

Sandra Regina de Carvalho Marchesin

**Divergência Genética e Relacionamento Filogenético em
Espécies de Morcegos das Famílias Molossidae e
Phyllostomidae Baseado em Análises de PCR-RFLP**

Tese apresentada para a
obtenção do título de Doutor
em Genética

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Morielle Versute

São José do Rio Preto - SP
2006

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	13
1. Família Molossidae	14
2. Família Phyllostomidae	15
3. Família Vespertilionidae	17
4. Família Emballonuridae	20
5. Estudos Moleculares na Caracterização da Variabilidade Genética	21
II. OBJETIVOS	26
III. TRABALHOS	
1. Estudo filogenético em espécies de morcegos da família Molossidae baseado em PCR-RFLP	27
2. Análise de seqüências gênicas mitocondrial e nuclear em espécies de Phyllostomidae por meio da técnica PCR-RFLP (Chiroptera-Mammalia)	52
3. Variabilidade genética em espécies de morcegos das famílias Molossidae, Phyllostomidae, Vespertilionidae e Emballonuridae baseada em PCR-RFLP	73
IV. CONCLUSÕES GERAIS	105
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
VI. APÊNDICES	117
RESUMO	125
ABSTRACT	127

Divergência Genética e Relacionamento Filogenético em Espécies de Morcegos das Famílias Molossidae e Phyllostomidae Baseado em Análises de PCR-RFLP

INTRODUÇÃO

A ordem Chiroptera inclui cerca de um quarto das espécies atuais de mamíferos, com cerca de 1000 espécies e, apesar desta importante irradiação, os relacionamentos evolutivos da ordem são ainda pouco conhecidos e os resultados controversos (Koopman, 1970; Nowak, 1999; Simmons, 1998, 2000; Jones *et al.*, 2002). Em consequência, muitos estudos comparativos buscando identificar os padrões evolutivos dentro da ordem vêm sendo desenvolvidos, deixando evidente a importância de uma avaliação da história evolutiva dos clados através de análises comparativas consistentes e bem documentadas.

A hipótese de difilia para Chiroptera foi proposta há mais de 30 anos, quando foi sugerido que os Megachiroptera eram mais proximamente relacionados aos primatas que aos Microchiroptera (Smith, 1976; Pettigrew *et al.*, 1989; Simmons, 1998) e, apesar de antiga, a idéia do difiletismo para a ordem tem estado presente em debates recentes. Contudo, os resultados da maioria dos estudos bioquímicos, moleculares e morfológicos suportam o monofiletismo da mesma (Simmons, 1998; Simmons & Geisler, 1998; Van Den Bussche *et al.*, 1998; Nikaido *et al.*, 2000; 2001; Teeling *et al.*, 2000, 2002). Ao nível infra ordinal, há um consenso relativo quanto aos relacionamentos entre as 17 famílias reconhecidas de Microchiroptera e, várias propostas têm sido apresentadas baseadas em diferentes conjuntos de dados

(Smith, 1976; Van Valen, 1979; Novacek, 1980; Pierson, 1986). Apesar disso, a sistemática do grupo é bastante complexa, e relacionamentos filogenéticos não muito bem estabelecidos aparecem em várias famílias e gêneros, entre os quais podemos citar *Myotis*, *Eptesicus* e *Pipistrellus* da família Vespertilionidae, *Artibeus* da família Phyllostomidae, *Eumops* e *Molossus* da família Molossidae, entre outros (Simons & Geilser, 1998; Jones *et al.*, 2002).

1. FAMÍLIA MOLOSSIDAE

A família de morcegos insetívoros Molossidae é composta por 16 gêneros e 86 espécies recentes amplamente distribuídas em regiões tropicais e temperadas (Koopman, 1984; Freeman, 1981; Nowak, 1999). Quanto a sistemática do grupo, dois níveis de questões têm sido abordados: o primeiro refere-se a posição da família dentro de Microchiroptera e aos agrupamentos supragenéricos, no nível familiar e, o outro, aponta exclusivamente para os conflitos entre as várias proposições de relações filogenéticas dentro da família, que culminariam no reconhecimento e definição dos gêneros.

Simmons (1998) reconhece para a família Molossidae, duas subfamílias, Tomopeatinae, que é monotípica, incluindo apenas *Tomopeas ravus*, e Molossinae que inclui todos os outros molossídeos

A subfamília Tomopeatinae, até 1994, foi considerada uma subfamília de Vespertilionidae. Entretanto, Sudman (1994), baseado na análise de dados de seqüências dos genes citocromo b, mitocondrial e eletroforese de proteínas e, posteriormente, Simmons (1998), a partir de análise filogenética utilizando

diferentes conjuntos de dados, demonstraram que *Tomopeas* estava mais relacionado aos molossídeos que com vespertilionídeos e a inclusão deste em Molossidae não alterou o monofiletismo da família. (Simmons, 1998; Simmons & Geisler, 1998).

Os relacionamentos filogenéticos dentro de Molossidae, e em particular nos representantes de Molossinae, têm sido investigados utilizando-se principalmente caracteres morfológicos. Embora as árvores e classificações originadas a partir destes estudos apresentem ainda incongruências, elas têm sido concordantes quanto a monofilia da subfamília Molossinae (Simmons, 1998).

Em estudo recente Jones *et al.* (2002), através da análise combinada de 105 estimativas de relacionamentos filogenéticos de diferentes gêneros e espécies de Chiroptera, deram suporte à proposta de Freeman (1981) para Molossidae, que reconheceu dois clados de molossídeos, um, constituído pelos morcegos semelhantes a *Tadarida* e outro pelos morcegos semelhantes a *Mormoops*.

No primeiro clado estão incluídas a maioria dos gêneros de Molossidae (oito). Apesar de grandiosa, a análise não resolveu todos os inter-relacionamentos genéricos e específicos.

2. FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE

Entre as famílias de morcegos neotropicais, a família Phyllostomidae é a que apresenta maior representatividade, com cerca de 53 gêneros (Wetterer *et al.*, 2000) e 146 espécies, das quais 83 ocorrem no Brasil (Taddei, 1996; 1997; Pedro, 1998). Os morcegos desta família podem ser encontrados nas regiões tropicais e

subtropicais do Novo Mundo, abrangendo desde o sudoeste dos Estados Unidos até o nordeste da Argentina (Nowak, 1999).

Os registros fósseis mais antigos para a família datam do Mioceno e Pleistoceno na América do Sul e América do Norte (McKenna & Bell, 1998). A irradiação adaptativa dos Phyllostomidae aparentemente foi uma resposta para explorar os vários nichos alimentares no Novo Mundo (Smith, 1976), existindo grupos de espécies cujo hábito alimentar predominante pode ser insetívoro, carnívoro, frugívoro, nectarívoro, onívoro ou exclusivamente sanguívoro. Apenas três espécies de morcegos (*Diphylla ecaudata*, *Diaemus youngi* e *Desmodus rotundus*) se especializaram para a hematofagia ou sanguivoria, apresentando área de distribuição restrita à América Latina (Taddei, 1997).

Os membros da família Phyllostomidae são anatomicamente complexos apresentando formas bastante diversificadas, o que determina considerável confusão e desacordos em estudos sistemáticos e filogenéticos de alguns gêneros e espécies.

Os estudos sistemáticos têm subdividido a família em cinco a 11 subfamílias (Koopman 1993,1994; Baker *et al.*, 2003). Apesar de algumas variações quanto a posição dos gêneros de Phyllostomidae nas subfamílias reconhecidas, e mesmo no inter-relacionamento entre as subfamílias, os estudos amplos de Wetterer *et al.* (2000) e Jones *et al.* (2002) apresentaram consenso quanto a monofilia da família, assim como no reconhecimento de que Desmodontinae é grupo irmão dos demais filostomídeos.

Entre os Stenodermatinae, grande atenção tem sido dada aos relacionamentos de alguns gêneros, como *Sturnira*, *Artibeus* e suas espécies, das quais *Artibeus* é o mais complexo. Há um desacordo no que se refere ao relacionamento entre as espécies deste táxon e a monofilia do grupo como um todo (Van Den Bussche, 1992; Lim, 1993; Van Den Bussche, 1993, 1998). Koopman (1994) agrupou as espécies de *Artibeus* em três subgêneros: (1) o subgênero *Artibeus*, que inclui as grandes espécies, (2) o subgênero *Dermanura*, incluindo as espécies pequenas e (3) o subgênero *Enchisthenes*.

Mais recentemente Wetterer *et al.* (2000) e Jones *et al.* (2002) analisando os relacionamentos filogenéticos entre diferentes gêneros de Phyllostomidae propõem que *Artibeus* com *Enchisthenes* como subgênero é parafilético, pois este não se relaciona com os outros subgêneros de *Artibeus*, que formam um clado natural. Para Wetterer *et al.* (2000) *Enchisthenes* deve ser reconhecido como um gênero diferente de *Artibeus*.

3. FAMÍLIA VESPERTILIONIDAE

A família Vespertilionidae é verdadeiramente cosmopolita, ocorrendo em todos os continentes, com algumas espécies atingindo as zonas temperadas frias e muitas ilhas oceânicas, tais como, Bermudas, Galápagos e Hawai (Koopman 1970). Trata-se da maior família de Chiroptera, representando um terço das espécies atuais de morcegos (Koopman, 1993). Constitui um grupo bastante diversificado, para o qual são reconhecidos 42 gêneros e cerca de 355 espécies, das quais 74 ocorrem nas Américas e, dessas, 19 podem ser encontradas no Brasil (Taddei, 1996). Os

primeiros registros fósseis de morcegos da família Vespertilionidae datam do Eoceno médio na Europa. Na América do Norte o registro mais antigo desta família é do Oligoceno médio e na Índia Ocidental, América do Sul e Austrália datam do Pleistoceno (Koopman, 1984).

De forma geral, os morcegos da família Vespertilionidae são encontrados em troncos ou suspensos em ramos, freqüentemente protegidos pela folhagem. Ao entardecer alçam vôos altos onde a eficiência das redes de captura (*mist-nets*) é discutível, dificultando a obtenção de exemplares em número satisfatório para os estudos, em todos os meses do ano (Taddei, 1980). Este fato, aliado ao pequeno número de caracteres morfológicos adequados para a classificação taxonômica dos vespertilionídeos, determinam a escassez de publicações referentes ao relacionamento filogenético de Vespertilionidae. Em decorrência do grande número de espécies da família, a sistemática, ao nível familiar, é controversa e o reconhecimento dos gêneros com elevado número de espécies como *Eptesicus* e *Myotis* não é simples.

A primeira proposta de classificação para Vespertilionidae foi feita por Tate em 1942, que baseou-se principalmente em caracteres dentários, particularmente a redução ou perda de dentes pré-molares e incisivos. Esta classificação reconheceu apenas uma subfamília para Vespertilionidae: Vespertilioninae. Outras propostas foram posteriormente formuladas, sendo que Koopman (1984) reconheceu e agrupou os gêneros e espécies de Vespertilionidae em cinco subfamílias: Kerivoulinae, Vespertilioninae (com as tribos Myotini,

Vespertilionini, Nycticeini, Lasiurini, Antrozoini e Nyctophilini), Murinae, Miniopterinae e Tomopeatinae.

A proposta mais recente de classificação para os Vespertilionidae foi apresentada por Simmons (1998), que realizou uma análise filogenética utilizando diferentes conjuntos de dados. Em sua classificação ela reconhece cinco subfamílias: Vespertilioninae (27 gêneros e 180 spp.), Myotinae (2 gêneros e 86 spp.), Miniopterinae (1 gênero e 10 spp.), Murinae (2 gêneros e 16 spp.) e Kerivoulinae (1 gênero e 22 spp.). Dessas, as três últimas são claramente monofiléticas. As espécies dos gêneros *Eptesicus*, *Histiotus*, *Lasiurus* e *Rhogeessa* estão incluídas na subfamília Vespertilioninae, enquanto que a subfamília Myotinae constitui-se pelas espécies de *Myotis* e *Lasionycteris*. A proposta apresentada por Simmons (1998) foi embasada entre outros dados, pelos resultados dos estudos citogenéticos realizados por Volleth & Heller (1994a, b).

Simmons (1998) e Simmons & Geisler (1998) apoiados nos estudos de Volleth & Heller (1994a, b), propuseram a elevação da tribo Myotini para a categoria de subfamília, e a exclusão da subfamília Tomopeatinae de Vespertilionidae, agora reconhecida como subfamília de Molossidae. Apesar da proposta, a monofilia de Myotinae, permanece incerta, pois nenhuma sinapomorfia morfológica é conhecida para o grupo e não há dados disponíveis para *Lasionycteris*. No trabalho de Volleth & Heller, (1994b) a monofilia da subfamília Vespertilioninae e do gênero *Myotis*, pertencente a subfamília Myotinae, é apoiada por dados cromossômicos.

Apesar destas propostas, Jones *et al.* (2002), ao analisarem os dados combinados para a família, concluíram que a falta de resolução para os relacionamentos no nível das subfamílias não pode ser resolvida na sua análise, devido a falta de consenso entre os dados gerados nas investigações e, diferentemente do proposto por Volleth & Heller (1994b) a subfamília Vespertilioninae apareceu parafilética.

4. FAMÍLIA EMBALLONURIDAE

A família Emballonuridae é composta por 13 gêneros e cerca de 50 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Hood & Baker, 1986; Robbins & Sarich, 1988; Nowak, 1999). Nas Américas ocorrem 18 espécies das quais 15 já foram registradas no Brasil (Taddei, 1996). Os registros fósseis mais antigos para esta família são do Eoceno médio na Europa, Mioceno médio na África e Pleistoceno na América do Sul e América do Norte (McKenna & Bell, 1998). Duas subfamílias são reconhecidas, Taphozoinae, com *Taphozous* e *Saccolaimus* e Emballonurinae, com os 11 gêneros restantes. Uma terceira subfamília às vezes é reconhecida, Diclidurinae, compreendendo o gênero *Cyttarops* e *Diclidurus* (Robbins & Sarich, 1988)

Segundo Smith (1976), a maioria das famílias de Chiroptera originou-se aparentemente da radiação adaptativa dos emballonurídeos, rinolofídeos e vespertilionídeos.

De acordo com Simmons & Geisler (1998) com base no grau de especialização morfológica, os emballonurídeos teriam chegado primeiro aos

trópicos do Novo Mundo, seguido dos vespertilionídeos. Desta forma, a família Emballonuridae tem sido considerada por alguns autores como uma possível ancestral dos Noctilionidae, Mormoopidae e Phyllostomidae do Novo Mundo. As demais famílias neotropicais Natalidae, Thyropteridae e Furipteridae aparentemente derivaram do estoque de vespertilionídeos.

Hood & Baker (1986) analisando comparativamente os cromossomos de espécies de Phyllostomidae e Emballonuridae, não detectaram homologias cromossômicas entre elas.

Na avaliação filogenética de Jones *et al.* (2002), que utilizaram as combinações de 105 estimativas de relacionamentos baseados em diferentes conjuntos de caracteres, Emballonuridae aparece basal para os Yinochiroptera (todos os Microchiroptera), diferentemente dos estudos de Griffiths *et al.* (1992) e Simmons & Geisler (1998), que reconheceram Emballonuridae como grupo irmão à todas as outras famílias de Microchiroptera.

5. ESTUDOS MOLECULARES NA CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA

Apesar dos vários estudos tentando esclarecer aspectos evolutivos de gêneros e espécies de Chiroptera, estamos ainda longe da situação ideal. Isto ainda não foi alcançado, pois os relacionamentos evolutivos de muitas espécies não foram ainda formalmente investigados e as incongruências têm complicado a situação.

As análises moleculares realizadas, tanto ao nível de família como em níveis taxonômicos inferiores, têm propiciado a obtenção de informações importantes e que

na maioria das vezes não são identificadas ou reconhecidas pelos estudos morfológicos, nos quais baseiam-se a maior parte da classificação dos morcegos.

A matéria bruta dos estudos de biodiversidade molecular é a mesma envolvida na evolução das espécies: a variabilidade genética. Os vários estudos visando a caracterização da variabilidade têm sido realizados utilizando diferentes técnicas, capazes identificar marcadores moleculares e estimar a frequência de polimorfismos em um segmento de DNA ou em todo genoma.

Podemos destacar as análises de RFLP, RAPD, estudo de microsatélites, sequenciamento direto de nucleotídeo, as quais associadas às análises estatísticas podem determinar qual o comportamento dos genes no nível intra e interespecífico e seu papel na evolução (Avice, 2000; Juste *et al.*, 2004).

A partir da década de 80, diferentes tipos de DNAs (mtDNA, principalmente) vêm sendo amplamente utilizados em estudos genéticos e evolutivos. O aumento significativo na caracterização de seqüências geradas a partir de DNA de mamíferos tem sido acompanhada da observação das variações ocorridas nos padrões genéticos de espécies relacionadas, as quais fornecem informações importantes sobre os processos responsáveis por toda diversificação no planeta (Avice & Walker, 1999; Bradley & Baker, 2001).

As pesquisas no nível molecular têm tido muita ênfase nos estudos sistemáticos em vários grupos animais. O genoma mitocondrial, pelas suas características e particularidades, tem sido especialmente útil nas análises evolutivas de vertebrados. O DNA mitocondrial animal é uma molécula de fita dupla circular que codifica, aproximadamente, 5% de toda a maquinaria necessária para o

funcionamento da mitocôndria. O conteúdo em termos de genes é extremamente conservado, contudo, algumas diferenças são relatadas quando comparados organismos que divergiram há muito tempo, como entre ordens e classes taxonômicas (Matioli & Passos-Bueno, 2001).

Outra característica que torna a molécula de DNA mitocondrial muito atrativa para estudos populacionais e evolutivos é o fato de apresentar herança citoplasmática, de modo que ela não segue os padrões mendelianos de segregação e não sofre recombinação. Uma terceira característica fundamental dessa molécula é a sua alta taxa de evolução (10 vezes superior a um gene de cópia única nuclear) (Corneli & Ward, 2000; Arias & Infante-Malachias, 2001).

Apesar da molécula de DNA mitocondrial ser utilizada extensivamente em estudos moleculares, seqüências no genoma nuclear fornecem um grande número de marcadores genéticos para análise de variação intra interespecífica. Vários genes nucleares têm sido utilizados para inferências filogenéticas, como o gene nuclear RAG2 (*recombination activating gene 2*) que, por mostrar-se extremamente conservado, tem fornecido evidências adicionais aos dados moleculares deficientes obtidos em estudos evolutivos de táxons superiores. O gene RAG2 é um dos dois genes cujos produtos protéicos estão envolvidos na recombinação V(D)J, processo envolvendo a formação de linfócitos funcionais (Baker *et al.*, 2000; Lewis-Oritt *et al.*, 2001).

Os diferentes marcadores moleculares como visto, podem apresentar particularidades relativas às seqüências de bases, além das taxas diferentes de

evolução, tipo de segregação e distribuição no genoma, características que devem ser levadas em conta para as diferentes análises e hipóteses a serem testadas.

Pierson, em 1986, foi o primeiro a examinar os caracteres moleculares para estudo de relacionamento entre famílias de Microchiroptera. Desde esta data, inúmeros estudos filogenéticos têm se baseado na análise de dados moleculares, como ferramenta auxiliar na sistemática de alguns grupos de morcegos.

Os dados moleculares além de fornecerem subsídios para o esclarecimento das relações filogenéticas difíceis de abordar por outros métodos, podem ser a base de questionamentos para propostas filogenéticas anteriores. Esse último é o caso da monofilia de Chiroptera que ainda está sob discussão (Nikaido *et al.*, 2001; Teeling *et al.*, 2002).

Os estudos moleculares, de maneira geral, acabam por caracterizar a variabilidade genética de um organismo, espécie ou população, constituindo-se assim um instrumento importante de investigação por ecólogos e sistematas, de aspectos relativos a afinidades e limites entre espécies, na estimativa de níveis de migração e dispersão das populações, entre outros.

Existe atualmente na literatura, inúmeros trabalhos propondo relações entre variação genética e estrutura populacional de mamíferos e outros vertebrados, com o intuito de detectar distribuições filogeográficas destes organismos ou ainda, identificar e diferenciar espécies crípticas presentes em dada comunidade.

Análise deste tipo pode ser exemplificada em trabalho recente de Russel *et al.* (2005), que a partir da análise de seqüências da região mitocondrial e da utilização de metodologias relacionadas à filogenética, genética de população e

coalescência, avaliaram a estrutura genética de populações de morcegos da subespécie *Tadarida brasiliensis mexicana*, os quais apresentam colônias com grande número de indivíduos e possuem ampla dispersão geográfica. Os estudos tradicionais indicavam a ocorrência de quatro grupos distintos de *T. b. mexicana*. Contudo, a partir da correlação de variabilidade genética ao comportamento migratório desses morcegos, os autores verificaram que não há diferenças significativas na estrutura genética dos indivíduos destes quatro grupos e as diferenças encontradas são similares a de outros grupos de morcegos não migratórios, contrariando o esperado para espécies com comportamento migratório e amplamente distribuídas.

Contudo, apesar do grande avanço nos estudos moleculares, o significado da biodiversidade gênica não é fácil de se esclarecer. As medidas de variação nem sempre seguem o mesmo padrão em todos os grupos de organismos. (Avise & Walker, 1999).

Assim, o conhecimento da variação e comportamento de marcadores genéticos para uma espécie em particular ou um conjunto delas, fornece informações importantes que nos permite estimar precisamente a história evolutiva da espécie, como o tamanho da população, origem, estrutura de acasalamento e estabelecimento do relógio biológico (molecular), além de ter um papel significativo em estudos de populações de diversos organismos e na sua biogeografia.

OBJETIVOS

Em vista aos aspectos considerados, foram objetivos do presente trabalho:

- * Obter os padrões de PCR-RFLP de espécies das famílias Molossidae e Phyllostomidae relativos à seqüências dos genes 12S/16S mitocondrial e do gene RAG 2 (*Recombination-Activating Gene-2*) nuclear.
- * Comparar os padrões obtidos e utilizar estes padrões na construção de mapas de restrição.
- * Com os dados obtidos, fazer análises comparativas envolvendo as espécies estudadas.

ESTUDO FILOGENÉTICO EM ESPÉCIES DE MORCEGOS DA FAMÍLIA MOLOSSIDAE BASEADO EM PCR-RFLP

Sandra Regina de Carvalho Marchesin¹ e Eliana Morielle Versute²

Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas,

¹*Departamento de Biologia, São José do Rio Preto, SP, Brasil*

²*Departamento de Zoologia e Botânica, São José do Rio Preto, SP, Brasil*

Palavras Chaves: evolução molecular, morcegos, filogenética, PCR-RFLP, polimorfismos

Key words: molecular evolution, bats, phylogenetic, PCR-RFLP, polymorphisms

Resumo

Poucos são os trabalhos referentes aos relacionamentos filogenéticos de membros pertencentes à família Molossidae e a maioria está baseado em dados morfológicos e muitas vezes referem-se a dados supragenéricos. A fim de avaliar as relações de proximidade genética e evolutiva entre espécies de Molossidae, utilizamos a técnica de PCR-RFLP para obter dados moleculares para os genes mitocondrial 12/16S e nuclear RAG2 de 11 espécies de Molossidae: *Cynomops*

abrasus, *C. planirostris*, *Eumops auripendulus*, *E. bonariensis*, *E. glaucinus*, *E. perotis*, *Molossops temminckii*, *Molossus rufus*, *M. molossus*, *Nyctinomops laticaudatus* e *N. macrotis*. A partir dos dados gerados foi possível observar que os táxons do gênero *Eumops*, principalmente *E. perotis* e *E. glaucinus* que aparecem como táxons irmãos formam um grupo consistente. Contudo, o táxon *E. bonariensis* apresentou incongruências, revelando a complexidade do gênero. *Molossus molossus* e *Molossus rufus* formaram grupo robusto e consistente, corroborando dados da literatura referente a monofilia das espécies, contudo, apresentou-se derivado a todos os outros táxons e ocupando posição basal, *C. abrasus* e *C. planirostris*.

