécies de diferentes regiões brasileiras, ajudando a melhor caracterização das mesmas, uma identificação segura é ainda duvidosa. Uma análise de marcadores nas outras três espécies de *Artibeus*, poderiam dar maiores indicações de como elas variam com relação à espécie *A. planirostris* analisada no presente trabalho.

Estes resultados mostram que a dinâmica ao nível gênico pode ser diferente da de outros marcadores convencionais, evidenciando situações ou dando indicações de que os indivíduos de uma determinada espécie estão sob ou em diferentes condições adaptativas,

que podem estar se refletindo em outros caracteres cujos resultados apresentam difícil interpretação. Os dados apresentados de RAPD para as espécies de *Eumops* e *Molossus* constituem uma evidência muito boa de que existe uma vasta reserva de polimorfismo nuclear segregando diferentemente nas populações dessas espécies e que são eles os responsáveis pela dificuldade na caracterização das espécies que compõem os gêneros.

Embora o presente estudo não tenha encontrado um marcador que pudesse diferenciar as espécies, ele forneceu indicações de que como em outros grupos de mamíferos, a variabilidade genética está presente em diferentes proporções nas espécies de Chiroptera, e é a responsável pela variação observada em outros caracteres utilizados para a caracterização das espécies, indicando que os estudos no nível genético-molecular nessas e em outras espécies de Chiroptera devam ser continuados e aprofundados para a melhor compreensão da dinâmica evolutiva das espécies.

As bandas monomórficas não foram confirmadas como espécie-específicas nos experimentos de hibridação. Porém, foi confirmada a aplicabilidade dos fragmentos produzidos por RAPD como sondas em procedimentos de hibridação *in situ* fluorescente.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. S.; FUNGARO, F. S.; SODRÉ, L. M. K. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfishes (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi river, Brazil. **J. Zool.**, v. 253, p. 113-120, 2001.

ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K.; CONTEL, E. P. B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema rivers (Brazil). **Gen. Mol. Biol.**, v. 26, n. 3, p. 301-305, 2003.

BAKER, R.J.; BICKHAM, J. W.; ARNOLD, M. L. Chromosomal evolution in *Rhogeessa* (Chiroptera, Vespertilionidae): possible speciation by centric fusions. **Evolution**, v. 39, p. 233-243, 1985.

BAKER, R. J.; HOD, C. S.; HONEYCUTT, R. L. Phylogenetic relationships and classification of the higher categories of the New World bat family Phyllostomidae. **Syst. Zool.**, v. 38, p. 228-238, 1989.

BAKER, R. J.; NOVACEK, M. J.; SIMMONS, N. B. On monophyly of bats. **Syst. Zool.**, v. 40, p. 216-231, 1991.

BAKER, R. J.; PATTON, J. C.; PORTER, C. A.; VAN DEN BUSSCHE, R. A. Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. **Occas. Pap. Mus.** Of Texas Tech University, n. 202, 2000

BICKHAM, J. W. Banded karyotypes of 11 species of American bats (Genus *Myotis*). **Cytologia**, v. 44, p. 789-797, 1979.

BICKHAM, J. W.; BICKHAM, J. W. Implications of chromosomal variation in *Rhogeessa* (Chiroptera: Vespertilionidae). **J. Mammal**, v. 58, p. 448-453, 1977.

BICKHAM, J. W.; MCBEE, K.; SCHLITTER, D. A. Chromosomal variation among seven species of *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae). **J. Mamm.**, v. 67, p. 746-750, 1986.

BICKHAM, J. W.; HONEYCUTT, R. L.; VAN DEN BUSSCHE, R. A. Examination of the monophyly of bats: restriction map of the ribosomal DNA cistron. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 206, p. 1-432, 1991.

BURLAND, T. A.; WILMER, J. W. Seeing in the dark: molecular approaches to the study of bat populations. **Biol. Rev.**, v. 76, p. 389-409, 2001.