Abstract

There are few studies on phylogenetic relationships of Molossidae family members and the majority of them are based on morphologic data, generally related to suprageneric traits. To assess the proximity of genetic and evolutive relationships among Molossidae species, the PCR-RFLP technique was applied to obtain molecular data for 12/16S and RAG2, respectively mitochondrial and nuclear genes, of eleven Molossidae species: *Cynomops abrasus*, *C. planirostris*, *Eumops auripendulus*, *E. bonariensis*, *E. glaucinus*, *E. perotis*, *Molossops temminckii*, *Molossus rufus*, *M. molossus*, *Nyctinomops laticaudatus* e *N. macrotis*. The results indicate that taxons of *Eumops* genus, especially *E. perotis* and *E. glaucinus*, form a consistent group. The taxon *E. bonariensis* presented incongruences, revealing its complexity. *Molossus molossus* and *Molossus rufus*

form a robust and consistent clade, supporting data of other studies on monophyly of species, however derived to all other taxa while *C. abrasus* and *C. planirostris* presented a basal position.

Introdução

A superfamília Molossoidea de Chiroptera, conforme proposto por Simmons (1998), é constituída pelas famílias Antrozoidae e Molossidae. A família Molossidae inclui 16 gêneros e 86 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da Terra. Constitui um grupo distinto, facilmente identificado pela cauda livre e, algumas espécies, vivem em grandes colônias, podendo exceder cinco milhões de indivíduos, sendo em algumas regiões considerados os morcegos mais comuns. Apesar disto, muitos táxons estão pobremente representados nas coleções e as interpretações dos relacionamentos filogenéticos têm sido baseadas em poucos dados (Freeman, 1981; Koopman, 1984; Nowak, 1999; Simmons & Conway, 2001; Gregorin, 2003).

São reconhecidas para Molossidae, duas subfamílias, Tomopeatinae que é monotípica, incluindo apenas *Tomopeas ravus*, e Molossinae que inclui todos os outros molossídeos.

A subfamília Tomopeatinae foi considerada, até 1994, uma subfamília de Vespertilionidae. Simmons (1998) a partir de análise filogenética utilizando diferentes conjuntos de dados, demonstrou que o gênero *Tomopeas* estava mais relacionado com molossídeos que com vespertilionídeos.

Os relacionamentos evolutivos dos representantes de Molossinae têm sido investigados utilizando principalmente caracteres morfológicos e morfométricos, anatômicos, bioquímicos, moleculares e citogenéticos (Eger, 1977; Freeman, 1981; Ryan, 1991; Sudman *et al.*, 1994; Morielle-Versute *et al.*, 1996; Gregorin & Taddei, 2002; Peters *et al.* 2002; Leite-Silva *et al.*, 2003; Gregorin, 2003).

Apesar desses estudos contribuírem para o entendimento dos relacionamentos evolutivos e da variação observada entre e dentro dos táxons de Molossidae, eles apresentam conflitos quando comparados conjuntos diferentes de dados.

A falta de resolução dos dados já obtidos, a complexidade taxonômica e filogenética de Molossidae e a aplicabilidade de técnicas moleculares na sistemática de alguns grupos de morcegos, tanto ao nível de família como em níveis taxonômicos mais baixos, nos levou a utilizar a técnica PCR-RFLP na obtenção de dados moleculares para os genes mitocondrial 12/16S e nuclear RAG2 de 49 espécimes representando 11 espécies de Molossidae, a fim de analisar os relacionamentos evolutivos entre os táxons avaliados.

Material e métodos

Táxons examinados

Na análise do gene 12/16S foram analisados 49 espécimes representantes de 11 espécies e cinco gêneros de Molossidae (*Cynomops abrasus*, *C. planirostris*, *Eumops bonariensis*, *E. auripendulus*, *E. glaucinus*, *E. perotis*,

Molossops temminckii, *Molossus rufus*, *M. molossus*, *Nyctinomops laticaudatus* e *N. macrotis*), e na análise do gene RAG2, 22 espécimes representantes de sete espécies e três gêneros (*E. auripendulus*, *E. glaucinus*, *E. perotis*, *E. bonariensis*, *M. rufus*, *M. molossus* e *N. laticaudatus*).

Para compor o grupo externo e polarizar os caracteres nas análises de distância e filogenética foram incluídos 10 espécimes para o gene 12/16S e seis espécimes para o gene RAG2, representantes de três gêneros da família Vespertilionidae, e quatro espécimes para gene 12/16S e três espécimes para o gene RAG2, representantes de dois gêneros da família Emballonuridae (Tabela 1).

O número de espécimes analisados de cada táxon foi variável em decorrência do número de amostras de tecidos colecionados disponível no laboratório de Chiroptera, e do número de captura de espécimes e obtenção de amostras de alguns táxons.

Extração de DNA genômico e amplificações

O DNA genômico foi extraído de fragmentos de tecido fresco ou congelado à -20°C , de fígado, rim, pulmão e músculo. As extrações de DNA foram realizadas segundo protocolo de Sambrook *et al.* (1989) com modificações.

Basicamente o método envolveu o rompimento das células com tampão de lise (10mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% Tween 20 ou SDS 2%), seguida de digestão enzimática com proteinase K (200 $\mu\text{g/ml}$) a 37°C *overnight*. A solução viscosa obtida foi centrifugada, as proteínas precipitadas com acetato de

potássio (5M) e o DNA precipitado pela adição de etanol absoluto gelado. O DNA obtido foi recolhido e diluído em tampão TE (10 mM Tris/1 mM EDTA).

A qualidade e quantidade do DNA extraído foi avaliada em espectrofotômetro, através de medidas da absorbância das amostras, efetuadas em 230, 260 e 280 nm (Werman *et al.* 1996).

As amplificações por reação em cadeia de polimerase (PCR) foram conduzidas segundo o protocolo descrito por Morales *et al.* (1993) para o gene 12/16S, com a utilização dos primers: Primer1 - 5' TGG GAT TAG ATA CCC CAC TAT 3' e Primer2 - 5' TGA TTA TGC TAC CTT TGC ACG GT 3', e por Lewis-Oritt *et al.* (2001) para o gene RAG2, com a utilização dos primers: RAG2 R1 - 5' GGC TGG CCC AA(AG) AGA TCC TG 3' e RAG2 F1 - 5' G(AG)A AGG ATT TCT TGG CAG GAG T 3'. Todas as reações foram realizadas em termociclador *Perkin Elmer – Gene Amp PCR System*.

Os produtos amplificados nas reações de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% solubilizado em tampão TAE 1X e corado com brometo de etídio para visualização em luz ultra violeta. O tamanho dos produtos obtidos nas reações foi estimado com o marcador de peso molecular *ladder* de 100pb (*BioLabs* e *AMRESCO*).

Análise molecular

As seqüências amplificadas foram submetidas a digestão completa dupla (associação de duas enzimas) e simples (uma única enzima), para a determinação do padrão de variação das seqüências e haplótipos. Foram utilizadas dez enzimas de

restrição: *HaeIII*, *HindIII*, *PstI*, *XhoI*, *DraI*, *ScaI*, *DdeI*, *BglIII*, *EcoRI*, *RsaI*. Cada 6µl do amplificado foi digerido com três unidades de enzima e a digestão foi realizada conforme as especificações dos fabricantes. As duplas digestões foram realizadas observando-se a compatibilidade dos tampões envolvidos nas reações, onde, oito das 10 enzimas foram associadas à enzima *EcoRI*. Para a enzima *RsaI* cujo tampão não foi compatível, o procedimento adotado foi o de digestão simples, também utilizado para a enzima *EcoRI*, como controle nas digestões duplas. Após as digestões os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados em luz ultra violeta. Os fragmentos foram identificados por tamanho em pares de bases (pb) e pela enzima que os gerou.

Análise estatística e filogenética

Para as análises filogenéticas foram construídas duas matrizes de presença (1) e ausência (0) dos fragmentos obtidos a partir das digestões. Os dados foram submetidos à análises de distância e filogenética pelo programa PAUP 4.0 beta (Swofford, 2002).

Antes de iniciadas as análises, o conjunto de dados obtidos e registrados nas matrizes binárias foi testado quanto ao sinal filogenético. Para isso foi aplicado o teste estatístico g1 de assimetria, o qual foi calculado para os táxons definidos para o grupo interno a partir de 10⁶ árvores geradas aleatoriamente, e os valores obtidos foram comparados com Hillis & Huelsenbeck (1992).

Os métodos para construção de árvores foram: de distância, com os algoritmos *neighbor-joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) e *unweighted pair group*

method with arithmetic means (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973) e o método baseado em otimização dos dados, o da Máxima Parcimônia (MP). Para esta última análise, os caracteres foram considerados não ordenados e igualmente ponderados e o processo de busca de árvores utilizado foi o método *branch and bound* (Hendy & Penny, 1982). As análises de distâncias geradas pelo programa PAUP foram baseadas no modelo matemático de Nei & Li (1979). O teste de confiança utilizado para as matrizes de distância e filogenética foi o de *Bootstrap* com 1000 interações (Felsenstein 1985).

Resultados

As amplificações por PCR com os dois pares de primers utilizados geraram fragmentos de aproximadamente 1500 pb para o gene mitocondrial 12/16S, e cerca de 1400 pb para o gene nuclear RAG2. Após as digestões completas (duplas e simples) pelas 10 endonucleases e o registro dos resultados foram reunidos um total de 142 caracteres para o gene mitocondrial 12/16S, e 68 caracteres para o gene nuclear RAG2.

Na análise de parcimônia dos dados do gene mitocondrial, 81 caracteres foram constantes, 32 variáveis não informativos e 29 informativos filogeneticamente. Para o gene nuclear, 37 caracteres foram constantes, 19 variáveis não informativos e 18 informativos filogeneticamente.

A análise dos vários arranjos obtidos utilizando-se para a polarização dos caracteres as oito espécies pertencentes às famílias Vespertilionidae e Emballonuridae, mostrou que os dendogramas gerados pelos diferentes métodos

foram semelhantes, independente do grupo externo utilizado, com pequena variação nos valores de confiança gerados pelo *bootstrap*.

Por isso são apresentadas as topologias onde *R. naso* é o representante do grupo externo.

Gene mitocondrial 12/16S

Os dados obtidos para o gene mitocondrial apresentaram um índice de consistência de (IC) = 0,8095, índice de homoplasia (IH) = 0,1905 e índice de retenção (IR) = 0,5862. A análise de 10^6 árvores geradas aleatoriamente produziu um $g1 = -0,493010$, o qual apresentou desvio à esquerda indicativo de sinal filogenético.

Os dendogramas resultantes das análises de distância por UPGMA, NJ e máxima parcimônia estão apresentados na Figura 1. Nas análises de distância pelos algoritmos de NJ e UPGMA os agrupamentos formados e observados nas Figuras 1A e B evidenciam um grupo com *Eumops glaucinus* e *Eumops perotis*, que apresentou um valor de *bootstrap* de 57% para NJ e 93% para UPGMA. *Nyctinomops macrotis* aparece como táxon irmão deste grupo com 75% de *bootstrap* para NJ e 59% para UPGMA. Nos dois algoritmos *Molossus rufus* aparece como táxon irmão ao grupo *Molossus molossus* e *Molossops temminckii*, agrupamento este que na análise por UPGMA apresentou um valor de *bootstrap* de 71%. Em ambas análises *N. laticaudatus* aparece ocupando posição basal em relação a todos os outros 10 táxons.

Na Figura 1C é possível observar os agrupamentos formados pela análise de máxima parcimônia. O grupo formado para o gênero *Cynomops*, com *C. abrasus*, *C. planirostris* e *E. bonariensis* ocupou posição basal em relação aos outros grupos de Molossidae. *Nyctinomops macrotis* e *N. laticaudatus* constituem um grupo irmão ao grupo com três das quatro espécies de *Eumops* (*E. perotis*, *E. glaucinus* e *E. auripendulus*).

O táxon *M. temminckii* apresenta-se como grupo irmão a *E. glaucinus*, *E. perotis*, *E. auripendulus*, *N. laticaudatus*, *N. macrotis*, *M. rufus* e *M. molossus*. Não foram obtidos valores de *bootstrap* representativos, relativos a esta análise.

Nas três análises o táxon *E. bonariensis* apresentou relação de proximidade com *C. planirostris*.

Gene nuclear RAG2

Os dados obtidos para o gene nuclear apresentaram índice de consistência de (IC) = 0,9677, índice de homoplasia (IH) = 0,0323 e índice de retenção (IR) = 0,9333. O valor de g_1 obtido a partir de 10^6 árvores geradas aleatoriamente foi -0,985046 indicativo de sinal filogenético.

Na Figura 2 estão representados os dendogramas resultantes das análises de distância por UPGMA, NJ e máxima parcimônia. A grande similaridade genética de alguns táxons considerados nas análises de distância pode ser facilmente observada nos agrupamentos formados e apresentados na Figura 2A e B. O grupo formado por espécies do gênero *Eumops*, com os táxons *E. bonariensis*, *E. perotis*, *E. glaucinus* e *E. auripendulus* apresenta-se bem apoiado

pelo valor significativo de *bootstrap* de 79% na análise de NJ, e para as espécies *E. perotis*, *E. auripendulus* e *E. glaucinus* pela análise de UPGMA com 81% de *bootstrap*.

Um outro grupo formado pelo algoritmo UPGMA foi *M. molossus*, *M. rufus* e *N. laticaudatus*, este último como táxon irmão dos outros, sendo o agrupamento fortemente apoiado por índice de confiança de 91%.

A topologia obtida a partir da análise de máxima parcimônia para os dados do gene nuclear RAG2 identificou um grupo com três das quatro espécies de *Eumops* (*E. glaucinus*, *E. perotis* e *E. auripendulus*), com apoio de 91% de *bootstrap*. *Molossus molossus* e *M. rufus*, táxons irmãos de *N. laticaudatus* e *E. bonariensis* irmão dos outros, com apoio de *bootstrap* de 50% (Figura 2C).

Discussão

Poucos são os trabalhos referentes aos relacionamentos filogenéticos das espécies pertencentes à família Molossidae, e a maioria deles estão baseados em dados morfológicos e, muitas vezes, referem-se aos relacionamentos supragenéricos (Freeman, 1981, Gregorin & Taddei, 2002). Neste contexto, o resultado do presente trabalho é inédito e promissor.

O número de caracteres gerados pelo RFLP para as seqüências gênicas mitocondrial (142 caracteres, sendo que 29 foram informativos) e nuclear (68 caracteres, sendo que 18 foram informativos), a partir da digestão pelas 10 endonucleases foi bastante significativo, a ponto de detectar a grande variação interespecífica que tem caracterizado alguns táxons de Molossidae.

O teste estatístico g1, aplicado para avaliar a qualidade dos dados envolvidos na análise, mostrou que os valores para os dois conjuntos de dados apresentaram distribuição assimétrica, com desvio indicativo da presença de sinal filogenético. Contudo, foi observado uma diferença entre o valor de g1 obtido para o gene mitocondrial quando comparado com o obtido para o gene nuclear, que foi aproximadamente o dobro do mitocondrial, indicando para o gene nuclear o maior sinal filogenético.

O valor g1 obtido para o gene mitocondrial é considerado estatisticamente crítico quando aplicado os critérios de Hillis & Huelsenbeck (1992) para detecção de sinal filogenético de genes. Segundo os autores, valores baixos de g1 (próximo de 0) não estão só relacionados apenas com a qualidade dos dados, mas também, com o número de táxons e caracteres envolvidos na análise.

Apesar do valor baixo de g1 para os dados gerados pelo gene mitocondrial, os valores obtidos para os índices de consistência e retenção foram altos, e as homoplasias foram baixas, garantindo suporte estatístico para o conjunto de dados avaliados para este gene, assim como para o gene nuclear, onde os índices de consistência e retenção obtidos foram robustos e apresentaram poucas homoplasias.

As diferenças na qualidade dos dados gerados pelos dois genes está, provavelmente, relacionada à natureza do material genético, especialmente porque a taxa e o tipo de variação a que cada nucleotídeo está sujeito é diferente nos genes nucleares e mitocondriais, onde as taxas de substituições de nucleotídeos de regiões codificadoras é maior do que nos genes nucleares (Springer *et al.*, 2001).

Esta característica tem permitido alguns autores concluir que os genes nucleares são mais eficientes que os mitocondriais nas reconstruções dos clados (Springer *et al.*, 2001).

Nas análises de distância e parcimônia, as topologias obtidas para os dois genes, apesar das diferenças no número de espécies, fragmentos e nos valores de g1 observados para os genes nuclear RAG2 e mitocondrial 12/16S, apresentaram algumas congruências como foi o caso do agrupamento dos táxons *Eumops*, *Molossus* e *Nyctinomops*.

A presença de agrupamentos envolvendo espécies do gênero *Eumops* (*E. perotis* e *E. glaucinus*), agrupamentos estes suportados pelas várias análises pelos dois diferentes conjuntos de dados, evidencia que o grupo é robusto. Contudo, o agrupamento que apresentou melhor suporte foi aquele obtido a partir dos dados do gene RAG2, que incluiu os quatro táxons de *Eumops* (*E. glaucinus*, *E. auripendulus*, *E. perotis* e *E. bonariensis*), o que não ocorreu nas análises do gene mitocondrial, onde os táxons não apresentaram posição definida dentro do grupo, nas três diferentes análises para este conjunto de dados.

Entre as espécies pertencentes ao gênero *Eumops*, *E. glaucinus* e *E. perotis* são as mais distintas morfologicamente. *Eumops perotis* foi considerado por Freeman (1981) um grupo distinto feneticamente das outras espécies de *Eumops* e mais associado com outros grupos de Molossidae, como o complexo *Tadarida-Otomops*. Citogeneticamente algumas espécies do gênero também são caracterizadas por variação cromossômica no número, morfologia e padrão de bandas (Warner, 1974; Morielle-Versute *et al.*, 1988; 1996).

Finato *et al.* (2000), a partir da análise de hibridação *in situ* fluorescente com seqüências repetitivas (TTAGGG)_n em espécimes de *E. glaucinus* e *E. perotis*, sugeriram que o cariótipo de *E. glaucinus* tenha derivado do cariótipo de *E. perotis* através de eventos de fusões Robertsonianas. *Eumops auripendulus* parece ocupar posição intermediária entre as duas outras espécies.

A falta de consistência nos relacionamentos apresentados por alguns táxons foi observada pelas diferentes análises e evidenciada nos dendogramas, a exemplo do táxon *E. bonariensis* que, nas análises de parcimônia para o gene nuclear RAG2, apresentou-se em ramo distinto à outras espécies do agrupamento *Eumops*, associando-se a *N. laticaudatus* como táxons irmãos ao grupo *M. molossus* e *M. rufus*. O mesmo ocorreu nas análises de parcimônia, UPGMA e NJ para o gene mitocondrial, onde *E. bonariensis*, ora apareceu como táxon irmão do grupo *Cynomops abrasus* e *C. planirostris*, ora formando um grupo com *C. planirostris*, e ainda, aparecendo como táxon basal a *E. auripendulus*, *N. macrotis*, *E. glaucinus*, *E. perotis*, *M. rufus*, *C. abrasus*, *M. temminckii* e *M. molossus*. Estes resultados reforçam a complexidade encontrada nas espécies pertencentes ao gênero *Eumops*.

Eger (1977) considerou *E. bonariensis* um grupo bastante complexo, e o táxon estatisticamente mais diverso, apresentando variações morfométricas significativas quando comparado às outras sete espécies e subespécies estudadas no seu trabalho (*E. glaucinus glaucinus*, *E. perotis californicus*, *E. perotis perotis*, *E. trumbulli*, *E. underwoodi*, *E. auripendulus* e *E. maurus*). Freeman (1981), a partir de dados morfológicos apontou *E. hansae* como o táxon mais basal para o

gênero, e por análise fenética destacou a proximidade deste com *E. bonariensis* e com *Nyctinomops aurispinosa*.

Um outro agrupamento persistente observado foi o grupo formado pelas espécies *M. molossus* e *M. rufus*, que apareceu associado a *Nyctinomops laticaudatus* (parcimônia e UPGMA, para o gene RAG2).

Os espécimes pertencentes à espécie *M. rufus*, quando comparados com outras espécies do gênero, são os que apresentam o maior tamanho, e algumas características morfológicas os distingue de *M. molossus*, tais como comprimento e cor de pelo. Apesar das variações morfológicas observadas para os espécimes deste grupo, o suporte estatístico foi bastante robusto, e a proximidade das duas espécies também foi relatada por Morielle-Versute *et al.* (1996) que identificaram extensa similaridade quanto a morfologia do cariótipo e ainda, muitas homologias no padrão de bandas G destas espécies.

É interessante destacar ainda, que os quatro táxons envolvidos nas diferentes distribuições dos ramos (*M. molossus*, *M. rufus*, *N. laticaudatus* e *M. temminckii*) apresentam número diplóide (2n) igual a 48, com variação no número fundamental, isto é, no número de braços dos cromossomos. Segundo Morielle-Versute *et al.* (1996) foram observadas homologias cromossômicas, também entre estes.

O agrupamento formado por *C. abrasus* e *C. planirostris* apareceu, na análise de parcimônia para o gene 12/16S, como grupo irmão de *E. bonariensis*. Nos outros algoritmos os dados evidenciaram ainda, uma relação entre os gêneros

Cynomops, *Molossops* e *Molossus*, os dois últimos aparecendo derivados em relação à *Cynomops*.

O gênero *Cynomops* é considerado por alguns autores como subgênero de *Molossops* (Freeman, 1981), enquanto outros o descrevem como gênero monofilético e *Molossops* aparece como grupo irmão (Peters *et al.* 2002).

Gardner (1974) a partir da análise cariotípica de espécies pertencentes ao gênero *Molossops* e *Cynomops* os reconheceu como gêneros distintos e apontou que *M. temminckii* (2n=48, NF=68) está mais relacionado cariotipicamente a *E. auripendulus* (2n=42, NF=62) porém, possivelmente eles têm histórias evolutivas diferentes. No estudo de Gregorin (2000), o gênero *Molossops* apareceu parafilético a *Cynomops* em árvore de consenso gerada a partir de dados morfológicos. Peters *et al.* (2002) em análise baseada em dados moleculares para genes mitocondriais e dados morfométricos, em combinação com estudos anteriores, sugeriram a elevação de *Cynomops* para o status de gênero. Além disso, os resultados desses autores suportaram que as espécies *Molossops temminckii* e *M. neglectus* sejam grupo irmão do grupo monofilético *Cynomops*.

Apesar das várias propostas no estabelecimento do limite entre as espécies deste táxon e de vários outros de Molossidae, os relacionamentos filogenéticos interespecíficos permanecem não resolvidos.

Conforme apresentado no presente estudo, os marcadores utilizados foram informativos e forneceram dados para as análises das relações envolvendo os táxons de Molossidae utilizados, e os resultados foram apoiados pela literatura. Contudo, algumas questões relevantes não foram totalmente esclarecidas, tais

como, o estabelecimento do táxon que ocupou a posição basal. Em nossa análise o gênero *Molossus* apresenta-se um grupo derivado em relação aos outros quatro gêneros, contrariando os dados cariotípicos de Warner *et al.* (1974) os quais colocaram *Molossus* como apresentando a condição cariotípica semelhante à ancestral ($2n=48$) para a família. Uma posição mais basal para *Molossus* é provável quando se considera dados cromossômicos, visto que os eventos de evolução cariotípica, não seguem o padrão dos eventos nos caracteres moleculares e morfológicos, explicando as incongruências observadas nos diferentes conjuntos de dados.