CALLEJAS, C.; OCHANDO, M.D. Identification of spanish barbel species using the RAPD technique. **J. Fish Biol.**, v. 53, p. 208-215, 1998.

COMINCINI, S.; BANDI, C.; FONTANA, F.; GIUNTA, C.; RUBINI, M. RAPD analysis of systematic relationships among the Cervidae. **Heredity**, v. 76, p. 215-221, 1996.

DERGAN, J. A.; PAIVA, S. R.; SCHAEFFER, C. E.; GODINHO, A. L.; VIEIRA, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Gen. Mol. Biol.**, v. 25, n. 4, p. 379-387, 2002.

DOLAN, P. G. Systematics of Middle American mastiff bats of the genus *Molossus*. **Spec. Publ. Mus. Texas Tech Univ.**, v. 29, p. 1-71, 1989.

ECHEVERRIGARAY, S.; AGOSTINI, G.; GRAZZIOTIN, F.; GRAZZIOTIN, G. Random amplified polymorphisms between two south american subspecies of rattlesnakes (*Crotalus durissus collilineatus* and *Crotalus durissus terrificus*). **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 44, n. 3, 2001.

EGER, J. L. Systematics of the genus *Eumops* (Chiroptera: Molossidae). **Life Sci. Contrib. : Royal Ontario Museum**, n. 110, p. 1-69, 1977.

ESPINOSA, L.; BOROWSKY, R. Evolutionary divergence of AP-PCR (RAPD) patterns. **Mol. Biol. Evol.**, v. 15, n. 4, p. 408-414, 1998.

FARIA, K.C. **Análise citogenética comparativa em espécies de morcegos dos gêneros *Molossus* (Molossidae), *Artibeus*, *Platyrrhinus*, *Sturnira*, *Glossophaga*, *Phyllostomus* e *Carollia* (Phyllostomidae) – Chiroptera (Mammalia)**. 2003. (113 f). Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, pp. 220, 1996.

FREEMAN, P. W. A multivariate study of the family Molossidae (Mammalia, Chiroptera): morphology, ecology, evolution. **Fieldiana Zool.**, v. 7, p. 1-1973, 1981.

FREITAS, T.R.; BOGO, M. R.; CHRISTOFF, A. U. R. G-, C-bandas and NOR studies in two species of bats from southern Brazil (Chiroptera: Vespertilionidae, Molossidae). **Z. Saugetierkunde**, v. 57, p. 330-334, 1992.

GARCIA, A. L.; CCARRASCO, H. J.; SCHOFIELD, C. J.; STOTHARD, J. R.; FRAME, I. A.; VALENTE, S. A. S.; MILES, M.A. Random amplified polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). **J. Med. Entomol.**, v. 35, n. 1, p. 38-45, 1998.

GIMENEZ, E. A.; FERRAREZZI, H.; TADDEI, V. A. Lingual morphology and cladistic analysis of the New World Nectar – feeding bats (Chiroptera: Phyllostomidae). **J. Comp. Biol.**, v. 1, p. 41-64, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*, using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. **Genetics**, v. 137, p. 1121-1137, 1994.

GREGORIN, R. Comparative morphology of the tongue in free-tailed bats (Chiroptera, Molossidae). **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, v. 93, n. 2, p. 213-221, 2003.

GREGORIN, R.; MENDES, L. F. Sobre quirópteros (Emballoniridae, Phyllostomidae, Natalidae) de duas cavernas da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, v. 86, p. 121-124, 1999.

GREGORIN, R.; TADDEI, V. A. New records of *Molossus* and *Promops* from Brazil (Chiroptera: Molossidae). **Mammalia**, v. 64, p. 471-476, 2000.

GREGORIN, R.; TADDEI, V. A. Chave artificial para a identificação de molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). **J. Neotrop. Mammal.**, v. 9, p. 13-32, 2002.

HANDLEY, C. O. Jr. Checklist of mammals. In: WENZEL, R. L.; Triptom, V. P. (Ed.). Ectoparasites of Panama Chicago, Field Mus.Nat. Hist., 1966. p. 753-793.

HADRYIS, H.; BALCIK, M.; SCHIERWATER, B. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Mol. Ecol.**, v. 1, p. 55-63, 1992.

HALLDEN, C.; HANSEN, M.; HJERDIN, A.; NILSSON, N. O. Competition as a source of errors in RAPD analysis. **Theor. Appl. Genet.**, v. 93, p. 1185-1192, 1996.

HALWRD, T. M.; STALKER, H. T.; LA RUE, E. A.; KOCHERT, G. Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant. Mol. Biol.**, v. 18, p. 315-325, 1992.

JONES, J. K.; GENOWAYS, H. H. Chiropteran Systematics. In: SLAUGHTER, B. H., WALTON, D. W. (Ed.) **About bats**. a Chiropteran symposium. Dallas: Southern Methodist University Press, 1970. 339 p.

JONES, J. K.; SMITH, J. D.; TURNER, R. W. Noteworthy records of bats from Nicaragua, with a checklist of the chiropteran fauna of the country. **Occas. Pap. Mus. Nat. Hist.** Univ. Kansas, v. 2, p. 1-35, 1971.

JONES, K. E.; PURUIS, A.; MACLARNON, A.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; SIMMONS, N. B. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). **Biol. Ver.**, v. 77, p. 223-259, 2002.

KOOPMAN, K. F. Order Chiroptera. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Ed). **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Washington: Smithsonian Institution, 1993. 1206 p.

LIM, B. K.; WILSON, D. E. . Taxonomic status of *Artibeus amplus* (Chiroptera: Phyllostomidae) in Northern South America. **J. Mamm.**, v. 74, p. 763 – 768, 1993.

LYNCH, M.; MLLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Mol. Ecol.**, v. 3, p. 91-99, 1994.

MARILLIA, E. F.; SCOLES, G. J. The use of RAPD markers in *Hordeum phylogeny*. **Genome**, v. 39, p. 646-654, 1996.

MARTINEZ, I.; PASTENE, L. A. RAPD-typing of central and eastern North Atlantic and western North Pacific minke whales, *Balaenoptera acuntorostrata*. **J. Mar. Aci.**, v. 56, p. 640-651, 1999.

MEUNIER, J. R., GRIMONT, P. A. D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Res. Microbio.**, v. 144, p. 373-379, 1993.

MILACH, S. C. K. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: YFRGS, 1998. 141p.

MILLAN, T.; OSUNA, F.; COBOS, S.; TORRES, A. M. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 92, p. 273-277, 1996.

MORIELLE-VERSUTE, E., TADDEI, V.A. Estudo comparativo dos cariótipos de espécies das famílias Molossidae e Phyllostomidae (Chiroptera). **Rev. Brasil. Genet.**, v.19 (Suppl.), p. 105, 1996.

MORIELLE-VERSUTE, E., VARELLA-GARCIA, M. TADDEI, V. A. Karyotypic patterns of seven species of molossid bats (Molossidae, Chiroptera). **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 72, p. 26-33, 1996.

MORIELLE-VERSUTE, E.; GOLONI-BERTOLO, E. M.; VARELLA-GARCIA, M.; TADDEI, V. A. A chromosome banding study of *Eumops glaucinus*. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 11, p. 791-795, 1988.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.** v. 55, p. 335-350, 1987.

MAMURIS, Z.; BANI, M.; STAMTIS, C.; TRIANTAPHYLLIDISULLIS, C. Taxonomic relationships between four species of the Mullidae family revealed by three genetic methods: allozymes, random amplified polymorphic DNA and mitochondrial DNA. **J. Fish Biol.**, v. 55, p. 572-587.

MEGNEGNEAU, P.; DEBETS, F.; HØEKSTRA, R. F. Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. **Curr. Genet.**, v. 23, p. 323-329, 1993.