Para o melhor entendimento do relacionamento evolutivo de Molossidae baseado em análises moleculares é necessário a inclusão de novos táxons e a utilização de um número maior de marcadores. Contudo, análises parciais auxiliam o estabelecimento dos limites da variação das espécies e no entendimento de como elas têm respondido aos diferentes fatores e pressões evolutivas.

Referências

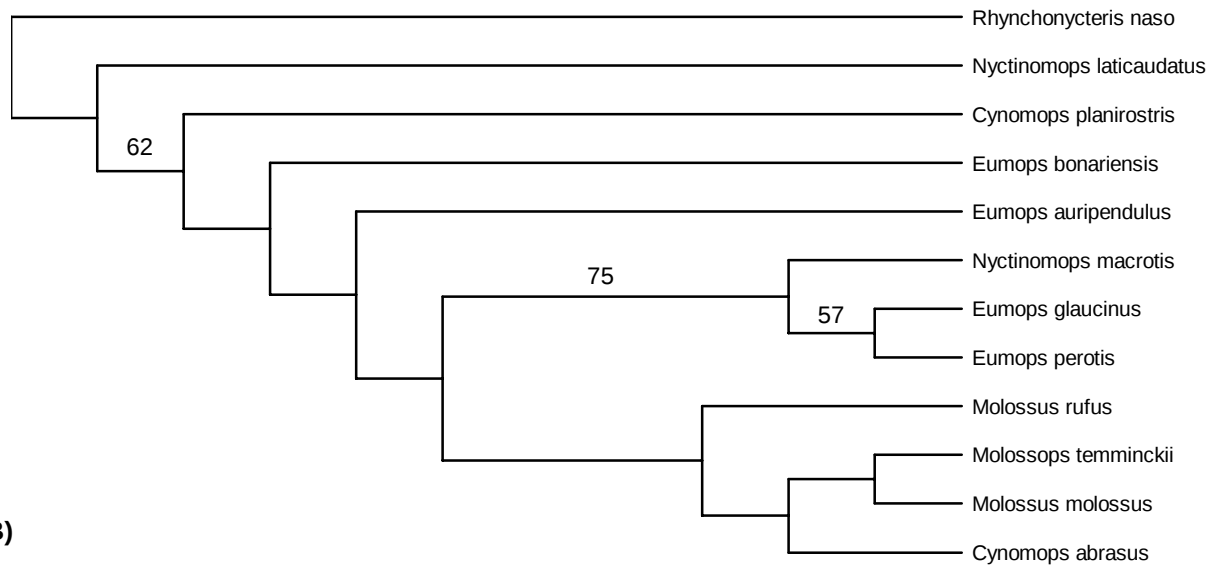
- Corneli, P S, Ward, R H (2000) Mitochondrial genes and Mammalian phylogenies: increasing the realibility of branch lenght estimation. *Mol Biol Evol* 17: 224-234,
- Eger, J L (1977) Systematics of the genus *Eumops* (Chiroptera: Molossidae). *Life Sci Contrib Royal Ont Mus* 110:1-69.
- Finato, A O, Varella-Garcia, M, Tajara, E H, Taddei, V A, Morielle-Versute, E (2000) Intrachromosomal distribution of telomeric repeats in *Eumops glaucinus* and *Eumops perotis* (Molossidae, Chiroptera). *Chromosome Res* 8:563-569.
- Felsenstein, J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Freeman, P W (1981) A multivariate study of the family Molossidae (Mammalia, Chiroptera): morphology, ecology, evolution. *Fildiana Zool* 7:1-105.
- Gardner, A L (1977) Taxonomic implications of the karyotypes of *Molossops* and *Cynomops* (Mammalia: Chiroptera). *Proc Biol Soc Wash* 89:45-549.
- Gregorin, R (2000) Filogenia de Molossidae Gervais, 1855 (Mammalia:Chiroptera). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo 247p.
- Gregorin, R, Taddei, V A (2002) Chave artificial para a identificação de molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). *J Neotrop Mammal* 9:13-32.
- Gregorin, R (2003) Comparative Morphology of the tongue in free-tailed bats (Chiroptera, Molossidae). *Iheringia, Sér Zool* 93:213-221.
- Hendy, M D, Penny, D (1982) Branch and bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. *Math Biosci* 59:277-290.
- Hillis, D M, Huelsenback, J P (1992) Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses. *J Hered* 83:189-195.
- Koopman, K F (1984) A sinopsis of the families of bats. *Bat Res News*. 25:25-29.
- Leite-Silva, C, Santos, N, Fagundes, V, Yonenega-Yassuda, Y, Souza, M J (2003) Karyotipic characterization of the bat species *Molossus ater*, *M. molossus*

-
- and *Molossops planirostris* (Chiroptera, Molossidae) using FISH and banding techniques. *Hereditas* 138:94-100.
- Lewis-Oritt, N, Van Den Bussche, R A, Baker, R J (2001) Molecular evidence for evolution of piscivory in *Noctilio* (Chiroptera: Noctilionidae). *J Mammal* 82:748-759.
- Morales, J C, Patton, J C, Bickham, J W (1993) Partial endonuclease digestion mapping of restriction sites using PCR-amplified DNA. *PCR Methods Appl* 2:228-233.
- Morielle-Versute, E, Goloni-Bertollo, E M Varella-Garcia, M Taddei, V A (1988) A chromosome banding study of *Eumops glaucinus*. *Rev Bras Genet* 11:791-795.
- Morielle-Versute, E, Varella-Garcia, M, Taddei, V A (1996) Karyotypic patterns of seven species of molossid bats (molossidae, Chiroptera) *Cytogenet Cell Genet* 72:26-33.
- Nei, M, Li, W (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Nat Acad Sci USA* 76:5269-5273.
- Nowak, R M (1999) Walker's Mammals of the world. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. 6th edition, I:253-470.
- Peters, S L, Lim, B K, Engstrom, M D (2002) Systematics of dog-faced bats (*Cynomops*) based on molecular and morphometric data. *J. Mammal* 83:1097-1110.
- Russo, C A M, Takezaki, N, Nei, M (1996) Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. *Mol Biol Evol* 13:525-536.
- Ryan M J (1991) Comparative morphology of the glans penis in *Molossus*, *Promops*, and *Eumops* (Chiroptera: Molossidae). *Bull Am Mus Nat Hist* 206:122-137.
- Saitou, N; Nei, M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Sambrook, J, Fritsch, F, Maniatis T (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Sprong Harbor. New York.
- Simmons, N B (1998) A reappraisal of interfamilial relationships of bats In: Kunz, T H and Racey, P A (eds) *Bat: biology and conservation*. Smithsonian Institution Press, London. pp. 3-26.

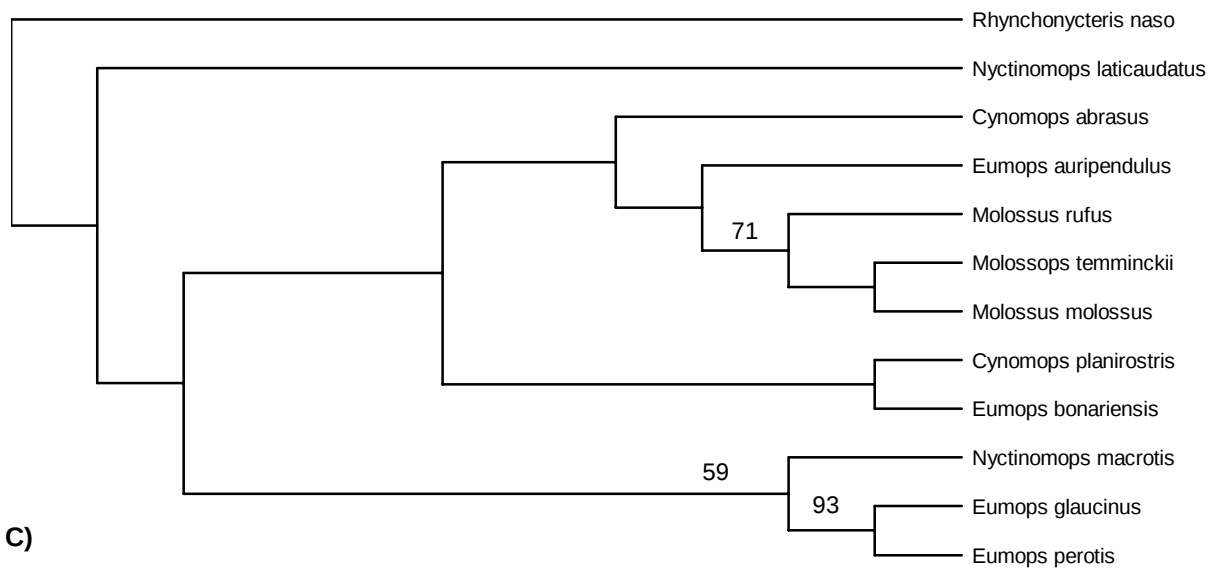
-
- Simmons, N B, Conway, T M (2001) Phylogenetic relationships of mormoopid bats (Chiroptera: Mormoopidae) based on morphological data. *Bull Am Mus Nat Hist* 258:100.
- Sneath, P H A, Sokal, R R Numerical taxonomy. San Francisco: Freeman, W H 1973.
- Springer, M S, Debry, R W, Douady, C, Amrine, H M, Madsen, O, Jong, W W, Stanhope, M J (2001) Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction. *Mol Biol Evol* 18:132-143.
- Sudman, P D, Barkeley L J, Hafner, M S (1994) Familial affinity of *Tomopeas ravus* (Chiroptera) based on protein eletrophoretic and cytochrome b sequence data. *J. Mammal* 75:365-377.
- Swofford, D L PAUP*. (2002) Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Warner, J W, Patton, J L, Gardner, A L, Baker, R J (1974) Karyotypic analyses of twenty-one species of molossid bats (Molossidae: Chiroptera). *Can J Genet Cytol* 16:165-176.
- Werman, S D, Springer, M S, Britten, R J (1996) Nucleic Acids I: DNA-DNA hybridization. In: Hillis, D M, Moritz, C Mable, B K (eds.) *Molecular Systematics*. 2 ed. Sianuer Associates, Inc. Publishers Sunderland. Massachusetts, USA. 180 pp.

Figura 1: Dendogramas representativos das análises A) *Neighbor-joining* (NJ), B) UPGMA e C) Parcimônia Máxima, para os dados gerados a partir do gene mitocondrial 12/16S. Valores de *bootstrap* apresentado nos nós dos ramos.

A)



B)



C)

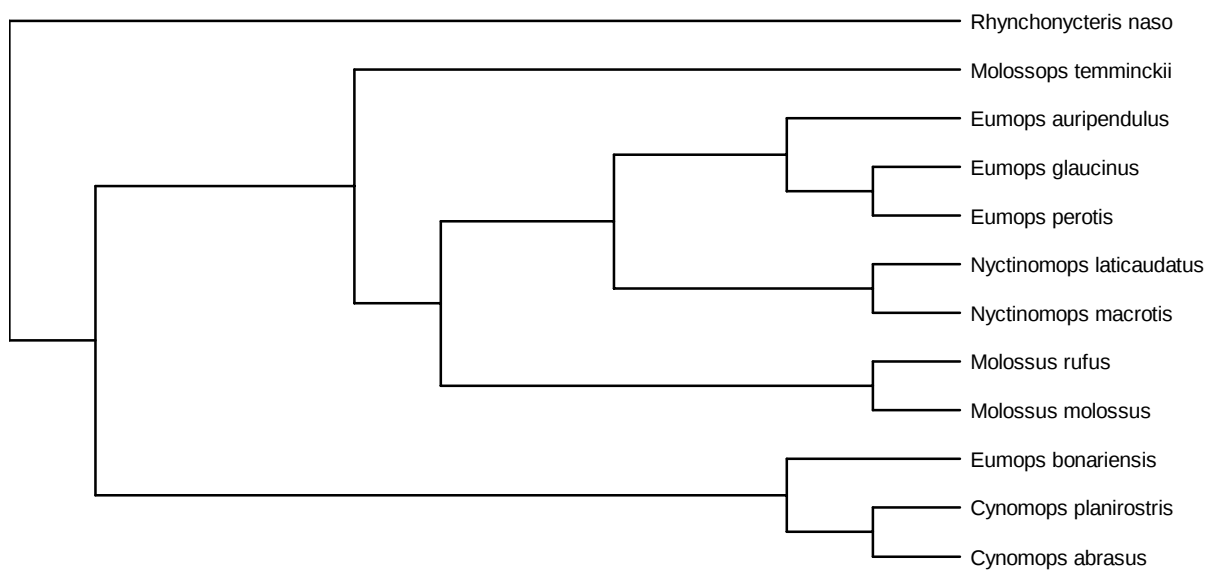


Figura 2: Dendogramas representativos das análises A) *Neighbor-joining* (NJ), B) UPGMA e C) Parcimônia Máxima, para os dados gerados a partir do gene nuclear RAG2. Valores de *bootstrap* apresentado nos nós dos ramos.

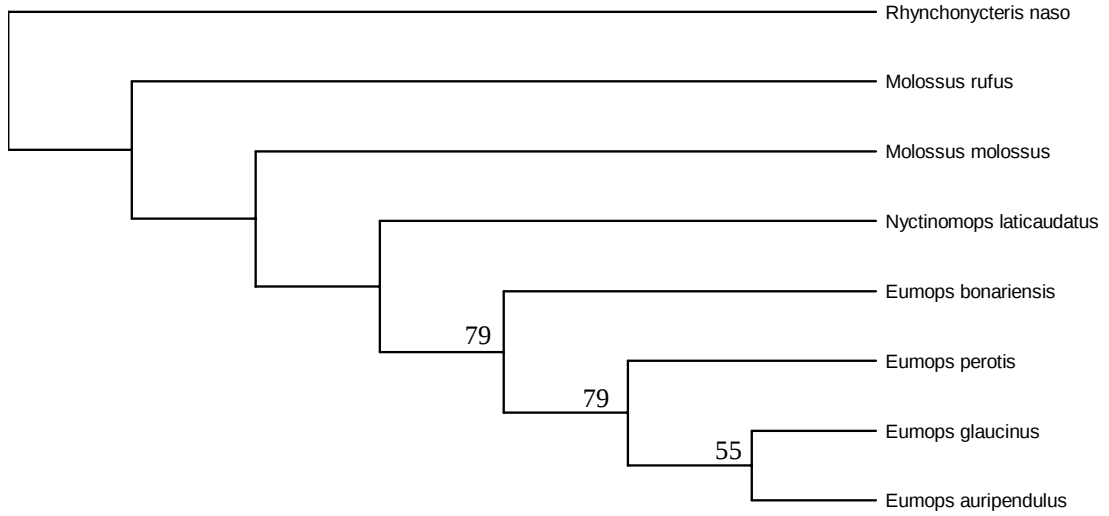
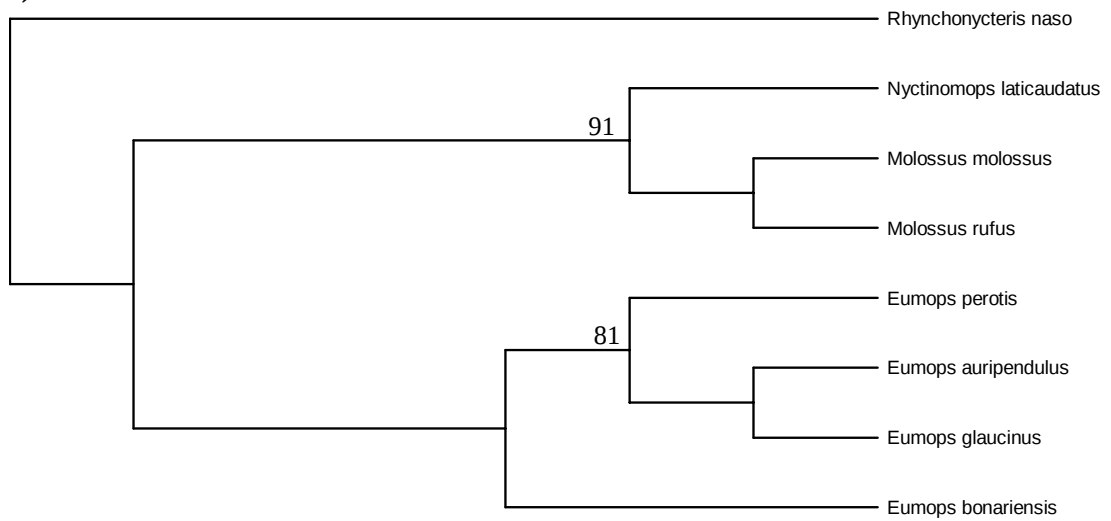
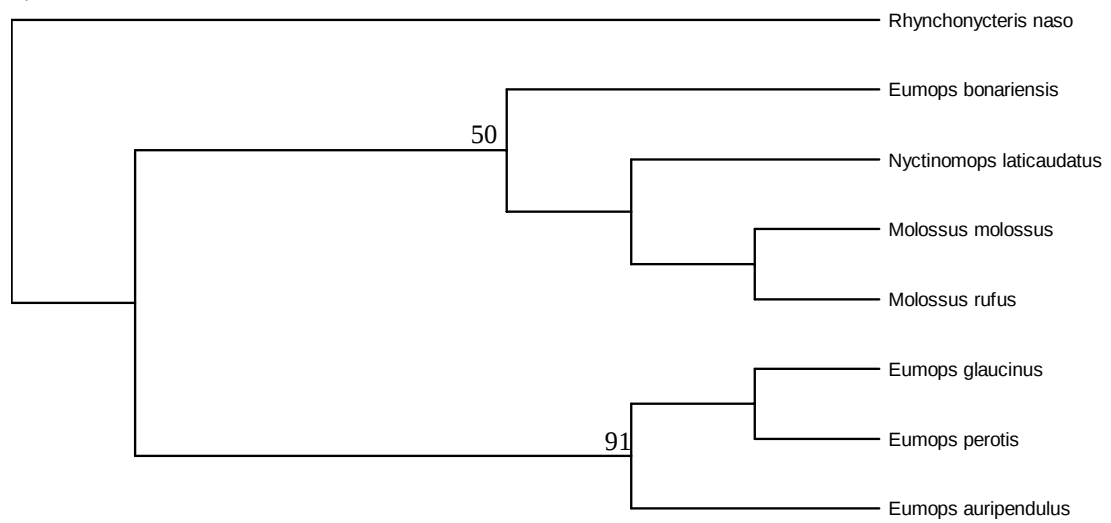
A)**B)****C)**

Tabela 1: Espécies e número de espécimes analisados de cada gene. (* espécies utilizadas como grupo externo).

Espécies	Gene	
	12/16S	RAG2
<i>Cynomops abrasus</i>	5	0
<i>Cynomops planirostris</i>	1	0
<i>Eumops auripendulus</i>	3	2
<i>Eumops bonariensis</i>	1	1
<i>Eumops glaucinus</i>	5	3
<i>Eumops perotis</i>	5	3
<i>Molossops temminckii</i>	6	0
<i>Molossus rufus</i>	5	4
<i>Molossus molossus</i>	6	4
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	6	5
<i>Nyctinomops macrotis</i>	6	0
<i>Eptesicus furinalis</i> *	4	2
<i>Lasiurus ega</i> *	1	1
<i>Lasiurus cinereus</i> *	1	1
<i>Lasiurus blossevillii</i> *	1	1
<i>Myotis nigricans</i> *	6	1
<i>Myotis riparius</i> *	1	0
<i>Peropteryx macrotis</i> *	1	1
<i>Rhynchonycteris naso</i> *	3	2
Total	67	31

**ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS GÊNICAS MITOCONDRIAL E NUCLEAR EM
ESPÉCIES DE PHYLLOSTOMIDAE POR MEIO DA TÉCNICA PCR-RFLP
(CHIROPTERA – MAMMALIA)**

Sandra Regina de Carvalho Marchesin¹ e Eliana Morielle Versute²

*Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas,*

¹*Departamento de Biologia, São José do Rio Preto, SP, Brasil*

²*Departamento de Zoologia e Botânica, São José do Rio Preto, SP, Brasil*

Palavras Chaves: evolução, RAG2, mtDNA, Chiroptera, marcadores genéticos

Key words: evolution, RAG2, mtDNA, Chiroptera, genetics markers

Resumo

A análise PCR-RFLP em sequências gênicas mitocondrial (12/16S) e nuclear (RAG2) foi utilizada para analisar a variabilidade genética em quatro espécies de Phyllostomidae (*Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata* e *Phyllostomus discolor*). A determinação do relacionamento evolutivo dos táxons foi baseada em 66 caracteres gerados para o gene RAG2 e 107 para o gene mitocondrial 12/16S. A qualidade dos dados gerados por ambos marcadores indicou um forte

sinal filogenético, assim como valores elevados para o índice de consistência e retenção que ficaram entre 1 e 0,9, e baixos para as homoplasias: 0,07 para o gene nuclear RAG2 e zero para o gene mitocondrial. A análise filogenética permitiu confirmar a hipótese de monofilia de *A. lituratus* e *A. planirostris*, e apontar *C. perspicillata* como grupo irmão destes. *Phyllostomus discolor* apresentou-se basal em relação aos outros três táxons examinados.

Abstract

The PCR-RFLP analysis in mitochondrial (12/16S) and nuclear (RAG2) gene sequences was applied to assess the genetic variability of four species of Phyllostomidae (*Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata* and *Phyllostomus discolor*). The determination of the evolutive relationships of taxa was based in 66 characters generated for the genes RAG2 and 107 for the mitochondrial gene 12/16S. The quality of the data generated by both markers indicated a strong phylogenetic signal, as well as high values for the consistency and retention index, which ranged from 1 to 0,9, and low values for homoplasies, which was 0,07 for the nuclear gene RAG2 and zero for the mitochondrial gene. The phylogenetic analysis supports the hypothesis of monophyly between *A. lituratus* and *A. planirostris*, and indicates *C. perspicillata* as a related group. *P. discolor* presented a basal position in relation to the other three taxa assessed.

Introdução

A família Phyllostomidae é, entre as famílias de morcegos neotropicais, a que apresenta maior representatividade, com cerca de 53 gêneros e 146 espécies, das quais 82 ocorrem no Brasil (Taddei, 1996; 1997; Wetterer *et al.*, 2000).

Os registros fósseis mais antigos para a família datam do Mioceno e Pleistoceno na América do Sul e América do Norte (McKenna & Bell, 1998) e, a irradiação adaptativa dos Phyllostomidae, aparentemente, foi uma resposta para explorar os vários nichos alimentares no Novo Mundo (Smith, 1976).

Os membros da família Phyllostomidae são anatomicamente complexos, apresentando formas bastante diversificadas. Este fato, entre outros, tem feito com que os filostomídeos sejam os morcegos mais intensivamente estudados nos últimos 40 anos, sendo notável o aumento significativo de análises comparativas usando diferentes caracteres oriundos de conjuntos de dados independentes, e que tem possibilitado a comparação de hipóteses filogenéticas, na tentativa de entender sua história evolutiva (Smith, 1976; Griffiths, 1982; Baker *et al.*, 1989; Van Den Bussche & Baker, 1993; Baker *et al.*, 2000; Wetterer *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2003).

Contudo, a diversidade e a falta de congruência de alguns resultados apresentados por estes diferentes conjuntos de dados levam à formulação de hipóteses alternativas, determinando considerável confusão e desacordos em estudos sistemáticos e filogenéticos de alguns gêneros e espécies (Van Den Bussche & Baker, 1993; Baker *et al.*, 2000; Wetterer *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002).