NIKAIDO, M.; HARADA, M.; CAO, Y.; HASEGAWA, M.; OKADA, N. Monophyletic origin of the order Chiroptera and its phylogenetic position among Mammalia, as inferred from the complete sequence of the mitochondrial DNA of a Japanese megabat, the Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). **J. Mol. Evol.**, v. 51, p. 318-328, 2000.

NOWAK, R. M. **Walker's mammals of the world**. 6. ed., Baltimore: Johns Hopkins University, 1999. v. 1, p. 253-470

OWEN, R. D. Phenetic analysis of the bat subfamily Stenodermatinae (Chiroptera: Phyllostomidae). **J. Mamm.** v. 69, p. 795 – 810, 1988.

PATTON, J. C.; BAKER, R. J. Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoid bats. **Syst. Zool.**, v. 27, p. 449-462, 1978.

PLOMION, C.; O'MALLEY, D. M.; DUREL, C. E. Genomic analysis in maritime pine (*Pinus pinaster*). Comparison of two RAPD maps using selfed and open-pollinated seeds of the same individual. **Theor. Appl. Genet.** v. 90, p. 1028-1034, 1995.

PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; JR, H. F. J.; PAVANELLI, C. S.; OLIVEIRA, A. V.; CARRER, H.; CARRARO, M.; PRIOLI, L. M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD Markers. **Gen. Mol. Bio.**, v. 25, n. 4, p. 421-430, 2002.

PUMO, D. E.; KIM, I.; REMSEN, J.; PHYLLIPS, C. J.; GENOWAYS, H. H. Molecular systematics of the fruit bat, *Artibeus jamaicensis*: origin of an unusual island population. **J. Mamm.**, v. 77, p. 491 – 503, 1996.

RUEDI, M.; MAYER, F. Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences. **Mol. Phylog. Evol.**, v. 21, n. 3, p. 436-448, 2001.

SEMYENOVA, S.K.; ILLARIONOVA, N. A.; RYSKOV, A. P.; SHUBKINA, A. V.; VASIL'EV, V. A. Genetic analysis and estimation of genetic diversity in east-european breeds of windhounds (*Canis familiaris* L.) based on the data of genomic studies using RAPD markers. **Russian J. Gen.**, v. 38, n. 6, p. 704-713, 2002.

SIMMONS, N. B. A reappraisal of interfamilial relationships of bats. In: KUNZ, T. H.; Racey, P. A. (Ed). *Bat: biology and conservation*. London: Smithsonian Institution Press, 1998. p. 365.

SIMMONS, N. B.; GEISLEIR, J. H. Phylogenetic relationships of *Icaronycteris archeonycteris*, *Hassianycteris* and *Paleochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in microchiroptera. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 235, p.1-82, 1998.

SIMMONS, N. B.; NOVACEK, M. J.; BAKER, R. J. Approaches methods and the future of the chiropteran monophyly controversy: a reply to J. D. Pettigrew. **Syst. Zool.**, v. 40, p. 239-243, 1991.

SINCLAIR, E. A.; WEBB, N. J.; MARCHANT, A. D.; TEDEMAN, C. R. Genetic variation in the little red flying fox *Pteropus scapulatus* (Chiroptera: Pteropodidae): implications for management. **Biol. Conser.** v. 76, p. 45-50, 1996.

SMITH, J. D. Chiropteran evolution. **Spec. Publ. Mus. Texas Techol. Univ.**, v. 10, p. 49-69, 1976.

TADDEI, V. A.; AGUIAR, L. M. S. Lista de espécies de morcegos brasileiros. **Chiropt. Neotrop.**, v. 1, p. 26-26, 1995.

TADDEI, V. A.; NÓBILE, C. A.; MORIELLE-VERSUTE, E. Distribuição geográfica e análise morfométrica comparativa em *Artibeus obscurus* (Schinz, 1821) e *Artibeus fimbriatus* Gray, 1838 (M – C –P) **Ens. Ci.** v. 2, p. 49-70, 1998.

TRIERVEILER, F.; ANDRADE, F. M.; FREITAS, T. R. O. Dkaryotype of *Eumops auripendulus major* (Chiroptera; Molossidae) and its first recorded sighting in souther Brazil. **Mamm.**, v.66, n. 2, p. 303-306, 2002.

VAN DEN BUSSCHE, R. A. Restriction - site variation and molecular systematics of New World Leaf-Nosed Bats. **J. Mamm.**, v. 73, p. 29-42, 1992.

VAN DEN BUSSCHE, R. A.; HANSEN, E. W.; HOOFER, S. R. Characterization and phylogenetic utility of the Mammalian protamine P1 gene. **Mol. Phylog. Evol.**, v. 22, n. 3, p. 333-341, 2002.

VAN HEUSDEN A. W.; BACHMANN, K. Genotype relationships in *Microseris-Elegans* (Asteracea, Lectuceae) revealed by DNA amplification from arbitrary primers (RAPDs). **Plant. Syst. Evol.**, v. 179, p. 221-233, 1992.

VAN DE ZANDE, L.; BIJLSMA, R. Limitations of the RAPD technique in phylogeny reconstruction in *Drosophila*. **J. Evol. Biol.**, v. 8, p. 645-656, 1995.

VARELLA-GARCIA, M.; MORIELLE-VERSUTE, E.; TADDEI, V. A. A survey of cytogenetic on brazilian bats. **Brev. Brasil. Genet.** v. 4, p. 761-793, 1989.

VOLLETH, M.; HELLER, K. G. Phylogenetic relationships of vespertilionid genera (Mammalia:Chiroptera) as revealed by karyological analysis. **Z. Zool. Syst. Evol.**, v. 32, p. 11-34, 1994.

WARNER, J. W.; PATTON, J. L.; GARDNER, A L.; BAKER, R. J. Karyotypic analysis of twenty-one species of molossid bats (Molossidae, Chiroptera). **Can. J. Genet. Cytol.**, v. 16, p. 165-174, 1974.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, D. F. Taxonomic and karyologic commentes on small brown bats, genus *Eptesicus*, from south America. **Annals of Carnegie Museum**, v. 47, p. 361-383, 1978.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A . R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are usefull as genetic markers. **Nucleic Acid Res.**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using RAPD markers. **Methods Enzymol**, v. 218, p. 704-740, 1993.

VII. RESUMO

Foi utilizada a técnica de RAPD para estudo da variabilidade genética e identificação de marcadores moleculares, em sete espécies de morcegos pertencentes a cinco gêneros e três famílias: *E. glaucinus*, *E. perotis*, *M. molossus*, *M. rufus* (Molossidae), *E. furinalis*, *M. nigricans* (Vespertilionidae) e *A. planirostris* (Phyllostomidae).

Para amplificação do DNA genômico foram utilizados 20 *primers* decaméricos que juntos produziram 741 bandas, identificadas pelos tamanhos dos fragmentos em pares de bases (pb). As bandas foram registradas quanto a presença e ausência em cada indivíduo e os dados usados na construção de uma matriz binária e analisados estatisticamente e filogeneticamente com auxílio do programa Popgene 1.31 e PAUP 4.0b/0.

O número total de bandas produzidas variou em cada espécie, sendo *M. molossus* a espécie que apresentou o maior número de bandas (369), e *E. glaucinus* o menor número (239). O número de bandas polimórficas e as freqüências relativas e médias em cada espécie também variaram. As maiores freqüências médias de bandas polimórficas foram apresentadas pelos *primers* 1, 2, 3, 7, 8, 18 e 19. Entre as espécies, *M. molossus* foi a mais polimórfica (43%), seguida de *M. nigricans* (40,1%), *A. planirostris* (32,9%), *E. furinalis* (31,4%), *E. glaucinus* (29,4%), *M. rufus* (28,5%) e *E. perotis* (23,1%).

Outras bandas foram reconhecidas como monomórficas para uma espécie, sendo quatro para *M. nigricans*, duas para *M. molossus*, uma para *E. glaucinus* e uma para *E. furinalis*.