Os estudos sistemáticos têm subdividido a família em cinco a 11 subfamílias, e apesar de algumas variações quanto a posição dos diferentes gêneros nas subfamílias reconhecidas, e mesmo no inter-relacionamento entre as subfamílias, os estudos em geral apresentaram consenso quanto a monofilia da família, assim como no reconhecimento de que Desmodontinae é grupo irmão dos demais filostomídeos (Koopman 1993,1994; Wetterer *et al.* 2000; Jones *et al.* 2002; Baker *et al.*, 2003).

Entre os Stenodermatinae, grande atenção tem sido dada aos relacionamentos de alguns gêneros como *Sturnira* e *Artibeus* e suas espécies, dos quais este é o mais complexo (Van Den Bussche, 1992; Lim, 1993; Van Den Bussche *et al.*,1993,1998; Wetterer *et al.*, 2000).

A maioria dos estudos filogenéticos mais recentes tem explorado uma enorme gama de marcadores genéticos, destacando-se entre esses o DNA mitocondrial, que por suas características, como herança materna e alta taxa de evolução (10 vezes superior a um gene de cópia nuclear), tem sido amplamente utilizado em estudos genéticos e evolutivos (Arias & Infante-Malachias, 2001).

Mais recentemente, alguns estudos têm mostrado que seqüências do genoma nuclear também representam marcadores genéticos importantes para análise e detecção de variação intra e interespecífica. Entre os genes nucleares que têm sido utilizados para inferências filogenéticas estão o RAG2 (*recombination activating gene 2*) e o fibrinogenio (F_{GB}-I7) que, por mostrarem-se conservados, têm fornecido evidências adicionais aos dados moleculares deficientes obtidos em

estudos evolutivos de táxons superiores (Baker *et al.*, 2000; Wickliffe *et al.*, 2003).

Baker *et al.* (2000), a partir da análise de seqüências de DNA nuclear RAG2, sugeriram uma proposta filogenética alternativa à de Wetterer *et al.* (2000) para Phyllostomidae. Alguns dos relacionamentos apresentados foram potencialmente reforçados quando os dados foram associados à outros obtidos das análises de seqüências mitocondriais (Baker *et al.* 2003). Para os autores dos trabalhos, o gene RAG2 é particularmente útil nos estudos com filostomídeos, porque sua função na resposta imunológica provavelmente não está ligada às características morfológicas que frequentemente têm sido utilizadas nas classificações de Phyllostomidae, e que mascaram a condição basal do relacionamento filogenético do grupo.

O objetivo do presente trabalho foi analisar através de PCR-RFLP seqüências do gene nuclear RAG2 e mitocondrial 12/16S de quatro espécies de filostomídeos e utilizar os dados em análises evolutivas e filogenéticas.

Material e Métodos

Espécies

Foram avaliados no presente estudo quatro espécies da família Phyllostomidae: *Artibeus lituratus*, *A. planirostris*, *Carollia perspicillata* e *Phyllostomus discolor*. De um total de 20 espécimes, 12 foram analisados quanto a seqüência do gene nuclear RAG2 e 21 do gene mitocondrial 12/16S. Para

polarização dos caracteres foram utilizados como grupo externo, espécimes das espécies *Peropteryx macrotis* (1) e *Rhynconycteris naso* (2) da família Emballonuridae, para o gene nuclear RAG2, e *Molossus molossus* (6) e *Molossus rufus* (5) da família Molossidae, para o gene 12/16S.

Extração de DNA genômico e amplificações

O DNA genômico foi extraído de fragmentos de tecido fresco ou congelado a -20°C de fígado, rim, pulmão e músculo. As extrações de DNA foram realizadas segundo protocolo de Sambrook *et al.* (1989) com modificações.

Inicialmente foi induzida a lise das células com tampão de lise (10mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% Tween 20 ou SDS 2%), seguida de digestão enzimática com proteinase K (200µg/ml) a 37°C *overnight*. A solução viscosa obtida foi centrifugada, as proteínas precipitadas com acetato de potássio (5M) e o DNA precipitado pela adição de etanol absoluto gelado. O DNA obtido foi recolhido e diluído em tampão TE (10 mM Tris/1 mM EDTA).

A qualidade e quantidade do DNA extraído foi avaliada em espectrofotômetro, através de medidas da absorbância das amostras, efetuadas em 230, 260 e 280 nm (Werman *et al.* 1996).

As amplificações por reação em cadeia de polimerase (PCR) foram conduzidas segundo o protocolo descrito por Morales *et al.* (1993), com a utilização dos primers: Primer1 - 5' TGG GAT TAG ATA CCC CAC TAT 3' e Primer2 - 5' TGA TTA TGC TAC CTT TGC ACG GT 3' para o gene 12/16S, e por Lewis-Oritt *et al.* (2001), para o gene RAG2 com a utilização dos primers: RAG2 R1 - 5' GGC

TGG CCC AA(AG) AGA TCC TG 3' e RAG2 F1 - 5' G(AG)A AGG ATT TCT TGG CAG GAG T 3'. Todas as reações foram realizadas em termociclador *Perkin Elmer – Gene Amp PCR System*.

Os produtos amplificados nas reações de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% solubilizado em tampão TAE 1X e corado com brometo de etídio, para visualização em luz ultra violeta. O tamanho dos produtos obtidos nas reações, foi estimado com o marcador de peso molecular *ladder* de 100pb (*BioLabs* e *AMRESCO*).

Análise molecular

As seqüências amplificadas foram submetidas à digestão completa dupla (associação de duas enzimas) e simples (uma única enzima), para a determinação do padrão de variação das seqüências e haplótipos. Foram utilizadas 10 enzimas de restrição: *HaeIII*, *HindIII*, *PstI*, *XhoI*, *DraI*, *ScaI*, *DdeI*, *BglII*, *EcoRI*, *RsaI*. Cada 6µl do amplificado foi digerido com três unidades de enzima, conforme as especificações dos fabricantes. As duplas digestões foram realizadas observando-se a compatibilidade dos tampões envolvidos nas reações onde, oito das 10 enzimas foram associadas à enzima *EcoRI*. Para a enzima *RsaI*, cujo tampão não foi compatível, o procedimento adotado foi o de digestão simples, também utilizado para a enzima *EcoRI*, utilizada como controle nas digestões duplas. Após as digestões os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados em luz ultra violeta. Os fragmentos foram identificados por tamanho em pares de bases (pb) e pela enzima que os gerou.

Análise estatística e filogenética

Para as análises filogenéticas foram construídas duas matrizes de presença (1) e ausência (0) dos fragmentos obtidos a partir das digestões. Os dados foram submetidos à análises de distância e filogenética pelo programa PAUP 4.0 beta (Swofford, 2002).

O conjunto de dados obtidos e registrados nas matrizes binárias foram testados quanto ao sinal filogenético, utilizando-se o teste estatístico g1 de assimetria, o qual foi calculado para os táxons definidos para o grupo interno, a partir de 10^6 árvores geradas aleatoriamente. Os valores obtidos foram comparados com Hillis & Huelsenbeck (1992).

Os métodos para construção de árvores foram distância, com os algoritmos *neighbor-joining* (NJ) e *unweighted pair group method with arithmetic means* (UPGMA), e o método baseado em otimização dos dados, o da Máxima Parcimônia (MP). Para esta última análise, os caracteres foram considerados não ordenados e igualmente ponderados, e o processo de busca de árvores utilizado foi o método *branch and bound* (Hendy & Penny, 1982). As análises de distâncias geradas pelo programa PAUP foram baseadas no modelo matemático de Nei & Li (1979). O teste de confiança utilizado para as matrizes de distância e filogenética foi o de *bootstrap* com 1000 interações (Felsenstein 1985).

Resultados

Os segmentos gênicos amplificados apresentaram aproximadamente 1400 pb para o gene nuclear RAG2 e 1500 pb para o gene mitocondrial 12/16S. As

digestões pelas endonucleases de restrição produziram 66 fragmentos para o gene nuclear e 107 fragmentos para o gene mitocondrial.

Gene nuclear RAG2

Antes de iniciadas as análises de distância e parcimônia, a qualidade dos dados gerados pelo marcador nuclear foi testada. O valor obtido para o teste estatístico $g1$ (-0,803522) indicou a presença de forte sinal filogenético. O índice de consistência para os dados foi (IC) = 0,9286, índice de homoplasia (IH) = 0,0714 e o índice de retenção (IR) = 0,8000.

Os dendogramas resultantes das análises de distância UPGMA e NJ estão representados nas Figuras 1A e B. É possível observar que as topologias resultantes das duas análises para o gene nuclear apresentaram arranjos diferentes. A análise de UPGMA apresenta um agrupamento com as duas espécies de *Artibeus* e, mais externamente a este e como grupo irmão aparece a espécie *C. perspicillata* e, *P. discolor* aparece mais basal. O agrupamento e a disposição dos ramos para os quatro táxons foram apoiados por um *bootstrap* alto de 80% (Figura 1A).

Na topologia resultante da análise por NJ (Figura 1B) é possível observar uma inversão dos ramos basais, que diferentemente do observado por UPGMA, apresentou *C. perspicillata* e *P. discolor*, agrupando-se em posição derivada às espécies *A. lituratus* e *A. planirostris*, que aparecem nesta análise como táxons irmãos ao grupo formado. O valor de confiança obtido para o relacionamento dos quatro táxons foi o *bootstrap* de 82%.

Observando a árvore de máxima parcimônia (Figura 2A), de maneira semelhante ao observado na análise de UPGMA, as espécies *A. lituratus* e *A. planirostris* formaram um grupo derivado, contudo, mais proximamente relacionado a este, aparece o táxon *P. discolor*, seguido de *C. perspicillata*, que ocupa uma posição mais basal em relação aos outros táxons. Um valor de *bootstrap* de 79% suporta o agrupamento envolvendo os quatro táxons.

Gene mitocondrial 12/16S

De maneira semelhante ao gene nuclear RAG2, o conjunto de dados utilizados nas análises de distância e filogenética foram testados quanto a sua qualidade. O valor de $g1$ (-2,04382) identificou um forte sinal filogenético para os dados, que apresentaram valores significativamente confiáveis nos índices de consistência, (IC) = 1,0000, homoplasia (IH) = 0,0000 e retenção (IR) = 1,0000.

Os dendogramas obtidos para as análises de distância por UPGMA e NJ para o gene mitocondrial (Figura 1C e D) evidenciam que, à semelhança do ocorrido com os dados gerados pelo gene nuclear em UPGMA, *A. lituratus* e *A. planirostris* formaram um grupo derivado do ramo que apresenta os táxons *C. perspicillata* e *P. discolor* como basais, mesmo utilizando táxons diferentes como grupo externo. Pela análise de NJ foi possível observar também, a inversão dos ramos basais, onde *C. perspicillata* e *P. discolor* aparecem formando um grupo derivado dos ramos que apresentam os táxons de *Artibeus*. O suporte estatístico para o conjunto dos quatro táxons foi alto para os dois algoritmos sendo, 51% para UPGMA e 86% para NJ.

A árvore mais parcimoniosa (Figura 2B) apresentou similaridade à topologia obtida pela análise de distância UPGMA, uma vez que *P. discolor* aparece como táxon irmão de *Artibeus* e *C. perspicillata*. O suporte de confiança para o ramo contendo os quatro táxons foi de 73%. O agrupamento formado pelos táxons *A. lituratus*, *A. planirostris* e *C. perspicillata*, nesta análise gerou uma politomia.

Discussão

A família Phyllostomidae constitui uma família taxonomicamente diversa e desde 1960, várias têm sido as alterações propostas para o reconhecimento de suas subfamílias, cujo número tem variado de cinco a 11 (Van Den Bussche, 1992; Koopman, 1994; McKenna & Bell, 1997; Wetterer *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2003).

As subfamílias Phyllostominae, Carollinae e Stenodermatinae, para as quais foram analisados representantes no presente trabalho, apresentam problemas no arranjo filogenético de seus membros, evidenciados principalmente quando se considera um determinado gênero e suas espécies, como o observado para *Artibeus* de Stenodermatinae (Van Den Bussche, 1992; Baker *et al.*, 2000).

Um outro aspecto que também provoca intensos debates, é o reconhecimento do monofiletismo dos membros de Phyllostominae e a relação dessa com as demais subfamílias, que em análises recentes como evidência total e supertree, apresenta um arranjo pobremente apoiado, apresentando várias incongruências (Wetterer, *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002).

Dados moleculares oriundos de marcadores nucleares e mitocondriais têm embasado muitas propostas de relacionamentos evolutivos em vários grupos de mamíferos e Chiroptera. As análises combinadas utilizando-se genes nucleares e mitocondriais parecem aumentar o sinal filogenético dos caracteres, que muitas vezes aparecem mascarados pelas homoplasias em conjuntos de dados individuais (Teeling *et al.*, 2000; Hoofer *et al.*, 2003).

No presente trabalho o número significativo de caracteres moleculares avaliados, tanto para o gene nuclear quanto para mitocondrial, apresentaram um forte sinal filogenético, que foi maior para os dados do gene mitocondrial.

Também evidenciando a qualidade dos dados moleculares estão os valores altos dos índices de consistência, e os baixos índices de homoplasias, de tal forma que as topologias obtidas nas análises de distância e parcimônia são consistentes, com valores de *bootstrap* significativos, reforçando os agrupamentos encontrados.

As relações entre as espécies de *Artibeus* têm sido intensamente questionadas (Honeycutt, 1981; Van Den Bussche, 1992; Lim, 1993; Wetterer *et al.*, 2000). Nas análises NJ as espécies *A. lituratus* e *A. planirostris* apareceram parafiléticas, relação observada também por Lim *et al.* (2004) e Scatena (2006) ao analisarem seqüências do gene citocromo b. Contudo, a prevalência de um clado monofilético com as duas espécies de *Artibeus* em três das seis análises efetuadas, e com dois grupos externos diferentes, dá suporte ao monofiletismo desses. Esta condição também foi apontada por Van Den Bussche *et al.* (1998), ao analisarem o padrão de restrição da região repetitiva do DNA satélite definida pela *EcoRI*, e variações detectadas em seqüências do gene mitocondrial citocromo b.

A condição basal para *Phyllostomus discolor*, apresentada em quatro topologias, também é apoiada pelos dados da literatura (Wetterer *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2003). Smith (1976) já havia levantado a hipótese de que os Stenodermatinae haviam se diferenciado dos estoques de Phyllostomatini e, provavelmente, de uma linhagem de *Phyllostomus*. Cromossomicamente, *Phyllostomus* também tem sido apontado como possuidor de um cariótipo semelhante ao primitivo para a família (Baker, 1973).

A interpretação mais difícil a ser considerada é para *C. perspicillata* que ora aparece basal ao agrupamento de *Artibeus*, ora basal à *P. discolor*, ora no mesmo grupo que *P. discolor* e de forma derivada.

Estudos recentes têm sido congruentes em apontar *Carollia* como mais derivado que *Phyllostomus*, e na maior parte das propostas ele sozinho ou com *Rhinophylla* tem constituído a subfamília Carollinae de Phyllostomidae (Koopman, 1994; Wetterer *et al.* 2000; Jones *et al.*, 2003; Baker *et al.*, 2003).

Baseados em dados cromossômicos e de albumina, Honeycutt & Sarich (1987) destacaram que a diversificação dos filostomídeos provavelmente ocorreu muito rapidamente, o que poderia explicar, em parte, algumas discrepâncias nas interpretações evolutivas.

As incongruências observadas quando são comparados os dados do presente trabalho, com outros da literatura, podem ser atribuídas aos diferentes conjuntos de dados utilizados nos vários estudos, à ocorrência de eventos homoplásicos ou ainda ao não estabelecimento preciso do estado dos caracteres primitivos ou derivados.

Apesar das variações, as topologias apresentadas pelos diferentes algoritmos e diferentes marcadores foram bem apoiadas pelos valores de *bootstrap* e estão consistentes com os dados da literatura para os táxons envolvidos neste estudo.

Os dados evidenciaram também, que a utilização do gene nuclear RAG2 e do gene mitocondrial 12/16S como marcadores constituem uma ferramenta importante e promissora nas análises filogenéticas em Chiroptera possibilitando os estudos comparativos e a determinação dos relacionamentos entre os táxons.

Referências

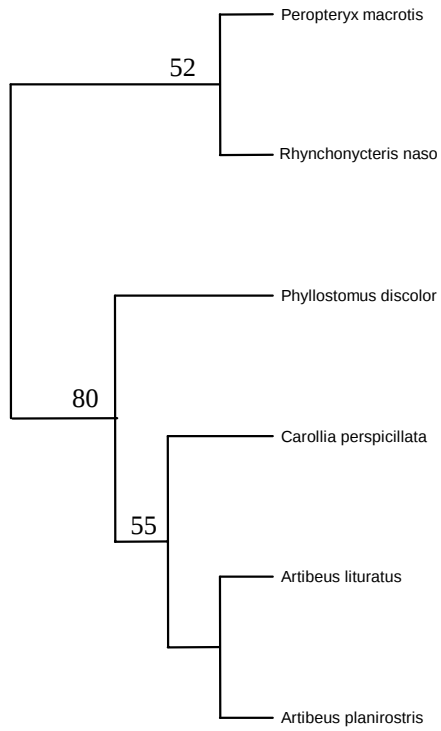
- Arias, M C, Infante-Malachias, M E (2001) RFLP: O emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismos no DNA In: Mاتيoli, S R (ed). *Biologia Molecular e Evolução*, Holos Editora. Ribeirão Preto, São Paulo pp 143-152.
- Baker, R (1973) Comparative cytogenetics of the New World leaf-nosed bats (Phyllostomatidae). *Period Biol* 75:37-45.
- Baker, R J, Hood, C S, Honeycutt, M R L (1989) Phylogenetic relationships and classification of the higher categories of the New World bat family Phyllostomidae. *Syst Zool* 38:228-238.
- Baker, R J, Porter, C A, Patton, J C, Van Den Bussche, R A (2000) Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. *Occas Pap Mus Tex Tech Univ* 202:1-16.
- Baker, R J, Hoofer, S R, Porter, C A, Van Den Bussche, R A (2003) Diversification among New World leaf-nosed bats: an evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic of DNA sequence. *Occas Pap Mus Tex Tech Univ* 230:1-32.
- Felsenstein, J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Griffiths, T A (1982) Systematics of the new world nectar-feeding bats (Mammalia, Phyllostomidae), based on the morphology of the hyoid and lingual Regions. *Am Mus Novitates* 2742:1-45.
- Hendy, M D, Penny, D (1982) Branch and bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. *Math Biosci* 59:277-290.
- Hillis, D M, Huelsenback, J P (1992) Signal, noise, and reliability in molecular Phylogenetic analyses. *J Hered* 83:189-195.
- Honeycutt, R H, Greenbaum, I F, Baker, R J, Sarich, V M (1981) Molecular evolution of vampire bats. *J Mammal* 62:805-811.
- Honeycutt, R L, Sarich, V M (1987) Albumin evolution and subfamilial relationships among New World leaf-nosed bats (Family Phyllostomidae). *J Mammal*. 68:508-517.
- Hoofer, S R, Reeder, S A, Hansen, E W, Van Den Bussche, R A (2003) Molecular Phylogenetics and taxonomic review of noctilionoid and vespertilionoid bats (Chiroptera:Yangochiroptera). *J Mammal* 84:809-821.

-
- Jones, K E, Purvis, A, Mclarnon; Bininda-Emonds, O R P, Simmons, N B (2002) A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). *Biol Rev* 77:223-259.
- Koopman, K F (1993) Order Chiroptera In: Wilson, D E and Reeder, D M (eds) *Mammals species of the world. A taxonomic and geographic reference* Smithsonian Institution Press, Washington and London. pp 137-241.
- Koopman, K F (1994) Chiroptera: Systematics. *Handbook of Zoology. Mammalia* 8:1-217.
- Lewis-Oritt, N, Van Den Bussche, R A, Baker, R J (2001) Molecular evidence for evolution of piscivory in *Noctilio* (Chiroptera: Noctilionidae). *J Mammal* 82:748-759.
- Lim, B K (1993) Cladistic reappraisal of Neotropical Stenodermatine bat phylogeny. *Cladistic* 9:147-165.
- Lim, B K, Engstrom, M D, Lee, T E, Patton, J C, Bickham, J W (2004) Molecular differentiation of large species of fruit-eating bats (*Artibeus*) and phylogenetic relationships based on the cytochrome *b* gene. *Acta Chiropterol* 6:1-12.
- Mckenna, C M, BELL, S K (1998) *Classification of mammals above the species level*. New York, Columbia University 631p.
- Morales, J C, Patton, J C, Bickham, J W (1993) Partial endonuclease digestion mapping of restriction sites using PCR-amplified DNA. *PCR Methods Appl* 2:228-233.
- Nei, M, Li, W (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Nat Acad Sci USA* 76:5269-5273.
- Sambrook, J, Fritsch, F, Maniatis T (1989) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Sprong Harbor. New York.
- Scatena, M P (2006) Análise molecular em morcegos do gênero *Artibeus* Leach, 1821 (Chiroptera, Phyllostomidae) a partir de espécimes depositados em coleção Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
- Smith, J D (1976) Chirópteran evolution. *Spec. Publ. Mus. Tex Tech Univ.* 10:49-69.
- Straney, D O, Smith, M H, Greenbaum, I F, Baker, R J (1979) Biochemical genetics. In: Baker, R J, Jones, J K, Carter, D C (eds), *Biology of the bats*

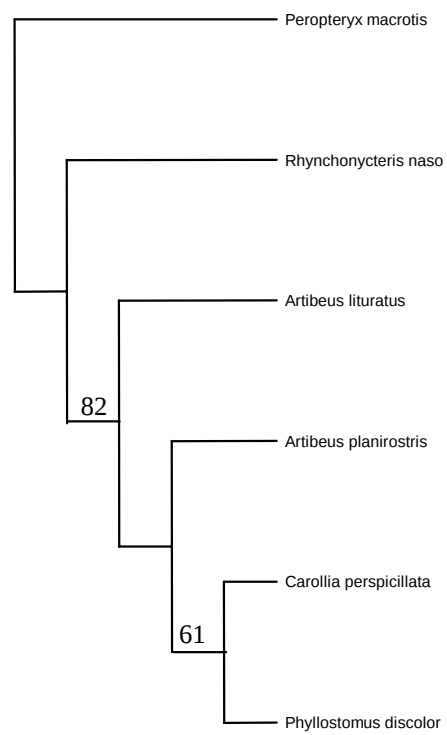
-
- New World family Phyllostomidae. P. III. Spec Publi Mus Tex Tech Univ 16:157-176.
- Swofford, D L PAUP*. (2002) Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taddei, V A (1996) Sistemática de quirópteros. Bol. do Inst. Pasteur. São Paulo 1:3-8.
- Taddei, V A (1997) Taxonomia de morcegos. Biológico, São Paulo 59:89-92.
- Teeling, E C, Scally, M, Kao, D J, Romagnoli, M L, Springer, M S, Stanhope, M J (2000) Molecular evidence regarding the origin of echolocation and Flight in bats. Nature 403:188-192.
- Van Den Bussche, R A (1992) Restriction - site variation and molecular systematics of New World Leaf-Nosed Bats. J Mammal 73:29-42.
- Van Den Bussche, R A, Baker, R J (1993) Molecular phylogenetics of the new world bat genus *Phyllostomus* based on cytochrome DNA sequence variation. J Mammal 74:793-802.
- Van Den Bussche, R A, Hudgeons, J L, Baker, R J (1998) Phylogenetic accuracy, stability, and congruence. Relationships within and among the New World bat genera *Artibeus*, *Dermanura* and *Koopmania*. In: Kunz, T. H.; Racey, P A (eds). Bat Biology and conservation. Smithsonian Institution Press. Washington. P A pp:59-71.
- Werman, S D, Springer, M S, Britten, R J (1996) Nucleic Acids I: DNA-DNA hybridization. In: Hillis, D M, Moritz, C, Mable, B K (eds.) Molecular systematics. 2 ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland. Massachusetts, USA p 180.
- Wetterer, A L, Rockman, M V, Simmons, N B 2000. Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): data from diverse morphological systems, Sex chromosomes, and restriction sites. Bull Am Mus Nat Hist 248:200pp.
- Wickliffe, J K, Hoffmann, F G, Carroll, D S, Dunina-Barkovskaya, Y V, Bradley, R D, Baker, R J (2003) Intron 7 (F^{GB} – I7) of the fibrinogen, B Beta Polypeptide (F^{GB}): A nuclear DNA Phylogenetic Marker for Mammals. Occas Pap Mus Tex Tech Univ 219:1-6.