Apesar de monomórficas para a espécies, quando os fragmentos foram utilizados como sondas em procedimentos de hibridação *in situ* cromossômicos e nuclear eles hibridaram com diferentes espécies, não confirmando a especificidade da banda.

A diversidade gênica calculada segundo Nei (1973), foi analisada para a população, representada pelas sete espécies. Os maiores valores de diversidade genética foram observados com os *primers* 2, 6, 7, 8, 11 e 16. A espécie com maior variação gênica foi *M. molossus*, seguida de *M. rufus*, *E. furinalis*, *A. planirostris*, *E. glaucinus*, *M. nigricans* e *E. perotis*. Os mesmos índices de diversidade foram também calculados considerando-se somente os dados de cinco *primers* mais polimórficos (1,2,7,8 e 18). Nesta condição a espécie com maior variabilidade foi novamente *M. molossus*, seguida de *E. glaucinus*, *M. rufus*, *M. nigricans*, *E. perotis*, *E. furinalis* e *A. planirostris*.

A análise pelo Popgene forneceu também os valores de similaridade e distância genética entre as espécies nas duas situações, ou seja, para os 20 *primers* (741 loci) e para os cinco *primers* mais polimórficos (193 loci). Os valores de identidade genética entre as espécies, após análise dos 741 loci variaram de 0,937 (93,7%) a 0,819 (81,9%), sendo o maior valor observado entre *E. glaucinus* e

A. planirostris, e o menor entre *M. rufus* e *E. perotis*. Quando foi considerado apenas os cinco *primers* mais polimórficos, a maior proximidade foi novamente observada para *E. glaucinus* e *A. planirostris* e o maior valor de similaridade genética foi igual ao anterior (0,937) e o menor valor (0,754) foi observado para *M. rufus* e *E. perotis*.

A análise filogenética dos dados gerados pelos 741 loci, através dos algoritmos UPGMA e Neighbor-joining, com um bootstrap de 1000 réplicas, produziu duas árvores com bootstrap superior a 50%. Apesar de alguns diferenciais observados nos agrupamentos das duas árvores, ambas evidenciaram que as espécies de *Molossus* estão mais relacionadas entre si que as espécies de *Eumops*. *E. glaucinus* e *E. furinalis* apresentam grande relacionamento com *A. planirostris*, evidenciando que essas espécies estão estruturadas geneticamente de forma parecidas.

Apesar das bandas monomórficas não terem sido confirmadas como espécie-específicas elas caracterizaram as espécies com maior diversidade e mais polimórficas e, também com maior complexidade taxonômica, indicando que a análise de marcadores RAPD em um número de espécies desses gêneros poderá auxiliar a taxonomia desses táxons.

VIII. ABSTRACT

RAPD technique was used to study genetic variability and to identify molecular markers in seven species of bats belonging to five genera and three families: *E. glaucinus*, *E. perotis*, *M. molossus*, *M. rufus* (Molossidae), *E. furinalis*, *M. nigricans* (Vespertilinidae) and *A. planirostris* (Phyllostomidae).

Genomic DNA amplification, was performed with twenty different decamer random primers, wich together produced 741 bands recognized by the size of fragments, (in pair of bases pb). Presence and absence of bands were registered and the data were used to construct a binary matrix. A statistical and phylogenetic analysis were performed with the PAUP 4.0b/0 and Popgene 1.3 programs.

The total number of bands was variable in each species. *M. molossus* was the species that produced the greatest number of bands (369), and *E. glaucinus* the lowest (239). O number of polymorphic bands and the relative and average frequencies also varied. The highest mean frequencies of polymorphic bands were showed by the primers 1, 7, 8, 18 and 19. The most polimorphic species was *M. molossus* (43%), followed by *M. nigricans* (40.1%), *A. planirostris* (32.9), *E. furinalis* (31.4%), *E. glaucinus* (29.4%), *M. rufus* (28.5%) and *E. perotis* (23.1%).

Eight bands were recognized as monomorphics, four to *M. nigricans*, two for *M. molossus*, one for *E. glaucinus* and one for *E. furinalis*.

Despite of the monomorphic condition, when the fragments were used as probe in the *in situ* hybridization procedures, they hybridized with different species, not confirming the band specificity.

Genic diversity estimated according to Nei (1973), was analyzed for population, representing the seven species. The highest values of genetic diversity were observed with the primers 2, 6, 7, 8, 11 and 16. *M. molossus* was the species with highest genic variation followed by *M. rufus*, *E. furinalis*, *A. planirostris*, *E. glaucinus*, *M. nigricans* and *E. perotis*. The diversity index were also estimated using the data obtained with the five polymorphic primers (1, 2, 7, 8 and 18). In these condition, the highest variability was again observed to *M. molossus*, followed by *E. glaucinus*, *M. rufus*, *M. nigricans*, *E. perotis*, *E. furinalis* and *A. planirostris*.

Popgene analysis also gave the similarity and genetic distance values among the species in both conditions, for the 20 (741 loci) and five more polymorphic primers (193 loci). The genetic identity values, after analysis for 741 loci, varied from 0.937 (93.7%) to 0.819 (81.9%), with the highest value observed between *E. glaucinus* and *A. planirostris*, and the smallest between *M. rufus* and *E. perotis*. When was considered the five more polymorphic primers, the highest proximity was again

observed for *E. furinalis* and *A. planirostris* , 0.940 (94.0%). The smallest value (0.754) was observed for *M. rufus* and *E. perotis*.

The phylogenetic analysis of the data produced by the 741 loci, by UPGMA and Neighbor-joining, with a bootstrap of 1000 repeats, produced two trees with bootstrap upper to 50%. Besides some differences observed in the grouping of the two trees, both evinced that Molossus species are more related itself than Eumops species. *E. glaucinus* and *E. furinalis* showed great relationship with *A. planirostris*, evincing that theses species are genetically structured in a similar way.

Despite of the monomorphic bands had not been confirmed as specie-specific, they occurred in the species with highest diversity and polimorphism, also with highest taxonomic complexity, indicating that the RAPD markers analysis in higher number of species of these genera, would be contribute to taxonomy of these taxons.

Anexo 1- Matriz construída para a análise estatística e filogenética, com base na presença (1) ou ausência (0) das 741 bandas produzidas pelos 20 *primers* utilizados no presente estudo. As bandas estão agrupadas pelos indivíduos (mol 1 a art 4) e representados em 20 linhas e, cada linha representa o *primer* que as gerou (1 a 20). mol 1 a 4 = indivíduos de *M. molossus*; ruf 1 a 4 = indivíduos de *M. rufus*; gla 104 = *E. glaucinus*; per = *E. perotis*; myo = *M. nigricans*; ept = *E. furinalis*; art = *A. planirostris*.

```

mol1
001000100000000000010101111011000
00100000000000000000010000000000110000
000000100010000000000010000000001000010000001100
000000000001001000000010000010010110000111
100000000000110100000000010001100101000
101000100010001000010010001001001000010
00001100011001000010010010011110000000000000
100010000100000010010011000010100100101011
10000000000110000010000000000000110100
01000000010001100001000000100001000001001
00000000000000100010001010100110000
000000100100000100001000000010000
00000000000000100000100000000000100
00000000000000000000010000001000000000
000000000000000000000010100101100000
01100011001010100110111101000
00000010000000010000000011010110000
00000001000011000000010001100000011
00100110100000010100010000010101000
00101010000000000000010010

mol2
011000101000101010001101111010000
001000000000000000000100000100001000000
01001110101111000010001001011000000010110100100
000000010001000100001010001010010110000111
101000000000010100001000010000100101001
1011001011000001010011010111110001011000
11010111010011011101111111001000000000000000
100010011101110010010011011010101111001011
10000010000100101010011001001100110010
0100000001100011000000000000000001001000
0000000000000000110110001111100100000
000000101000101010100101000010000
000001010000000101100000000100001000
01000000010000010010000010010101001010
00000000000000000000010100101101000000
01100000011000010010000001000
10100001100001010011010001010110000
10001101000001100011010001110000011
01100110100101010101000101110011001
0100101100010000001000100

mol3
101000000000100000001101001010000