Figura 1: Dendogramas representativos das análises em espécies de Phyllostomidae com os algoritmos: A) UPGMA e B) *Neighbor-joining* (NJ) para o gene RAG2, C) UPGMA e D) *Neighbor-joining* (NJ) para o gene 12/16S. Valores de *bootstrap* apresentado nos nós dos ramos.

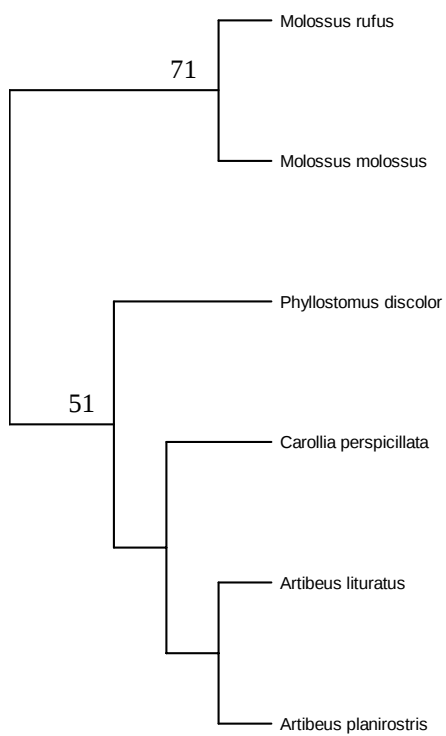
A)



B)



C)



D)

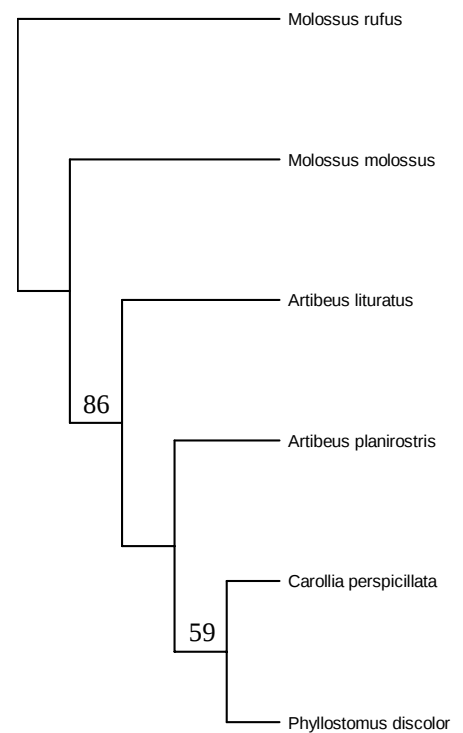
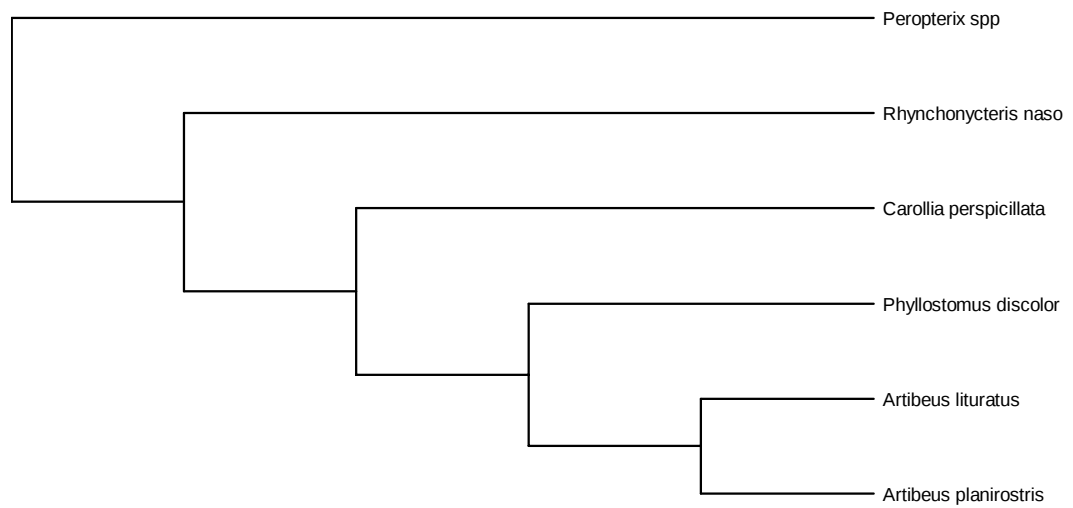
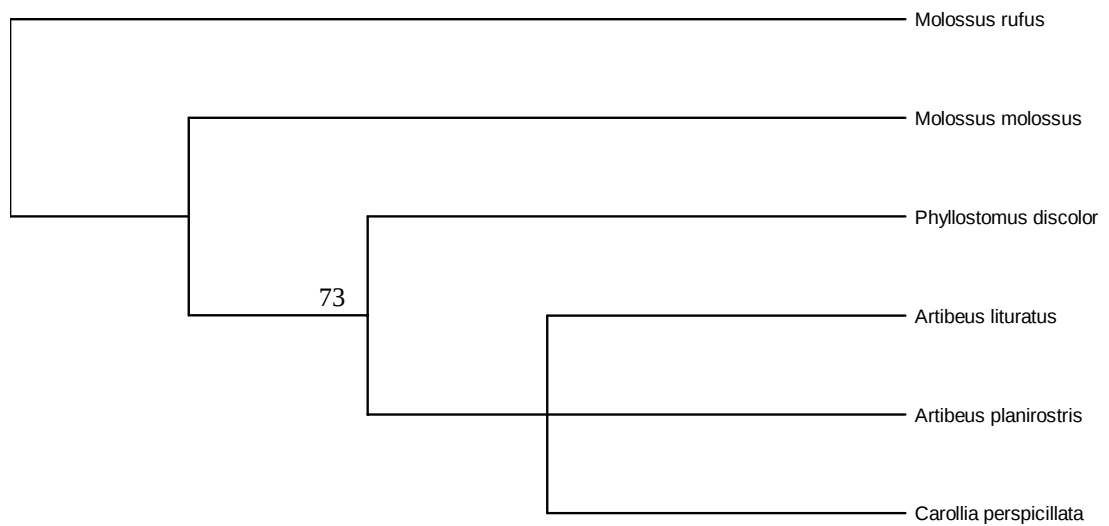


Figura 2: Dendogramas representativos das análises de Máxima Parcimônia (MP) em espécies de Phyllostomidae. A) gene RAG2 e B) gene 12/16S. Valores de *bootstrap* apresentado nos nós dos ramos.

A)



B)



**VARIABILIDADE GENÉTICA EM ESPÉCIES DE MORCEGOS DAS FAMÍLIAS
EMBALLONURIDAE, PHYLLOSTOMIDAE, VESPERTILIONIDAE E
MOLOSSIDAE, BASEADA EM ANÁLISE PCR-RFLP**

Sandra Regina de Carvalho Marchesin¹ e Eliana Morielle Versute²

*Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas,*

¹*Departamento de Biologia, São José do Rio Preto, SP, Brasil*

²*Departamento de Zoologia e Botânica, São José do Rio Preto, SP, Brasil*

Palavras Chaves: variabilidade genética, enzimas de restrição, similaridade genética, biodiversidade

Key words: genetic variability, restriction enzymes, genetic similarity, biodiversity

Resumo

A análise do padrão de restrição pela técnica PCR-RFLP em seqüências gênicas nuclear (RAG2) e mitocondrial (12/16S) de 23 espécies de morcegos das famílias Molossidae, Phyllostomidae, Vespertilionidae e Emballonuridae gerou um número grande de fragmentos, sendo 107 para o gene RAG2 e 155 para o 12/16S,

combinados em 139 e 402 haplótipos, respectivamente. Os valores de variação gênica detectados foram baixos para as duas seqüências (0,13, RAG2 e 0,15, 12/16S) refletindo o conservacionismo dessas, reforçado pelos valores altos de Identidade Genética inter e intra-específica (74 – 100%). As espécies com maior variação gênica foram variáveis nas análises do RAG2 (*Eumops perotis*, *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata* e *Molossus rufus*) e 12/16S (*Nyctinomops laticaudatus* e *Carollia perspicillata*), contudo, uma delas *C. perspicillata* foi a que apresentou também a maior variação intra-específica. No conjunto de espécies e gêneros das famílias, Molossidae foi a que mais variou, em consequência da variação apresentada especialmente pelas espécies de *Eumops* e *Nyctinomops*.

Abstract

The analysis of the restriction pattern by the PCR-RFLP technique in nuclear (RAG2) and mitochondrial (12/16S) gene sequences of 23 bat species from Molossidae, Phyllostomidae, Vespertilionidae and Emballonuridae families generated a large number of fragments: 107 for RAG2 and 155 for 12/16S combined, respectively, in 139 and 402 haplotypes. The values detected for gene variation were low for both sequences (0,13 for RAG2 and 0,15 for 12/16S) and reflected their conservative feature, reinforced by high values of inter and intra-species Genetic Identity (74-100%). The species with a high gene divergence were variable in the analyses of RAG2 (*Eumops perotis*, *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata* and *Molossus rufus*), although one of them *C. perspicillata* also presented the highest intra-specific variation. Among the species and genera

of the families, Molossidae had the highest variation due to the variation in *Eumops* and *Nyctinomops* species.

Introdução

Os morcegos constituem a segunda maior ordem de mamíferos, contando hoje com aproximadamente 1000 espécies amplamente distribuídas, ocorrendo em regiões tropicais e temperadas, com exceção de algumas ilhas oceânicas remotas e Antártica (Koopman, 1970; Nowak, 1999).

Apesar desta importante irradiação, os relacionamentos evolutivos da ordem são pouco conhecidos e os resultados controversos (Koopman, 1970; Nowak, 1999; Simmons, 1998, 2000; Jones *et al.*, 2002). Em consequência, muitos estudos comparativos buscando identificar os padrões evolutivos dentro da ordem vêm sendo desenvolvidos, deixando evidente a importância de uma avaliação da história evolutiva dos clados através de análises comparativas consistentes e bem documentadas.

A origem monofilética de Chiroptera tem sido apoiada por estudos bioquímicos, moleculares e morfológicos (Simmons, 1998; Simmons & Geisler, 1998; Van Den Bussche *et al.*, 1998; Nikaido *et al.*, 2000; 2001; Teeling *et al.*, 2000, 2002) e, ao nível infra ordinal, há um consenso relativo quanto aos relacionamentos entre as 17 famílias reconhecidas de Microchiroptera, este derivado das várias propostas que têm sido apresentadas baseadas em diferentes conjuntos de dados (Smith, 1976; Van Valen, 1979; Novacek, 1980; Pierson, 1986; Teeling *et al.*, 2000, 2005). Apesar disso, a sistemática do grupo é bastante complexa, e relacionamentos

filogenéticos não muito bem estabelecidos aparecem em várias famílias e gêneros (Simmons & Geisler, 1998; Jones *et al.*, 2002).

Estudos populacionais intra e interespecíficos têm sido amplamente utilizados na determinação dos processos e padrões macro-evolutivos apresentados pelas filogenias de diferentes espécies, a fim de fundamentar, entre outras, as análises dos padrões morfológicos utilizados na maioria das filogenias. A maior parte deles têm procurado determinar, a partir da detecção da variação e/ou origem de novos alelos, o “comportamento” dos genes no nível intra e interespecífico e seu papel na evolução (Hillis *et al.*, 1996; Avise 2000; Juste *et al.*, 2004).

O conhecimento da variação e comportamento de caracteres moleculares variáveis, ou seja, dos marcadores genéticos, para uma espécie em particular, permite estimar a história evolutiva da espécie, como o tamanho da população, origem, estrutura de acasalamento e estabelecimento do relógio biológico (molecular), tendo ainda, um papel significativo em estudos de populações de diversos organismos e na sua biogeografia.

Pierson (1986) foi o primeiro pesquisador a examinar os caracteres moleculares para estudo de relacionamento entre famílias de Microchiroptera. Desde esta data, inúmeros estudos filogenéticos têm se baseado na análise de dados moleculares, como ferramenta auxiliar na sistemática dos grupos de morcegos. Por isso, no presente estudo, 23 espécies pertencentes às famílias Molossidae, Phyllostomidae, Vespertilionidae e Emballonuridae foram investigadas, utilizando-se análises de PCR-RFLP de segmentos gênicos nuclear e mitocondrial, com intuito

de avaliar a estrutura e comportamento genético das seqüências nos indivíduos destas complexas famílias de morcegos.

Material e métodos

Táxons examinados

Foram analisados 88 espécimes representantes de 13 gêneros e 23 espécies das famílias Molossidae (11), Phyllostomidae (4), Vespertilionidae (6) e Emballonuridae (2), provenientes do Estado de São Paulo, Mato Grosso-MT e Mato Grosso do Sul-MS. Destas, 18 espécies representantes de 11 gêneros foram utilizadas nas análises do gene nuclear RAG2, e 23 espécies representantes de 13 gêneros nas análises do gene mitocondrial 12/16S (Apêndice I).

O número de espécimes analisados de cada táxon foi variável, em decorrência do número de amostras de tecidos colecionados disponível no laboratório de Chiroptera, e do número de captura de espécimes e obtenção de amostras de alguns táxons.

Extração de DNA genômico e amplificações

O DNA genômico foi extraído de fragmentos de fígado, rim, pulmão e músculo frescos ou congelados à -20°C , segundo protocolo de Sambrook *et al.* (1989), sem a utilização do fenol.

Após precipitação pela adição de etanol absoluto gelado, o DNA obtido foi recolhido, diluído em tampão TE (10 mM Tris/1 mM EDTA), e a qualidade e

quantidade avaliada e estimada em espectofotômetro de acordo com Werman *et al.* (1999).

As amplificações por reação em cadeia de polimerase (PCR) foram conduzidas segundo o protocolo descrito por Lewis-Oritt *et al.* (2001) para o gene RAG2, com a utilização dos primers: RAG2 R1 - 5' GGC TGG CCC AA(AG) AGA TCC TG 3' e RAG2 F1 - 5' G(AG)A AGG ATT TCT TGG CAG GAG T 3', e por Morales *et al.* (1993) para o gene 12/16S, com a utilização dos primers: Primer1 - 5' TGG GAT TAG ATA CCC CAC TAT 3' e Primer2 - 5' TGA TTA TGC TAC CTT TGC ACG GT 3'. Todas as reações foram realizadas em termociclador *Perkin Elmer – Gene Amp PCR System*.

Os produtos amplificados nas reações de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% solubilizado em tampão TAE 1X e corado com brometo de etídio para visualização em luz ultra violeta. O tamanho dos produtos obtidos nas reações, foi estimado com o marcador de peso molecular *ladder* de 100pb (*BioLabs* e *AMRESCO*).

Análise molecular

Para a determinação do padrão de variação das seqüências e haplótipos, essas foram submetidas à digestão completa dupla (associação de duas enzimas) e simples (uma única enzima). Foram utilizadas dez enzimas de restrição: *HaeIII*, *HindIII*, *PstI*, *XhoI*, *DraI*, *ScaI*, *DdeI*, *BglII*, *EcoRI*, *RsaI*. Cada 6µl do amplificado foi digerido com três unidades de enzima, conforme as especificações dos fabricantes. As digestões duplas foram realizadas observando-se a compatibilidade dos tampões

envolvidos nas reações onde, oito enzimas (exceto *RsaI*) foram associadas à enzima *EcoRI*. Para a enzima *RsaI* cujo tampão não foi compatível, o procedimento adotado foi o de digestão simples, também utilizado para a enzima *EcoRI*, como controle nas digestões duplas. Após as digestões, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados em luz ultra violeta, onde as imagens foram fotografadas utilizando-se máquina Polaroid. Os fragmentos foram identificados por tamanho em pares de bases (pb) e pela enzima que os gerou.

Análise estatística e genealógica

Para as análises genéticas foram construídas duas matrizes, de presença (1) e ausência (0) dos fragmentos obtidos a partir das digestões. Os dados foram submetidos à análises de distância pelos programas PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) pelo algoritmo *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Means* (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973), baseados no modelo matemático Nei (1978), que considera o índice de identidade entre as populações e análises estatísticas relativas à frequência de polimorfismos, diversidade gênica e genética dos espécimes estudados.

Para detecção da variação gênica e identidade genética foram especulados os seguintes parâmetros:

- valores médios da variação gênica detectada pelas 10 enzimas na amostra de 88 espécimes para o gene 12S/16S, e na amostra de 43 espécimes para o gene RAG2;

-
- índice de diversidade (variação gênica = h) dos genes RAG2 e 12S/16S para espécies com três ou mais espécimes analisados;
 - frequência de loci polimórfico;
 - valores médios da identidade genética (I) dos indivíduos das espécies nas quais foram analisados pelo menos três espécimes;
 - valores médios da identidade genética de 18 espécies para o gene RAG2, e de 23 espécies para o gene 12S/16S, independente do número de espécimes.

Resultados

Para a obtenção do padrão de digestão simples e dupla das seqüências RAG2 e 12/16S, foram utilizados no mínimo um (no caso dos espécimes raros e difíceis de coletar) e no máximo cinco espécimes, representantes das 18 espécies utilizadas para o gene RAG2, e no mínimo um e no máximo sete espécimes, representantes das 23 espécies utilizadas para o gene 12/16S, num total de 43 e 87 respectivamente.

Padrão das digestões simples e duplas da seqüência dos genes RAG2 e 12/16S

A análise das digestões mostrou que os fragmentos produzidos apresentaram diferentes tamanhos (pb) e variação na intensidade das bandas.

Na Figura 1 é possível observar o padrão de cortes nos segmentos gênicos RAG2 e 12/16S de espécime da espécie *Artibeus lituratus*, após as digestões duplas e simples. Ela evidencia que nessa, assim como em outras espécies, o

padrão de corte nos dois segmentos foi diferente, sendo que o gene RAG2 (Figura 1A) é o que apresentou um menor número de fragmentos quando comparado aos obtidos para o gene 12/16S (Figura 1B). É possível observar também, as diferenças na intensidade das bandas produzidas até mesmo naquelas de igual tamanho (peso molecular).

Ao analisarmos as bandas produzidas para o mesmo segmento gênico em espécimes da mesma espécie, o padrão de corte observado foi o mesmo na maioria dos indivíduos. Quando foram comparados os padrões em indivíduos de espécies diferentes, foi observado, como esperado, uma variação no tamanho dos fragmentos (pares de base) evidenciando diferenças na posição e/ou número de sítios de cortes das enzimas. Contudo, em espécimes de espécies congêneres o padrão de corte foi muito semelhante, conforme pode ser evidenciado na Figura 2 para o segmento gênico 12/16S de *E. perotis* e *E. glaucinus* da família Molossidae.

O registro dos fragmentos produzidos em cada espécime, identificados pelos seus tamanhos em pb e pela enzima que os gerou, reuniu um total de 107 fragmentos diferentes para o gene RAG2 e 155 fragmentos para o gene 12S/16S (Tabelas 1 e 2).

Nota-se pelas Tabelas que o número de cortes e fragmentos, assim como o número de haplótipos detectados foi diferente para cada enzima, assim como no segmento gênico.

A enzima que produziu o maior número de fragmentos e detectou o maior número de haplótipos (28) no gene RAG2 foi a *RsaI*, que foi utilizada apenas nas

digestões simples. Para este gene o número de fragmentos produzidos no conjunto das digestões foi 107, combinados em 139 haplótipos.

No segmento gênico 12/16S foram produzidos, no conjunto de enzimas, 155 fragmentos, sendo o maior número deles produzido pela enzima *ScaI* (*ScaI*+*EcoRI*). Da mesma forma que para o gene anterior, a enzima que detectou o maior número de haplótipos, 59 do total de 402, foi a *RsaI*, seguida pela *DdeI*.

O registro da presença ou ausência dos fragmentos na matriz binária avaliada pelo programa Popgene, mostrou como estão variando os haplótipos dentro e entre as espécies.

O índice de diversidade gênica da população, detectada pelas 10 enzimas, para o gene nuclear foi $h = 0,13$ e para o gene mitocondrial, foi $h = 0,15$, índices considerados baixos, refletindo o conservacionismo no padrão geral das digestões.

Nas Tabelas 3 e 4 é possível observar os valores da variação gênica, da frequência de loci polimórficos e identidade genética exibidos por oito espécies para as quais foram analisados com três ou mais espécimes no gene RAG2 (Tabela 3), e 16 espécies no gene 12/16S (Tabela 4).

Os índices obtidos para o conjunto de dados a partir do gene nuclear (0,13) foram pouco menores que os observados para os genes mitocondriais (0,15). Contudo, se consideradas as espécies individuais, os valores da variação gênica e frequência de loci polomórficos foram variáveis entre as espécies, para o mesmo gene, e na espécie, nos dois diferentes genes.

O maior índice de diversidade gênica e frequência de polimorfismos no gene RAG2 foi exibido por *E. perotis* (28%), seguido de *A. lituratus* e *C.*

perspicillata que apresentam a mesma frequência de loci polimórficos (26%). O menor índice de diversidade e frequência de polimorfismos observados foi em *M. rufus* ($h=0,06$ e 17%). Já para o gene 12/16S, a espécie com maior diversidade e polimorfismos foi *N. laticaudatus* (44%), seguida de *C. perspicillata* (21%), enquanto que a com menor variação foi *E. furinalis* (14%) seguida de *P. discolor* (15%).

Os valores médios de Identidade genética observados entre indivíduos da mesma espécie foram relativamente altos, variando de 74% (*E. perotis* e *C. perspicillata*) a 100% (*N. laticaudatus*) no gene RAG2, e 70% (*N. laticaudatus*) a 100% (*N. macrotis*) no gene 12/16S e, à semelhança dos demais índices, variaram para as espécies nos diferentes genes. A maior variação na identidade foi exibida por *N. laticaudatus* para o gene 12/16S e *C. perspicillata* para o gene RAG2. Em *N. laticaudatus* os valores ficaram entre 97% a 70% e em *C. perspicillata* 97 a 74%. A menor variação foi exibida pela espécie *E. auripendulus*, seguida de *A. lituratus* e *M. rufus*, com valores entre 85 – 84%, 84 – 80% e 95 – 90%, respectivamente.

Os resultados dos índices calculados evidenciam também, que para os genes analisados, os valores não foram influenciados pela diferença na procedência dos animais, indicando similaridade entre os indivíduos. As diferenças entre os maiores e menores valores de identidade genética à exemplo de *N. macrotis* (100 - 82%), onde todos indivíduos foram coletados em Campo Grande-MS, *N. laticaudatus* (97 – 70%), onde todos espécimes foram coletados em São José do Rio Preto-SP, *M. temminckii* (97% – 88%), cujos indivíduos

procedem de várias localidades como, São José do Rio Preto-SP, Mirassol-SP, Olímpia-SP e Campo Grande-MS, e *E. glaucinus* (96 – 82%), com representantes de São José do Rio Preto-SP, Nova Aliança-SP e Nova Granada-SP, não diferiram acentuadamente.

No conjunto dos gêneros que formam as diferentes famílias e consideradas todas as espécies, independente do número de indivíduos, a família Molossidae foi a que apresentou maior variabilidade quando comparada com as outras famílias estudadas, onde o índice de identidade entre as espécies variou de (I): 84 a 100% (RAG2) e 79 a 99% (12/16S), enquanto que a mais conservada foi a família Phyllostomidae, cujos índices variaram de (I): 95 a 99% no RAG2 e 97 a 99% (12/16S) (Tabela 5 e 6). No conjunto de dados comparando as famílias duas a duas, Molossidae e Vespertilionidae foram as mais diversas com valores de identidade variando de (I): 76 a 97% e as com menor variação foram Phyllostomidae e Emballonuridae com (I): 90 a 95% (gene RAG2).

Discussão

O desenvolvimento de técnicas para o estudo do DNA propiciou um enorme avanço para o conhecimento da evolução e genética de vários grupos animais. A variabilidade detectada nas diferentes análises reflete as variações nas seqüências de DNA, as quais são a base da diversidade dentro de uma espécie.

Embora o seqüenciamento direto de DNA nos últimos anos esteja entre as técnicas mais amplamente utilizadas na detecção de polimorfismos, os estudos de

RFLP são úteis na detecção de polimorfismos para um grande número de indivíduos, o que muitas vezes é proibitivo para o seqüenciamento.

No presente estudo o número de haplótipos detectados pela análise RFLP foi significativo, ou seja 139 para o gene RAG2 e 402 para o gene 12/16S, o que foi representativo quando considera-se o tamanho das seqüências (aproximadamente 1400/1500 pb) e o número de indivíduos analisados em cada seqüência, evidenciando a eficiência das enzimas utilizadas nas análises e, portanto, sua importância.

A enzima *RsaI* destacou-se pois ela foi a que mostrou-se mais eficiente na detecção de polimorfismos nos dois segmentos gênicos, mesmo tendo sido utilizada somente nas digestões simples. A eficiência das diferentes enzimas está diretamente relacionada à estrutura molecular do segmento gênico envolvido, e a presença nele do sítio de corte de reconhecimento da enzima.

O DNA mitocondrial gerou um maior número de fragmentos e maior número de haplótipos, quando comparados com os obtidos para o segmento nuclear RAG2. Possivelmente em consequência, não exclusivamente, mas predominantemente, do maior número de indivíduos analisados para este gene. Ao avaliarmos a quantidade de variabilidade detectada para os dois genes, os valores foram muito próximos ($h=0,13$ – RAG2 e $h=0,15$ – 12/16S), indicativos de que ambos representam marcadores interessantes na avaliação da variabilidade genética em espécies de morcegos.

Além da variação nos fragmentos e haplótipos, foi observado também variação na intensidade das bandas, provavelmente devida ao número de

fragmentos de mesmo tamanho, homólogos ou não, e a digestão incompleta do fragmento original (1400/1500 pb). O conservacionismo no padrão de corte em espécies congêneres, evidente até mesmo na imagem dos géis, evidenciou uma similaridade molecular nas seqüências.

Os valores de identidade genética (I) obtidos para os genes RAG2 e 12S/16S foram, para a maioria das espécies, altos entre indivíduos da mesma espécie, indicando que os haplótipos produzidos pelas diferentes enzimas são conservados, apresentando pouca variação. O mesmo pôde ser observado na análise da variação gênica das várias espécies, quando foram considerados os 107 fragmentos produzidos para o segmento gênico RAG2 e os 155 fragmentos produzidos para o segmento gênico 12S/16S, onde os índices de variação não foram superiores a 0,12, para o gene RAG2 (*E. perotis*, *A. lituratus* e *C. planirostris*) e 0,16 o gene 12/16S (*N. laticaudatus*).

Apesar de baixos, os valores de variação gênica e polimorfismos foram diferentes entre as várias espécies. As espécies mais polimórficas e com maior variação gênica para o gene RAG2 foram *E. perotis*, *A. lituratus* e *C. perspicillata*, enquanto que para o gene 12/16S, as mais polimórficas não foram necessariamente as que apresentaram maior variação gênica. *Nyctinomops laticaudatus* foi a espécie mais polimórfica e com maior variação, contudo, a segunda mais polimórfica, *M. nigricans* apresentou o terceiro maior valor de variação gênica.

Ainda com relação aos valores de Identidade genética dentro das espécies e considerando o gene RAG2, a espécie *C. perspicillata* foi a que mais variou,

com índices de identidade entre 74 – 97%, seguida de *E. perotis* com os índices de identidade entre 74 – 90%. Estes resultados apontam para ocorrência de variações intra-específicas, que não se comportam da mesma maneira nas diferentes espécies de morcegos. Aparentemente as variações não estão relacionadas com a procedência dos espécimes, visto que cinco dos seis espécimes de *C. perspicillata* utilizados nesta análise, foram coletados numa mesma colônia, em São José do Rio Preto, diferentemente de *E. perotis* cujos espécimes foram coletados em diferentes colônias, localizadas em diferentes municípios pertencentes a região de São José do Rio Peto.

Para o gene 12/16S, *N. laticaudatus* foi a espécie que apresentou maior variação na identidade genética entre os espécimes, com valores entre 70 – 97%, seguida de *M. nigricans* e *M. molossus*, cujos valores de identidade genética foram entre 74 – 95% e 75 – 95%, respectivamente. À semelhança da situação anterior, as variações não devem ser devidas à diferenças na procedência dos espécimes, e a princípio estão sendo interpretadas como conseqüentes da variação natural da amostra, onde um espécime muito diferenciado geneticamente poderia alterar significativamente os valores de distância.

Os espécimes de *A. lituratus* foram os mais distantes geneticamente para o gene RAG2 (ID = 80-84%) e os de *E. auripendulus* (ID = 84-85%) e *C. perspicillata* (ID = 74 – 88%) para o gene 12/16S.

O conservacionismo nos segmentos gênicos avaliados, observado nos baixos índices de variação gênica e distância apresentada pelas espécies do presente trabalho, também já foi relatado pela literatura em estudos de outra

natureza, como citogenéticos (Patton & Baker, 1978; Morielle-Versute *et al.*, 1996; Leite-Silva *et al.*, 2003), morfológicos (Eger, 1977; Freeman, 1981) e moleculares (Ditchfield, 2000; Rivers, *et al.*, 2005). As variações encontradas apesar de pequenas, podem ser indicativas da variabilidade natural, dentro das espécies e gêneros analisados.

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam a existência de um padrão conservado bastante significativo das seqüências gênicas analisadas nas diferentes espécies e famílias de morcegos. Esse conservacionismo também foi apontado por Ditchfield (2000) que comparou os padrões filogeográficos de espécies de morcegos da família Phyllostomidae (*Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata*, *Sturnira lilium* e *Glossophaga soricina*) com pequenos mamíferos não voadores. Neste estudo, os dados revelaram que a variação genética encontrada em morcegos é 10 vezes menor que em outros pequenos mamíferos, quando comparados a variação geográfica.

A maior variabilidade apresentada pela família Molossidae quando consideradas as espécies e gêneros independentemente do número de espécimes avaliados, e para as duas seqüências gênicas, é devida à variação que caracteriza alguns gêneros e espécies, especialmente de *Eumops* e *Nyctinomops*.

O gênero *Eumops* é apontado por Freeman (1981) como um grupo morfológicamente distinto. Contudo, a autora propõe a monofilia do gênero baseada em traços derivados e similaridades na forma do crânio. Esta variabilidade é apontada também por outros autores, como Eger (1977) onde a partir de dados morfológicos, observou a ocorrência de variação entre populações

geográficas, especialmente de *E. bonariensis* para a qual reconheceu quatro subespécies de ocorrência no Brasil.

Os Vespertilionidae foram semelhantes aos Molossidae, e as diferenças devem ser devidas às variações presentes nas espécies dos três gêneros, especialmente nas espécies de *Lasiurus*.

O número de espécies reconhecidas para o gênero *Lasiurus* é bastante variável, e a maioria dos estudos que investigam a história evolutiva do grupo têm utilizado análises citogenéticas e moleculares (Morales & Bickhan, 1995; Marchesin, 2002; Marchesin & Morielle-Versute, 2004). Os autores têm dividido o gênero em três subgrupos de acordo com a cor da pelagem, predominantemente branca (*L. cinereus*), vermelha (*L. blossevillii*, *L. borealis*, *L. pfeifferi*) e amarela (*L. xanthinus*, *L. ega* e *L. intermedius*), onde estes últimos seriam os mais divergentes morfologicamente, o que levou alguns autores a sugerirem a aplicação de um novo gênero para essas espécies (*Dasypterus*) (Tate, 1942; Hill & Harison, 1987).

A situação observada pelos Phyllostomidae em que as quatro espécies de três gêneros diferentes variaram muito pouco, está certamente relacionada ao baixo número de táxons analisados, visto que a família é considerada taxonomicamente diversa e, apesar de conservada cariotipicamente, apresenta uma grande variabilidade intergenérica (Baker *et al.*, 1979; Van Den Bussche 1992; Baker *et al.*, 2000, 2003). Os resultados obtidos para *C. perspicillata*, que apresentou o segundo maior índice de variabilidade genética, são indicativos da complexidade do grupo.

As análises de maneira geral apontam para uma maior homogeneidade genética para o gene nuclear. Os polimorfismos gerados para o gene RAG2 parecem ser mais informativos que os gerados para o gene 12/16S ao menos para os táxons analisados. Esses resultados estão de acordo com trabalho de Springer *et al.* (2001), que compararam o desempenho de conjuntos de dados mitocondriais com conjuntos de dados nucleares e observaram que estes, são mais eficientes nas reconstruções dos clados que os genes mitocondriais. Para os autores isso se deve ao fato de que o gene nuclear é menos afetado pelas substituições nucleotídicas.

Os dados do presente trabalho reforçam a idéia de que particularmente em Chiroptera, o gene RAG2 é útil, além de ser um gene cuja função na resposta imunológica provavelmente não está ligada às características morfológicas, que freqüentemente têm sido usadas nas classificações de morcegos, e que pela sua complexidade mascaram a condição basal do relacionamento filogenético do grupo (Baker *et al.* 2000, 2003).

A caracterização da variabilidade genética das diferentes espécies foi extremamente importante e poderá orientar ou subsidiar estudos com diferentes finalidades. A complexidade dos táxons de Chiroptera observada em outras análises, como citogenéticas e morfológicas também foi revelada pela análise RFLP, reforçando a importância dessa metodologia de análise nos estudos evolutivos no grupo.

Referências

- Avice, J C (2000) *Phylogeography: the history and formation of species* harvard University Press.
- Baker, R J, Bass, R A, Johnson, M A 1979. Evolutionary implications of chromosomal homology in four genera of Stenodermatine bats (Phyllostomidae: Chiroptera), *Evolution* 33:220-226.
- Baker, R J, Porter, C A, Patton, J C, Van Den Bussche, R A (2000) Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. *Occas Pap Mus Tex Tech Univ* 202: 1-16.
- Baker, R J, Hoofer, S R, Porter, C A, Van Den Bussche, R A (2003) Diversification among New World leaf-nosed bats: an evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic of DNA sequence. *Occas Pap Mus Tex Tech Univ* 230:1-32.
- Ditchfield, A D (2000) The comparative phylogeography of neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. *Mol Ecol* 9:1307-1318.
- Eger, J L (1977) Systematics of the genus *Eumops* (Chiroptera: Molossidae). *Life Sci Contr Roy Ont Mus* 110:1-69.
- Freeman, P W (1981) A multivariate study of the family Molossidae (Mammalia, Chiroptera): Morphology, Ecology, Evolution. *Fildiana Zool* 7:1-105.
- Hill, J E, Harrison, D L (1987) The baculum in the Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) with a systematic review, a synopsis of *Pipistrellus* and *Eptesicus*, and the description of a new genus and subgenus. *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. Zool ser* 52:225-305.
- Hillis, D M, Mable, B K, Larson, A, Davis, S K, Zimmer, E A (1996) Nucleic acids, sequencing and cloning. In: Hillis, D M, Moritz, C, Mable, B K (Eds.) *Molecular Systematics*. 2 Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts Usa pp. 321-369.
- Jones, K E, Purvis, A, McLarnon, Bininda-Emonds, O R P, Simmons, N B (2002) A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). *Biol Rev* 77:223-259.
- Juste, J, Ibáñez, C, Muñoz, J, Trujillo, D, Benda, P, Karatas, A, Ruedi, M (2004) Mitochondrial phylogeography of the long-eared bats (*Plecotus*) in the mediterranean palaeartic and atlantic islands. *Mol Phyll Evol* 31:1114-1126.

-
- Koopman, K F (1970) Zoogeography of bats. In: Slaughter, B H, Walton, D W (Eds.). About bats. A Chiropteran Biology Symposium. Dallas: Southern Methodist Univ Press pp 29-46.
- Leite-Silva, C, Santos, N, Fagundes, V, Yonenaga-Yassuda, Y, Souza, M J (2003) Karyotypic characterization of the bat species *Molossus ater*, *M. molossus* and *Molossops planirostris* (Chiroptera, Molossidae) using Fish and banding techniques. *Hereditas* 138:94-100.
- Lewis-Oritt, N, Van Den Bussche, R A, Baker, R J (2001) Molecular evidence for evolution of piscivory in *Noctilio* (Chiroptera: Noctilionidae). *J Mammal* 82:748-759.
- Marchesin, S R C Análise citogenética em espécies de Vespertilionidae dos gêneros *Eptesicus*, *Histiotus*, *Lasiurus* e *Myotis* (Chiroptera, Mammalia). (2002) Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
- Marchesin, S R C, Morielle-Versute, E (2004) Chromosome studies of brazilian vespertilionids *Lasiurus cinereus* and *Lasiurus ega* (Mammalia, Chiroptera). *Inheringia, Sér Zool* 94:443-446.
- Morales, J C, Patton, J C, Bickham, J W (1993) Partial endonuclease digestion mapping of restriction sites using PCR-amplified DNA. *PCR Methods Appl* 2:228-233.
- Morales, J C, Bickham, J W 1995. Molecular systematics of the genus *Lasiurus* (Chiroptera: Vespertilionidae) based on restriction-site maps of the mitochondrial ribosomal genes. *J Mammal* 76:730-749.
- Morielle-Versute, E, Varella-Garcia, M, Taddei, V A (1996) Karyotypic patterns of seven species of molossid bats (Molossidae, Chiroptera) *Cytogenet Cell Genet* 72:26-33.
- Nei, M, Fuerst, P A, Chakaraboty, R (1978) Subunit molecular weight and genetic variability of proteins in natural populations. *Proc Natl Acad Sci* 75:3359-3362.
- Nikaido, M, Harada, M, Cao, Y, Hasegawa, M, Okada, N (2000) Monophyletic origin of the order chiroptera and its phylogenetic position among mammalia, as inferred from the complete sequence of the mitochondrial DNA of a japanese megabat, the ryukyu flying fox (*Pteropus Dasymallus*). *J Mol Evol* 51:318-328.

-
- Nikaido, M, Kawai, K, Cao, Y, Harada, M, Tomita, S, Okada, N, Hasegawa, M (2001) Maximum likelihood analysis of the complete mitochondrial genomes of eutherians and a reevaluation of the phylogeny of bats and insectivores. *J Mol Evol* 53:508-516.
- Novacek, M (1980) Phylogenetic analysis of the chiropteran auditory region. in: *Proceedings of the fifth international bat research conference*. Eds. D E Wilson and A L Gardner. Texas Tech. University, Texas. p. 317-330.
- Nowak, R M (1999) *Walker's Mammals of the World*. the Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. 6th Edition pp:253-470.
- Patton, J C, Baker, R J (1978) Chromosomal homology and evolution of Phyllostomatoid bats. *Syst Zool* 27:449-462.
- Pierson, E, Sarich, V M, Lowenstein, J M, Daniel, M J Rainey, W E A (1986) Molecular link between the bats of new zealand and south america. *Nature* 323:60-63.
- Rivers, N M, Butlin, R K, Altringham, J D (2005) Genetic population structure of Natterer's bats explained by mating at swarming sites and philopatry. *Mol Ecol* 14:4299-4312.
- Sambrook, J, Fritsch, F, Maniatis T (1989) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor. New York.
- Simmons, N B (1998) A reappraisal of interfamilial relationships of bats (Pg 3-26) In: Kunz, T H and Racey, P A (eds) *Bat: biology and conservation* Smithsonian Institution Press, London. 365pp.
- Simmons, N B (2000) Bat phylogeny: an evolutionary context for comparative studies. In: Adams, R A, Pedersen, S C (Eds) *Ontogeny, Functional Ecology And Evolution Of Bats*. Cambridge University Press. Cambridge. pp 9-58.
- Simmons, N B, Geisler, J H (1998) Phylogenetic relationships of *Icaronycteris*, *Archeonycteris*, *Hassianycteris*, and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in Microchiroptera. *Bull Am Mus Nat Hist* 235:1-182.
- Smith, J D (1976) Chiropteran evolution. *Spec Publ Mus Tex Tech Univ* 10:49-69.
- Sneath, P H A, Sokal, R R (1973) *Numerical taxonomy*. Freeman W H San Francisco.

-
- Springer, M S, Debry, R W, Douady, C, Amrine, H M, Madsen, O, Jong, W W, Stanhope, M J (2001) Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction. *Mol Biol Evol* 18:132-143.
- Tate, G H H (1942) Results of the archbold expeditions, n° 47, review of the vespertilionine bats, with special attention to genera and species of the archbold collections. *Bull Am Mus Nat Hist* 80:221-297.
- Teeling, E C, Scally, M, Kao, D J, Romagnoli, M L, Springer, M S Stanhope, M J (2000) Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats. *Nature* 403:188-192.
- Teeling, E C, Madsen, O, Van Den Bussche, Jong, W W, Stanhope, M J, Springer, M S (2002) Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in old world rhinolophoid microbats. *Proc Nat Acad Sci USA* 99:1431-1436.
- Teeling, E C, Springer, M S, Madsen, O, Bates, P, O'Brien S J, Murphy, W J (2005) A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* 307:580-584.
- Van Den Bussche, R A (1992) Restriction - site variation and molecular systematics of New World leaf-nosed bats. *J Mammal* 73:29-42.
- Van Den Bussche, R A, Hudgeons, J L, Baker, R J (1998) Phylogenetic accuracy, stability, and congruence. Relationships within and among the new world bat genera *Artibeus*, *Dermanura* and *Koopmania*. In: Kunz, T H, Racey, P A (eds). *Bat biology and conservation*. Smithsonian Institution Press. Washington pp 59-71.
- Van Valen, L (1979) The evolution of bats. *evolutionary Theory* 4: 104-12.
- Werman, S D, Springer, M S, Britten, R J (1996) Nucleic Acids I: DNA-DNA hybridization. In: Hillis, D M, Moritz, C, Mable, B K (Eds.) *Molecular Systematics*. 2 Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland. Massachusetts, Usa pp 180.
- Yeh, F C, Yang, R, Boyle, T (1999) Popgene Version 1.31 – Microsoft Window – Based Freeware For Population Genetic Analysis.

Figura 1: Imagem representativa dos géis com os padrões de corte dos segmentos gênicos RAG2 (A) e 12/16S (B), em espécime de *Artibeus lituratus*, após digestões duplas: *DdeI* (coluna 1); *BglII* (coluna 2); *HaeIII* (coluna 3); *HindIII* (coluna 4); *PstI* (coluna 5); *XhoI* (coluna 6); *DraI* (coluna 7); *ScaI* (coluna 8), e simples: *RsaI* (coluna 9); *EcoRI* (coluna 10). M=marcador.

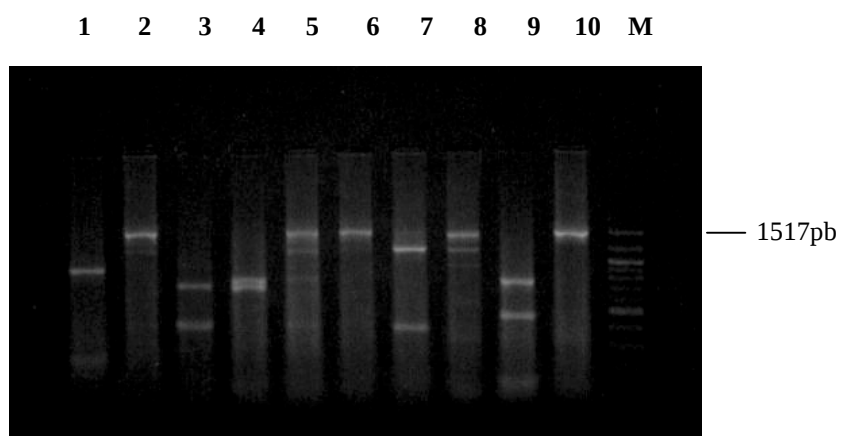
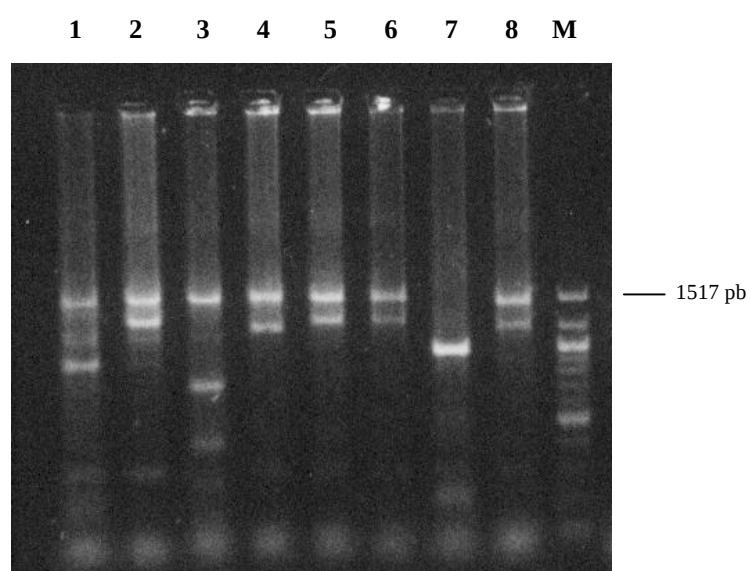
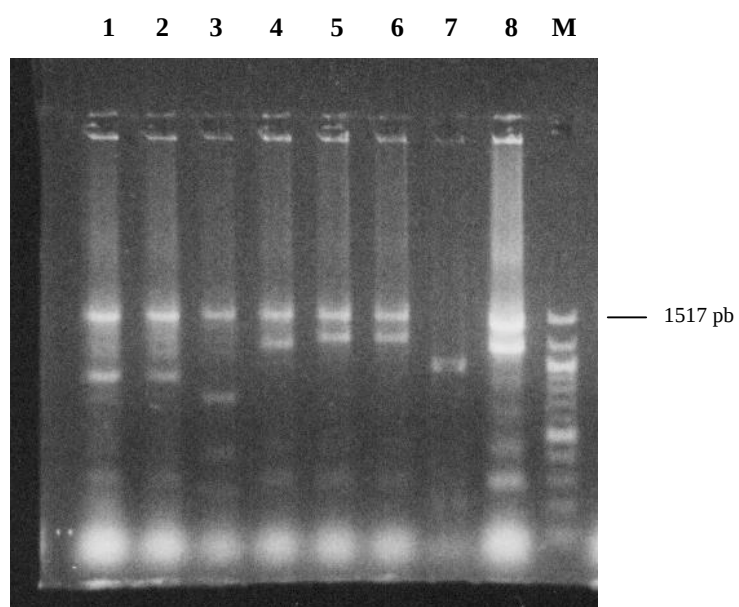
A**B**

Figura 2: Imagem representativa dos géis com os padrões de fragmentos produzidos pela digestão da região amplificada 12S/16S em um espécime de A) *Eumops perotis* e B) *Eumops glaucinus*, pelas enzimas: *DdeI* (coluna1); *BglII* (coluna 2); *HaeIII* (coluna 3); *HindIII* (coluna 4); *PstI* (coluna 5); *XhoI* (coluna 6); *DraI* (coluna 7); *ScaI* (coluna 8). M=marcador.