```


0000010001000000001100100000000001001
0000000001000100000100001000000010000000
0000000000000000000010001100000011
000100000000111000010100000100000
000000000001010110010000000101001000
00001010000000100000000011000000010000
0000000000100001000000000010000000
00000000010010001010100000100
00000000000000000000000000010000011
000100000000000000100000010010001001
00000000000000000010100000000001000
0000000001101000000000110

myo1

000000000000000000000000000000001000
10000100100100011110101010101001100000
00001000000000100101010000000000110100001001000
1000100000000000001000011000010010000010000
010001000110100100010101100100011110100
000001010000010000001000010000010000101
000100001010000100010000010010111001101010111
001011000010001110110000100100011001010101
01000011001001010100001010110000001000
00000101010010000010010101010000010000000
10000110110001010001010010101001110
000100010000010000000010000010000
000001001001010100010001000100000000
00000001000000000100000010000010010000
1001010000001010110101100000000000
00000000110000000001000100001
00100010000011010010100010101101000
0000000000000000000000000000000010000100
00000010000010101010001011000000010
0010010000000010110001000

myo2

000000000000000000000000000000000000
10000101001100011110101010001101110000
001010000000001001000100000100001110001101001000
001010000101100100000010010010010001010001
010000000110100110100101001000100100101
000001010000010000001000000000000000001
001100001010001100010100010110110001000000000
000011000110001111100010000000000000100011
00100000000001000010010010010000000000
00001101010010000010110101011000010000000
10010110000001010001010011100000110
0001000100010100100100100100000000
100000001000010001010001000100000000
10001010101010001000000111000010010000
1000010000111100000110100000000000
00000001000000110001000100001
0010010000001010001100001010010000
00000000010000000011101000000010000
10000010011010101110001001000001000
001001000000001000000000

myo3

00010100000010100001000001000000010100100000
000000000011000000001010001101000000000001
00000010010000000100001000101000001000
10010100010010010010010001000001010000100000
00000100101000101010011000011000010
010000111011010010010011100010101
000010101101000111000101010001010000
00000000000000100100010010010000010000
00000000100111000010000000010000000
00001001000001101000111001001
00001000000010000000001100010110011
00000010000001000100000100010010011
00000111010010101000001011000000001
0001010001000000001100010

art1

000100000000000000000000111100000000
0000000000000000000000000100000000000000
100000000000000000000000000001000000100100000000001
1000000000000000000000000000001011000000000
00
00
00000000000100000001100100010010000000000000
0000000100000000000000000000000000000001001
0000000000000000000000000000000000000001000000
00100001000100001000100000100010001010000
00001001000001000100000110100101000
0000000000000000000000000100000000
001000000000100000000000100000000000
00000001000100000100010000101000100100
00001000000010000010000000000100110
00000001000101001000001001001
00000000000000000000001010000001000000
000000101001000100001000000000000000
00000000010100010110011001001010000
0001010000100000000101010

art2

000000100000000000000000000000000000
00000000000100000000000000000000000000
000010100000000000010000001000001100100000000011
100001000101010000111100000001011000000000
00000000000000000000000000000000000000
00000000000000000000000000000000000000
00
00000000000000000000000000000000000000
0000000000000000100000000000010000010
00010000100100001000100000100010000000000
000010000000000000000000000000000000
000000000000000010000000000000000000
0001000000000000000000000000100000000000
00000000000000000000000000000000000000
00001000000000000000000000000100000
01001010011001001100001000000
000000000000000000000000000000000000
000000101011001100000000100000000000
00001011000001000100001001001000000
0000010001100000000100010