A**B**

[illegible][illegible]

[illegible]

Tabela 3: Valores médios da variação gênica (h) e valores de Identidade genética (I) encontrados nas oito espécies com mais de três espécimes, com base na análise dos 107 fragmentos (loci) produzidos no gene RAG2 pelas 10 enzimas nas digestões duplas e simples.

Espécies	h	%de loci polimórfico)	Identidade genética nas espécies	
			maior	menor
<i>Eumops glaucinus</i>	0,09	(22) 20%	0,91	0,82
<i>Eumops perotis</i>	0,12	(30) 28%	0,90	0,74
<i>Molossus rufus</i>	0,06	(18) 17%	0,98	0,84
<i>Molossus molossus</i>	0,08	(21) 20%	0,92	0,86
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	0,09	(25) 23%	1,00	0,85
<i>Artibeus lituratus</i>	0,12	(28) 26%	0,84	0,80
<i>Artibeus planirostris</i>	0,07	(20) 19%	0,95	0,85
<i>Carollia perspicillata</i>	0,12	(28) 26%	0,97	0,74
população	0,13	(97) 91%	-	-

Tabela 4: Valores médios da variação gênica (h) e valores de Identidade genética (I) encontrados nas 16 espécies com mais de três espécimes, com base na análise dos 155 fragmentos (loci) produzidos no gene 12/16S pelas 10 enzimas nas digestões duplas e simples.

Espécies	h	% de loci polimórficos	Identidade genética nas espécies	
			maior	menor
<i>Cynomops abrasus</i>	0,13	(55) 35,48%	0,91	0,75
<i>Eumops auripendulus</i>	0,09	(33) 21,29%	0,85	0,84
<i>Eumops glaucinus</i>	0,09	(36) 23,23%	0,96	0,82
<i>Eumops perotis</i>	0,13	(51) 32,90%	0,90	0,80
<i>Molossops temminckii</i>	0,07	(30) 19,35%	0,97	0,88
<i>Molossus rufus</i>	0,06	(27) 17,42%	0,95	0,90
<i>Molossus molossus</i>	0,12	(51) 32,90%	0,95	0,75
<i>Nyctinomops macrotis</i>	0,07	(30) 19,35%	1,00	0,82
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	0,16	(68) 43,87%	0,97	0,70
<i>Artibeus lituratus</i>	0,13	(54) 34,84%	0,95	0,77
<i>Artibeus planirostris</i>	0,12	(51) 32,90%	0,92	0,82
<i>Carollia perspicillata</i>	0,15	(55) 21,29%	0,88	0,74
<i>Phyllostomus discolor</i>	0,07	(24) 15,48%	0,94	0,87
<i>Myotis nigricans</i>	0,13	(61) 39,35%	0,95	0,74
<i>Eptesicus furinalis</i>	0,06	(22) 14,19%	0,96	0,88
<i>Rhynchonycteris naso</i>	0,11	(38) 24,52%	0,91	0,77
população	0,15	(153) 98,71%	-	-

Tabela 5: Valores médios da Identidade Genética, segundo Nei (1978) para as 18 espécies estudadas, para o gene nuclear RAG2 (1 – *E.auripendulus*; 2 – *E. bonariensis*; 3 – *E. glaucinus*; 4 – *E. perotis*; 5 – *M. molossus*; 6 – *M. rufus*; 7 – *N. laticaudatus*; 8 – *A. lituratus*; 9 – *A. planirostris*; 10 – *C. perspicillata*; 11 – *P. discolor*; 12 – *M. nigricans*; 13 – *E. furinalis*; 14 – *L. ega*; 15 – *Lasiurus sp*; 16 – *L. cinereus*; 17 – *Peropteryx macrotis*; 18 – *R. naso*).

ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	****	0,8439	0,9868	0,9558	0,9058	0,9100	0,9253	0,8679	0,8537	0,8826	0,8534
2		****	0,8791	0,8856	0,9146	0,9086	0,9181	0,8741	0,8643	0,8849	0,8578
3			****	0,9695	0,8985	0,8984	0,9187	0,8595	0,8465	0,8685	0,8344
4				****	0,9403	0,9345	0,9421	0,9052	0,8959	0,9218	0,8857
5					****	0,9906	0,9901	0,9478	0,9321	0,9620	0,9378
6						****	0,9994	0,9573	0,9448	0,9718	0,9444
7							****	0,9509	0,9388	0,9678	0,9329
8								****	0,9893	0,9845	0,9668
9									****	0,9758	0,9534
10										****	0,9674
11											****
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											

Cont. Tabela 5

12	13	14	15	16	17	18
0,8358	0,8423	0,7639	0,8749	0,8097	0,8706	0,8744
0,8037	0,8224	0,7850	0,8598	0,8972	0,8131	0,8539
0,8372	0,8223	0,7815	0,8533	0,8088	0,8517	0,8699
0,8599	0,8706	0,7995	0,9071	0,8667	0,8971	0,9219
0,8766	0,9129	0,7975	0,9491	0,9022	0,9058	0,9349
0,9029	0,9363	0,8144	0,9722	0,9100	0,9292	0,9525
0,8984	0,9211	0,8190	0,9558	0,9048	0,9178	0,9473
0,9071	0,9433	0,8599	0,9548	0,9118	0,9322	0,9504
0,8958	0,9317	0,8463	0,9484	0,9099	0,9221	0,9497
0,9062	0,9457	0,8403	0,9733	0,9189	0,9489	0,9388
0,8783	0,9160	0,7972	0,9428	0,9105	0,9011	0,9161
****	0,9439	0,8318	0,9065	0,8318	0,8785	0,8877
	****	0,7944	0,9439	0,8692	0,9346	0,9255
		****	0,8318	0,8131	0,8037	0,8122
			****	0,8879	0,9346	0,9522
				****	0,8598	0,8822
					****	0,9349

Tabela 6: Valores médios da Identidade Genética, segundo Nei (1978) para as 23 espécies estudadas, para o gene mitocondrial 12/16S (1 - *C. abrasus*; 2 - *C. planirostris*; 3 - *E. auripendulus*; 4 - *E. bonariensis*; 5 - *E. glaucinus*; 6 - *E. perotis*; 7 - *M. temminckii*; 8 - *M. rufus*; 9 - *M. molossus*; 10 - *N. laticaudatus*; 11 - *N. macrotis*; 12 - *E. furinalis*; 13 - *L. ega*; 14 - *Lasiurus spp*; 15 - *L. cinereus*; 16 - *M. nigricans*; 17 - *M. riparius*; 18 - *A. lituratus*; 19 - *A. planirostris*; 20 - *C. perspicillata*; 21 - *P. discolor*; 22 - *P. macrotis*; 23 - *R. naso*).

esp ID	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a	9a	10a	11a	12a	13a	14a	15a	16a
1a	****a	0,9044a	0,9130a	0,8771a	0,8441a	0,8889a	0,9100a	0,9321a	0,9327a	0,9406a	0,8793a	0,9400a	0,8408a	0,9225a	0,9022a	0,9338a
2a	a	****a	0,8778a	0,8645a	0,7867a	0,8404a	0,8885a	0,9136a	0,9111a	0,8946a	0,8414a	0,8938a	0,8194a	0,8734a	0,8381a	0,8995a
3a	a	a	****a	0,8688a	0,8589a	0,9195a	0,9303a	0,9443a	0,9300a	0,9200a	0,8667a	0,9128a	0,8173a	0,8809a	0,9066a	0,9137a
4a	a	a	a	****a	0,7860a	0,8308a	0,8962a	0,8964a	0,8945a	0,8753a	0,7947a	0,8717a	0,8000a	0,8453a	0,8903a	0,8809a
5a	a	a	a	a	****a	0,9453a	0,8843a	0,8679a	0,8904a	0,9018a	0,8790a	0,8838a	0,7916a	0,8407a	0,8545a	0,8764a
6a	a	a	a	a	a	****a	0,9357a	0,9288a	0,9475a	0,9518a	0,9272a	0,9265a	0,8284a	0,8887a	0,8930a	0,9260a
7a	a	a	a	a	a	a	****a	0,9308a	0,9287a	0,9663a	0,8822a	0,9810a	0,8747a	0,9453a	0,9444a	0,9738a
8a	a	a	a	a	a	a	a	****a	0,9785a	0,9408a	0,8908a	0,9302a	0,8443a	0,9222a	0,9310a	0,9519a
9a	a	a	a	a	a	a	a	a	****a	0,9885a	0,9337a	0,9755a	0,8636a	0,9451a	0,9404a	0,9781a
10a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	****a	0,9377a	0,9753a	0,8776a	0,9416a	0,9355a	0,9880a
11a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	****a	0,9107a	0,7877a	0,8744a	0,8530a	0,9172a
12a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	****a	0,8916a	0,9515a	0,9513a	0,9829a
13a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	****a	0,8387a	0,8381a	0,8729a
14a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	****a	0,9033a	0,9576a
15a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	****a	0,9379a
16a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	****a
17a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
18a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
19a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
20a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
21a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
22a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
23a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Continuação Tabela 6:

17a	18a	19a	20a	21a	22a	23a
0,9101a	0,9390a	0,9454a	0,9327a	0,9351a	0,8366a	0,9427a
0,8258a	0,8913a	0,8939a	0,8799a	0,8830a	0,7872a	0,9090a
0,8594a	0,9040a	0,9070a	0,8954a	0,8975a	0,8205a	0,9177a
0,8194a	0,8856a	0,8925a	0,8767a	0,8770a	0,8065a	0,8943a
0,8436a	0,8784a	0,8795a	0,8681a	0,8734a	0,7710a	0,8702a
0,8856a	0,9174a	0,9188a	0,9084a	0,9104a	0,7889a	0,9074a
0,9212a	0,9668a	0,9637a	0,9575a	0,9657a	0,8255a	0,9628a
0,8820a	0,9397a	0,9469a	0,9278a	0,9407a	0,8128a	0,9411a
0,9154a	0,9607a	0,9686a	0,9443a	0,9677a	0,8300a	0,9382a
0,9272a	0,9668a	0,9709a	0,9482a	0,9711a	0,8218a	0,9708a
0,8475a	0,8983a	0,9077a	0,8793a	0,9077a	0,7606a	0,8873a
0,9290a	0,9730a	0,9738a	0,9647a	0,9719a	0,8214a	0,9672a
0,8516a	0,8696a	0,8636a	0,8636a	0,8635a	0,7355a	0,8728a
0,8809a	0,9447a	0,9476a	0,9306a	0,9480a	0,8065a	0,9401a
0,8903a	0,9358a	0,9284a	0,9297a	0,9239a	0,7871a	0,9390a
0,9362a	0,9738a	0,9859a	0,9611a	0,9798a	0,8389a	0,9768a
****a	0,9154a	0,9130a	0,9018a	0,9156a	0,7677a	0,9154a
a	****a	0,9847a	0,9889a	0,9783a	0,8733a	0,9757a
a	a	****a	0,9775a	0,9857a	0,8514a	0,9714a
a	a	a	****a	0,9731a	0,8451a	0,9724a
a	a	a	a	****a	0,8361a	0,9775a
a	a	a	a	a	****a	0,8577a
a	a	a	a	a	a	****a

Conclusões Gerais

Os resultados obtidos no presente trabalho apontam de maneira geral, para um conservacionismo molecular entre as diferentes espécies e gêneros de morcegos das famílias Molossidae e Phyllostomidae, apesar da grande diversificação das espécies pertencentes às famílias de Chiroptera, descrita pela literatura. Este conservacionismo foi evidenciado pelas análises de variabilidade e identidade genética das espécies analisadas, que apresentaram uma pequena variação. Esta variação intra e interespecífica, intra e inter genérica foi importante na caracterização da estrutura e comportamento genético, e nas análises de relacionamentos filogenéticos destas complexas famílias de morcegos. A partir delas foi possível concluir que:

1. o padrão de restrição obtido para os dois segmentos gênicos, de modo geral, apresentou-se conservado nas diferentes espécies analisadas;
2. o conjunto de dados obtido para o gene nuclear RAG2 apresentou um menor número de polimorfismos, indicando grande homogeneidade genética nas espécies analisadas.
3. os polimorfismos detectados pelo marcador RAG2, apesar do menor número, parecem ser mais informativos que aqueles detectados pelo marcador 12/16S, indicativo de que grande parte das variações detectadas pelo marcador nuclear, no conjunto das espécies analisadas, tenham ocorrido a mais tempo que as identificadas pelo marcador mitocondrial, sendo útil nas análises filogenéticas envolvendo táxons supra específicos;

-
4. parte da variação encontrada entre os dois conjuntos de dados (nuclear e mitocondrial) apesar de pequena, deve-se à natureza dos marcadores analisados, tais como, taxa de evolução diferente, tipo de herança (por exemplo, materna, no material mitocondrial), ou ainda presença de recombinação;
 5. os dados obtidos para os dois marcadores reforçam a formação dos grupos envolvendo as espécies *Artibeus lituratus* e *A. planirostris* de Phyllostomidae, assim como de *Molossus molossus* e *M. rufus* e, *Eumops perotis* e *E. glaucinus* de Molossidae;
 6. as incongruências nos relacionamentos das espécies *Eumops bonariensis* (família Molossidae) e, *Carollia perspiciata* e *Phyllostomus discolor* (família Phyllostomidae) confirmam a complexidade encontrada nessas espécies, o que já havia sido apontado por outros estudos;
 7. *Cynomops abrasus* (Molossidae) e *P. discolor* (Phyllostomidae) foram apontadas nas diferentes topologias como sendo a condição basal para os táxons examinados no presente trabalho. Contudo, os dois conjuntos de dados não foram suficientemente informativos na determinação da condição basal.
 8. as topologias obtidas estão consistentes com os dados da literatura para os táxons da família Phyllostomidae analisados.
 9. os dados obtidos a partir da variabilidade, identidade genética e relacionamento filogenético para os táxons pertencentes a família Molossidae são inéditos;

10. os dados gerados a partir da utilização da técnica PCR-RFLP e a utilização de mais de um marcador foram eficientes na caracterização da estrutura genética dos táxons estudados, constituindo importante ferramenta nas análises genéticas e filogenéticas de diferentes táxons, contribuindo para melhor interpretação do processo evolutivo ocorrido nas espécies de Chiroptera.

REFERÊNCIAS

- ARIAS M. C; INFANTE-MALACHIAS, M. E. **RFLP**: o emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismos no DNA - In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos. 2001. p.143-152.
- AVISE, J. C. **Phylogeography**: the history and formation of species. Cambridge and London. Harvard University Press, 2000.
- AVISE, J. C.; WALKER, D. Species realities and numbers in sexual vertebrates : perspectives from na asexually transmitted genome. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.96, p. 992-995, 1999.
- BAKER, R. Comparative cytogenetics of the New World leaf-nosed bats (Phyllostomatidae). **Period. Biol.**, v. 75, p. 37-45, 1973.
- BAKER, R. J.; BASS, R. A.; JOHNSON, M. A. Evolutionary implications of chromosomal homology in four genera of Stenodermatine bats (Phyllostomidae: Chiroptera), **Evolution**, v. 33, p. 220-226, 1979.
- BAKER, R. J.; HOOD, C. S.; HONEYCUTT, M 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.; PORTER, C. A.; PATTON, J. C.; VAN DEN BUSSCHE, R. A. Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. **Occas. Pap. Mus. Tex. Tech Univ.**, v. 202, p. 1-16, 2000.
- BAKER, R. J.; HOOFER, S. R.; PORTER, C. A.; VAN DEN BUSSCHE, R. A. Diversification among New World leaf-nosed bats: an evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic of DNA sequence. **Occas. Pap. Mus. Tex. Tech Univ.**, v. 230, p. 1-32, 2003.
- BRADLEY, R. D.; BAKER, R. J. A test of the genetic species concept: cytchrome-b sequences and mammals. **J. Mammal.**, v. 82, n. 4, p. 960-973, 2001
- CORNELI, P. S.; WARD, R. H. Mitochondrial genes and mammalian phylogenies: increasing the realibility of branch lenght estimation. **Mol. Biol. Evol.**, v. 17, n. 2, p. 224-234, 2000.
- DITCHFIELD, A. D. The comparative phylogeography of neotropical Mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. **Mol. Ecology.**, v. 9, p. 1307-1318, 2000.

EGER, J. L. Systematics of the genus *Eumops* (Chiroptera: Molossidae). **Life Sci. Contr. Royal Ont. Mus.**, v. 110, p. 1-69, 1977.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FINATO, A. O.; VARELLA-GARCIA, M.; TAJARA, E. H.; TADDEI, V. A.; MORIELLE-VERSUTE, E. Intrachromosomal distribution of telomeric repeats in *Eumops glaucinus* and *Eumops perotis* (Molossidae, Chiroptera). **Chromosome Res.**, v. 8, p. 563-569, 2000.

FREEMAN, P. W. A multivariate study of the family Molossidae (Mammalia, Chiroptera): morphology, ecology, evolution. **Fildiana Zool.**, v. 7, p. 1-105, 1981.

GARDNER, A L. Taxonomic implications of the karyotypes of *Molossops* and *Cynomops* (Mammalia; Chiroptera). **Proc. Biol. Soc. Wash.**, v. 89, p. 545-549, 1977.

GREGORIN, R. **Filogenia de Molossidae Gervais, 1855 (Mammalia:Chiroptera)**. 2000. 247f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

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

GREGORIN, R.; TADDEI, V. A. Chave artificial para a identificação de molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). **J. Neotrop. Mammal.**, v. 9, n. 1, p. 13-32, 2002.

GRIFFTHS, T. A. Systematics of the New World nectar-feeding bats (Mammalia, Phyllostomidae), based on the morphology of the hyoid and lingual regions. **Am. Mus. Novitates.**, v. 2742, p. 1-45, 1982.

GRIFFTHS, T. A.; TRUCKENBROD, A.; SPONHOLTZ, P. J. Systematics of megadermatid bats (Chiroptera, Megadermatidae), based on hyoid morphology. **Am. Mus. Novitates.**, v. 3041, 1992.

HENDY, M. D.; PENNY, D. Branch and bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. **Math. Biosci.**, v.59, p. 277-290, 1982.

HILL, J. E., HARRISON, D. L. The baculum in the Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) with a systematic review, a synopsis of *Pipistrellus* and *Eptesicus*, and the description of a new genus and subgenus. **Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. Zool. ser.**, v. 52, p. 225-305, 1987.

HILLIS, D. M., HUELSENBACK, J. P. Signal, noise, and reliability in molecular Phylogenetic analyses. **J. Hered.**, v. 83, p. 189-195, 1992.

HILLIS, D. M.; MABLE, B. K.; LARSON, A.; DAVIS, S. K.; ZIMMER, E. A. Nucleic acids IV: sequencing and cloning. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. (Ed.) **Molecular. Systematics**, 2. ed. Sunderland: Sinauer, 1996. p. 321-369.

HONEYCUTT, R. H.; GREENBAUM, I. F.; BAKER, R. J.; SARICH, V. M. Molecular evolution of vampire bats. **J. Mammal.**, v. 62, p. 805-811, 1981.

HONEYCUTT, R. L.; SARICH, V. M. Albumin evolution and subfamilial relationships among New World leaf-nosed bats (Family Phyllostomidae). **J. Mammal.**, v. 68, p. 508-517, 1987.

HOOD, C. S., BAKER, R. J. G- and C- banding chromosomal studies of bats of the family Emballonuridae. **J. Mammal.**, v. 67, p. 705-711, 1986.

HOOVER, S. R.; REEDER, S. A., HANSEN, E. W., VAN DEN BUSSCHE, R. A. Molecular phylogenetics and taxonomic review of noctilionoid and vespertilionoid bats (Chiroptera:Yangochiroptera). **J. Mammal.**, v. 84, n. 3, p. 809-821, 2003.

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

JUSTE, J.; IBÁÑEZ, C.; MUÑOZ, J.; TRUJILLO, D.; BENDA, P.; KARATAS,A.; RUEDI, M. Mitochondrial phylogeography of the long-eared bats (*Plecotus*) in the Mediterranean Palaearctic and Atlantic Islands. **Mol Phyll. Evol.**, v. 31, p. 1114-1126, 2004.

KOOPMAN, K. F. Zoogeography of bats. In: SLAUGHTER, B. H.; WALTON, D. W. (Ed.). **About bats: a chiropteran biology symposium**. Dallas: Southern Methodist University Press, 1970. p. 29-46.

KOOPMAN, K.F. A synopsis of the families of bats. **Bat Res. News**, v. 25, p. 25-29, 1984.

KOOPMAN, K. F. Order Chiroptera In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Ed.) **Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1993. p. 137-241.

KOOPMAN, K. F. Chiroptera: systematics. handbook of zoology. **Mammalia.**, v. 8, p. 1-217, 1994.

-
- LEITE-SILVA, C.; SANTOS, N.; FAGUNDES, V.; YONENEGA-YASSUDA, Y.; SOUZA, M. J. Karyotypic characterization of the bat species *Molossus ater*, *M. molossus* and *Molossops planirostris* (Chiroptera, Molossidae) using FISH and banding techniques. **Hereditas.**, v. 138, p. 94-100, 2003.
- LEWIS-ORITT, N., VAN DEN BUSSCHE, R. A., BAKER, R. J. Molecular evidence for evolution of piscivory in *Noctilio* (Chiroptera: Noctilionidae). **J. Mammal.**, v. 82, p. 748-759, 2001.
- LIM, B. K. Cladistic reappraisal of neotropical Stenodermatine bat phylogeny. **Cladistic**, v.9, p. 147-165, 1993.
- LIM, B. K.; PEDRO, W. A., PASSOS, F. C. Differentiation and species status of the neotropical yellow-eared bats *Vampyressa pusilla* and *V. thyone* (Phyllostomidae) with a molecular phylogeny and review of the genus. **Acta Chiropterol**, v. 5, p. 15-29, 2003.
- MARCHESIN, S. R. C. **Análise citogenética em espécies de Vespertilionidae dos gêneros *Eptesicus*, *Histiotus*, *Lasiurus* e *Myotis* (Chiroptera, Mammalia).** 2002. 98 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.
- MARCHESIN, S. R. C.; MORIELLE-VERSUTE, E. Chromosome studies of brazilian vespertilionids *Lasiurus cinereus* and *Lasiurus ega* (Mammalia, Chiroptera). **Inheringia Ser. Zool.**, Porto Alegre, v. 94, n. 4, p.443-446, 2004.
- MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S. R. (Ed.) **Biologia molecular e evolução**, Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 153-161.
- McKENNA, C. M.; BELL, S. K. **Classification of mammals above the species level.** New York, Columbia University, 1998. 631p.
- MILLER, G. S. The families and genera of bats. **Bull. U. S. Natl. Mus.**, v. 57, p. 1-282, 1907.
- MORALES, J. C.; PATTON, J. C.; BICKHAM, J. W. Partial endonuclease digestion mapping of restriction sites using PCR-amplified DNA. **PCR Methods Appl.**, v. 2, p. 228-233, 1993.
- MORALES, J, C. BICKHAM, J. W. Molecular systematics of the genus *Lasiurus* (Chiroptera:Vespertilionidae) based on restriction-site maps of the mitochondrial ribosomal genes. **J. Mammal.**, v.76, p. 730-749, 1995.

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

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.

NEI, M.; FUERST, P. A.; CHAKARABOTY, R. Subunit molecular weight and genetic variability of proteins in natural populations. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 75, n. 1, p. 3359-3362, 1978.

NEI, M., LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

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.

NIKAIDO, M.; KAWAI, K.; CAO, Y.; HARADA, M.; TOMITA, S.; OKADA, N. HASEGAWA, M. Maximum likelihood analysis of the complete mitochondrial genomes of eutherians and a reevaluation of the phylogeny of bats and insectivores. **J. Mol. Evol.**, v. 53, p. 508-516, 2001.

NOVACEK, M. Phylogenetic analysis of the chiropteran auditory region. In: WILSON, D. E.; GARDNER, A. L. (Ed.). In: INTERNATIONAL BAT RESEARCH CONFERENCE, 5, 1980, Texas. **Proceedings...** Texas: Texas Tech. University, 1980. p. 317-330.

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

OWEN, R.D. Phylogenetic analyses of the bat subfamily Stenodermatinae. **Spec. Publ. Mus. Texas Tech. University**, v. 26, p. 1-65, 1987.

OWEN, R. D. The systematic status of *Dermanura concolor* (Peters, 1865) (Chiroptera: Phyllostomidae). With description of a new genus. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 206, p. 18-25, 1991.

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

PETERS, S. L.; LIM, B. K.; ENGSTROM, M. D. Systematics of dog-faced bats (*Cynomops*) based on molecular and morphometric data. **J. Mammal.**, v. 83, n. 4, p. 1097-1110, 2002.

PETTIGREW, J. D; JAMIESON, B. G.; ROBSON, S. K.; HALL, L. S.; MCANALLY K. I.; COOPER, H. M. Phylogenetic relationships between microbats, megabats and primates (Mammalia: Chiroptera and Primates). **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, v. 325, p. 489-559, 1989.

PIERSON, E.; SARICH, V. M.; LOWENSTEIN, J. M., DANIEL, M. J. RAINEY, W. E. A molecular link between the bats of New Zealand and South America. **Nature**, v. 323, p.60-63, 1986.

RIVERS, N. M.; BUTLIN, R. K.; ALTRINGHAM, J. D. Genetic population structure of Natterer's bats explained by mating at swarming sites and philopatry. **Mol. Ecol.**, v. 14, p. 4299-4312, 2005.

ROBBINS, L. W.; SARICH, V. M. Evolutionary relationships in the family Emballonuridae (Chiroptera). **J. Mammal.**, v. 69, p. 1-13, 1988.

RUSSELL, A. L., MEDELLIN, R. A., McCracken, F. G. Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*) **Mol. Ecol.**, v. 14, p. 2207-2222, 2005.

RUSSO, C. A. M.; TAKEZAKI, N.; NEI, M. Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. **Mol. Biol. Evol.**, v. 13, n. 3, p. 525-536, 1996.

RYAN M. J. Comparative morphology of the glans penis in *Molossus*, *Promops*, and *Eumops* (Chiroptera: Molossidae). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 206, p. 122-137, 1991.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, F.; MANIATIS T. **Molecular cloning**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCATENA, M. P. **Análise molecular em morcegos do gênero *Artibeus* Leach, 1821 (Chiroptera, Phyllostomidae) a partir de espécimes depositados em coleção**. 2006. (60 f). Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

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. 3-26.

SIMMONS, N. B. Bat phylogeny: na evolutionary context for comparative studies. In: ADAMS, R. A.; PEDERSEN, S. C. (Ed.) **Ontogeny, functional ecology and evolution of bats**. Cambridge: Cambridge University Press., 2000. p. 9-58.

SIMMONS, N. B.; GEISLER, J. H. Phylogenetic relationships of *Icaronycteris*, *Archeonycteris*, *Hassianycteris*, and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in Microchiroptera. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 235, p. 1-182, 1998.

SIMMONS, N. B.; CONWAY, T. M. Phylogenetic relationships of mormoopid bats (Chiroptera: Mormoopidae) based on morphological data. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** v. 258, p. 100, 2001.

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

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: Freeman W. H, 1973.

SPRINGER, M. S.; DeBRY, R. W.; DOUADY, C.; AMRINE, H. M.; MADSEN, O.; JONG, W. W.; STANHOPE, M. J. Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction. **Mol. Biol. Evol.**, v. 18, p. 132-143, 2001.

STRANEY, D. O.; SMITH, M. H.; GREENBAUM, I. F.; BAKER, R. J. Biochemical genetics. In: BAKER, R. J.; JONES, J. K.; CARTER, D. C. (Ed.), *Biology of the bats New World family Phyllostomidae*. P. III. **Spec. Publ. Mus. Texas Tech Univ.**, v.16, p. 157-176, 1979.

SUDMAN, P. D.; BARKELEY L. J.; HAFNER, M. S. Familial affinity of *Tomopeas ravus* (Chiroptera) based on protein eletrophoretic and cytochrome b sequence data. **J. Mammal.**, v. 75, p. 365-377, 1994.

SWOFFORD, D. L. PAUP. **Phylogenetic analysis using parsimony** (*and other methods). Version 4. Sunderland: Sinauer, 2002. 1 CD-ROM.

TATE, G. H. H. Results of the Archbold Expeditions, nº 47: review of the vespertilionine bats, with special attention to genera and species of the Archbold Collections. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v.80, p. 221-297, 1942.

TADDEI, V. A. Biologia reprodutiva de Chiroptera: perspectivas e problemas. **Inter-Facies**, São José do Rio Preto, n. 6, p. 1-18, 1980.

TADDEI, V. A. Sistemática de quirópteros. **Bol. Inst. Pasteur**, São Paulo, v.1, n. 2, p. 3-8, 1996.

TADDEI, V. A. Taxonomia de morcegos. **Biológico**, São Paulo, v. 59, n. 1, p.89-92, 1997.

TEELING, E. C.; SCALLY, M.; KAO, D. J.; ROMAGNOLI, M. L.; SPRINGER, M. S.; STANHOPE, M. J. Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats. **Nature**, v. 403, p. 188-192, 2000.

TEELING, E. C.; MADSEN, O.; VAN DEN BUSSCHE, JONG, W.W; STANHOPE, M. J.; SPRINGER, M. S. Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophoid microbats. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.99, n. 3, p. 1431-1436, 2002.

TEELING, E. C.; SPRINGER, M. S.; MADSEN, O.; BATES, P.; O'BRIEN S. J.; MURPHY, W. J. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. **Science**, v.307, p. 580-584, 2005.

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

VAN DEN BUSSCHE, R. A.; BAKER, R. J. Molecular phylogenetics of the new world bat genus *Phyllostomus* based on cytochrome DNA sequence variation. **J. Mammal.**, v. 74, p. 793-802, 1993.

VAN DEN BUSSCHE, R. A.; HUDGEONS, J. L.; BAKER, R. J. Phylogenetic accuracy, stability, and congruence. Relationships within and among the New World bat genera *Artibeus*, *Dermanura* and *Koopmania*. In: KUNZ, T. H.; RACEY, P. A. (Ed.). **Bat biology and conservation**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1998. p 59-71.

VAN VALEN, L. The evolution of bats. **Evol. Theory**. v. 4, p. 104-12, 1979.

VOLLETH, M.; HELLER, K-G. Karyosystematics of plecotine bats: a reevaluation of chromosomal data. **J. Mammal.**, v. 75, p. 416 – 419, 1994a.

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

WARNER, J. W.; PATTON, J. L.; GARDNER, A. L.; BAKER, R. J. Karyotypic analyses of twenty-one species of molossid bats (Molossidae: Chiroptera). **Can. J. Genet. Cytol.** v. 16, p. 165-176, 1974.

WERMAN, S. D.; SPRINGER, M. S.; BRITTEN, R. J. Nucleic Acids I: DNA-DNA hybridization. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. (Ed.) **Molecular. Systematics**, 2 ed. Sunderland: Sinauer, 1996. p. 180.

WETTERER, A. L.; ROCKMAN, M. V.; SIMMONS, N. B. Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): Data from diverse morphological systems, Sex chromosomes, and restriction sites. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 248, 200p, 2000.

WICKLIFFE, J. K.; HOFFMANN, F. G.; CARROLL, D. S.; DUNINA-BARKOVSKAYA, Y. V.; BRADLEY, R. D.; BAKER, R. J. Intron 7 (F^{GB} – I7) of the fibrinogen, B Beta Polypeptide (F^{GB}): a nuclear DNA phylogenetic marker for mammals. **Occas. Pap. Mus. Tex. Tech Univ.**, v. 219. p. 1-6, 2003.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. **Popgene version 1.31 – Microsoft Window**: based freeware for population genetic analysis. 1999.

Apêndice I

Discriminação dos animais analisados no presente trabalho pela família, espécie, número de registro, procedência, procedimentos efetuados após a extração de DNA (A: amplificação; D: digestão pelas 10 enzimas). (+ = satisfatório; - = insatisfatório; +* = dado não utilizado).

Família	Espécie	Registro	Procedência	Procedimentos efetuados			
				Gene 12/16S		Gene RAG2	
				A	D	A	D
Molossidae	<i>Cynomops abrasus</i>	CFC270	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-
		CFC787	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-
		CFC788	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-
		CFC789	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-
		CFC790	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-
	<i>Cynomops planirostris</i>	CFC212	Serra das Araras-MT ¹⁴	+	+	-	-
		CFC392	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC399	Botucatu-SP ¹	+	+	-	-
	<i>Eumops auripendulus</i>	CFC414	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC538	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	-	+	-
		CFC459	Caiman-Miranda-MS ¹³	+	+	+	+
	<i>Eumops bonariensis</i>	CFC441	Nova Aliança-SP ⁷	+	+	+	+
		CFC444	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-
	<i>Eumops glaucinus</i>	CFC539	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	-
		CFC556	Nova Granada-SP ⁸	+	+	+	+
	<i>Eumops perotis</i>	CFC676	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC384	Bady Bassitt-SP ²	+	+	+	+
		CFC413	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC508	Mirassol-SP ⁵	+	+	+	+
		CFC630	Mirassol-SP ⁵	+	+	+	-
		CFC633	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-
		CFC347	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-
		CFC373	Campo Grande-MS ¹²	+	+	-	-
		CFC528	Mirassol-SP ⁵	+	+	-	-
		CFC546	Mirassol-SP ⁵	+	+	-	-
	<i>Molossus rufus</i>	CFC631	Mirassol-SP ⁵	+	+	-	-
		CFC653	Olímpia-SP ⁹	+	+	-	-
		CFC654	Mirassol-SP ⁵	+	+	+	-
		CFC391	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC434	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC436	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-
		CFC609	Nova Aliança-SP ⁷	+	+	+	+
		CFC675	Guapiaçú-SP ⁴	+	+	+	+
		CFC558	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC560	Bady Bassitt-SP ²	+	+	+	+
	<i>Molossus molossus</i>	CFC677	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-
		CFC726	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC805	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC251	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC298	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-
		CFC393	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC397	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC737	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC768	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC519	Campo Grande-MS ¹²	+	+	-	-
	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	CFC520	Campo Grande-MS ¹²	+	+	-	-
		CFC521	Campo Grande-MS ¹²	+	+	+	-
		CFC601	Campo Grande-MS ¹²	+	+	-	-
		CFC602	Campo Grande-MS ¹²	+	+	-	-
		CFC624	Campo Grande-MS ¹²	+	+	+	-
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	CFC294	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC295	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-
		CFC297	Cedral-SP ³	+	+	-	-
		CFC299	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC567	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	-	-	-
Vespertilionidae	<i>Eptesicus furinalis</i>	CFC294	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC295	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-
		CFC297	Cedral-SP ³	+	+	-	-
		CFC299	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+
		CFC567	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	-	-	-

Phyllostomidae	<i>Lasiurus cinereus</i> <i>Lasiurus ega</i> <i>Lasiurus blossevillii</i> <i>Myotis nigricans</i>	CFC603	Nova Aliança-SP ⁷	+	-	-	-	
		CFC607	Nova Aliança-SP ⁷	+	-	-	-	
		CFC267	Nova Aliança-SP ⁷	+	+	+	+	
		CFC396	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+	
		CFC367	Cedral-SP ³	+	+	+	+	
		CFC545	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+	
		CFC569	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-	
		CFC648	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-	
		CFC700	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-	
		CFC720	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-	
	<i>Myotis riparius</i> <i>Artibeus lituratus</i>	CFC782	Neves Paulista-SP ⁶	+	+	-	-	
		CFC579	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-	
		CFC235	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+	
		CFC280	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+	
		CFC281	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	-	
		CFC282	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+	
		CFC427	Neves Paulista-SP ⁶	+	+	-	-	
		CFC617	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	-	
		CFC796	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-	
		<i>Artibeus planirostris</i>	CFC271	Neves Paulista-SP ⁶	+	+	+	+
	CFC272		Neves Paulista-SP ⁶	+	+	+	+	
	CFC374		Campo Grande-MS ¹²	+	+	+	+	
	CFC445		São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-	
	CFC484		São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+	
	CFC541		Nova Granada-SP ⁸	+	+	-	-	
	CFC477		São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+	
	CFC480		São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-	
	CFC548		São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	-	+	+	
	CFC549		São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	-	-	-	
	<i>Phyllostomus discolor</i> <i>Carollia perspicillata</i>	CFC795	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-	
		CFC433	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	-	
		CFC759	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+	
		CFC772	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	-	-	
		CFC774	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	+	+	+	
		CFC777	São José do Rio Preto-SP ¹⁰	+	-	+	+	
Emballonuridae		<i>Peropteryx macrotis</i> <i>Rhynchonycteris naso</i>	CFC247	Serra das Araras-MT ¹⁴	+	+	+	+
			CFC213	Serra das Araras-MT ¹⁴	+	+	+	+
			CFC783	Aquidauana-MS ¹¹	+	+	+	+
			CFC785	Aquidauana-MS ¹¹	+	+	+	-
	CFC855		Campo Grande-MS ¹²	+	+	-	-	
Total de indivíduos		94	95	88	53	43		

Localidade	Longitude	Latitude
¹ Botucatu-SP	-48.4450	-22.8858
² Bady Bassitt-SP	-49.4453	-20.9181
³ Cedral-SP	-49.2683	-20.9028
⁴ Guapiaçú-SP	-49.2203	-20.7950
⁵ Mirassol-SP	-49.5211	-20.8192
⁶ Neves Paulista-SP	-49.6297	-20.8461
⁷ Nova Aliança-SP	-49.4961	-20.0158
⁸ Nova Granada-SP	-49.3142	-20.5339
⁹ Olímpia-SP	-48.9147	-20.7372
¹⁰ São José do Rio Preto-SP	-49.3794	-20.8197
¹¹ Aquidauana-MS	-55.7872	-20.4711
¹² Mato Grosso do Sul-MS	-54.6464	-20.4428
¹³ Miranda-MS	-54.3783	-20.2406
¹⁴ Serra das Araras-MT	-56.8333	-15.2500

fonte: IBGE

```
001000010001000100000000110000001000000010100000010001100000001000
000100010100100000000000011000000011000000
0010000000011000100001000011000001000000010100000010001100000001000
00010000001001000000000000011000000011000000
```

```
0011100000000100000000000001100000010000000101000001000010000000101000
010000011000000000000000010001000000010100000
```

```
00100001001100010001000001110000100000001010000110001100000101000
010100010100100000000000001110000011100000
00100001000100010000000011000000100000001010000110001000010101000
000100010100100000000000001100000011100000
001100000011000100000000011010001000000011100000010101100001011000
000110010110100000000000001110000011010000
```

```
00100000000010001000100000111000000000000000100000110001000010101000
010100010100100000000000011000000011100000
0010000000011000100000000011000001000000010100000010001000001101000
0101000101001000000000000001100000011000000
0010100000001000000100000001011001011000000100000000011000001001000
000101010100100000000001100101000010001000
```

```
001100000000100000000000000000001010000000010000000001000000001000
00000000000000000000000000000000100000110010000000
001000010001000000000000000010000110000000000100000000001000000001000
00000001100000000000000000001001100000010001000
10110000000010000000000000000010000101000000010100000010001000010001000
0000011100001000000000000000001100000010001000
00110000000010000000000000000010000101000000000100000000001000000001000
0000000100000000000000000000000010001100000010000000
```

```

11000000000010000000000000000000001000000000100000000001000
000000010000000000000000000000000000000000000000000000000000
0010000000001000000000000000000000101000000000100000000001000
0000000100000000000000000000000000100000010000000
0011000000001000000000000000010000101000000000100000000001000
0000000100000000000000000000000000100000010000000
0010000100010001000000000010000101000000010100000010001000010001000
0001001100001000000000000001100000011000000

```

```
10100000000010000000000000000000000010000000001000000000010000000001000
00000001110000000000000000000000000000000000000
```

001100100001000000000000010000101000100010100000010001000000001000
00000010000001010000000001100000011000000
00110010000100000000000000010000101000100010100000010001000000001000
00000010000001010000000001100000011000000
00110000000100010000000000000101101000000010100000010001000010001000
0001001100001000000000000000100010011000000
101000000011000000000000000100000110000000001000000000010000000001000
0000001100001000000000000001100000010000000

Artibeus lituratus

0001110000011111100001000001000011111000001101000000010000000001100
000000010110000000000000000100000010001100
0011110000011000100000000000000010001100001101000000011000000001110
00000001001100
0001010000010000000000100000000001000000000010000000000010000000001000
0000000010010000000000000001000000100000000

Artibeus planirostris

00010100000110001000000000000000010001100001111000000011100000001110
00000001000100
100111000001110101100000000000000100000000001000000000010000000001000
00000001000100
000101000000000011000000000000000100000000001000000000010000000001000
00000001000100
0011010000010000000000000000000000010000000001000000000010000000001000
0000000100011000

Carollia perspicillata

001101100001000000000000000000000100000000001000000000010000000001000
000000011100
000100000101000000000111000000001000001100100011000001001100001001
10000000000000001100000000000001110000011
0011111000010000000000000000000000010000000001000000001001000000001000
001000011100

Phyllostomus discolor

00011000110100000000010000000000100000000001000000000010000000001000
000000000001000000000000000000000110000000
0001010000010000000001000000000010000000001000000000010000000001000
000000000001000000000000000000000110000000

Myotis nigricans

0000110000010001000000000000000001000000010100000010001000001001000
000000000000001100000100

Eumops furinalis

00001101000100000000000000000000010000000001000000000010000000001000
000000000000001100
0000110100010000000000000000000000010000000001000000000010000000001000
000000000000001100

Lasiurus ega

000101000001000110010000000000001010100010100100110001000011001000
010000011000000000111000000000000000000000

Lasiurus blossevilli

000000000001000000000000000000001000000000100000000001000000001000
00000000000000000001000000000000000000000000

Lasiurus cinereus

000101000001000000010000100001001000000000100000000001000000001000
01000011000000000000001000000000110000000

Peropteryx macrotis

000001010001000000000000000000001000000000100000000001000000001000
00000000110011000000000000000000000000000000

Rhynchonycteris naso

101011000001000000000000000000001000000000100000000001000000001000
00000001101010000000000000000000000000000000
100000000010000000000000000000001000000000100000000001000000001000
00000001001010000000000000000000000000000000

Apêndice III: Matriz binária gerada a partir dos dados produzidos para o gene mitocondrial 12/16S (0=ausência; 1=presença).

Cynomops abrasus

11100000000000000011011100000000000011100000000001001010000000011010000000001110000000000001100
01000000000100101000010000000001001001010000000111000000
101000000000010000010001101000000000001111000000000000001000010000110000000000001001100000000000100
0010000000011010101000000000000110010000010000100110000
10100000000001000001000110100000000000110000000000000001000010000000011100000001000100000000000110
0010000100011010001000000000000110000000010000100000000
1010000000000000000100000000000000000011000001000000010111101000000001100000001011100100000000100
0010000000010000000000000000000110010000010000100000000
10100000000000000000000100111001000000000011000001000000000100001000011001110000000101100110000000100
00100000000100010100000000000011001000001000000000000

Cynomops planirostris

0010001000001000000000000001000000000011000000000000001000010000110001000000001000000010000000011
0010000000000000000000000000000110010000110000100000000

Eumops auripendulus

1000001000000100000100010000000110000000000000000111000001100001011000001001000101000010111
00000100001001000001000011000010110100100100000110101000
10000000000001000001000000000000000001100000000000000000000110000000000001000000000000000111
00000000000010000000010010000010110010100100000110101000
10000010000001000001000100001001100000011000000000000000111000001100001011000001001000101000011111
00000000001010000010010000000010110010000110100100000000

Eumops bonariensis

0000000000000000000110000000000000000011000000000000001000001000100001000000001001000000000000010
00000000101010100000000000000001110010001111001100000000

Eumops glaucinus

000010000000010000110000001000001100000100001100000100000001100000001100001000000000100010000
00010100000100001100110010000000100010100010000100001010
000010000000010000110000001001001000001100000100001100000100000001100000001100001000000000100010001
00010100000100001000001010000000100010100010000100001010
000010100000010000111000001001001000000110000100001100000100000001100000001100001000000000100010001
00010100000100001000010001000000000010001110100100001100
000010100000011000111000001010001000001100001000001100000100000000000000011000000000000000100010001
0010010100010010000000000101000000000000000000100100011100
000010000000011000110000001010001000000110000100001100000100000001100000001100001000000000100011011
0001000000010000000001001010000000010001110100100001100

Eumops perotis

000010100000011000111000001010001000000110000101001100001100000001000000101010001000000011000010011
0001010100010000000001001000000000000000000100100001100
000010100001000100011000000011001000000110000100000100000100000001100000001010001000000001000010011
00010100001100001010010010000000110110000110000100001100
00000000000000000011000000000000000001100010000000100001000000010000000000000100000000100010011
00000100000000000101000001000000000000000000000000000000
000010000001000100011000000010001000001100010000000100000100000001100000001100001000000000100010011
00000100000100100010000010100000110000000010000100001100
0000101000000100011100000001100100000110001000000001000100000001100000001010001000000001000010011
00001100001101001010000010000000110110100110000100001100

Molossops temminckii

000100000100000000010000000000000000110000000001000000000001001100110010000101000000000000000010
001000000001000000000000000000001100010100111100100100000
10000000100000000000110010000000000000011000000000000000000001100000000010001000000000001000010
00000000000101000000000000000001100010100111100100100000
00000000000000000001100000000000000000011000000000000000000001100000000000010000000000000010
00000000000100000000000000000000000000000000000000100100000
00010000010000000001000000000000000001100000000000000000000001100000000000010000000000000010
00000000000100000000000000000000100010001111100100000000
00000000000000000011000000000000000001100000000000000000000001100000000000010000000000000010
000001000001000000000000000000000100000001101100100000000
0000000000000000001100000000000000000110000000000000000000011000000000000100000000000000010
00000100000100000000000000000000010001010000000100000000

Molossus rufus

101000000000000000011100000000000000000110000000000000000000011000000000000100000000000000011
00100000000010010000000100000000110010100110000100000100
1000100000000000100100000000000000000110000000000000000000011000000000000100000000000000011
001000000000100000000001000000000000001000000100000100

RESUMO

A proposta do presente trabalho foi analisar as relações de proximidade genética e evolutiva entre espécies de Chiroptera, a partir da utilização da técnica PCR-RFLP para a obtenção de dados moleculares para os genes mitocondrial 12/16S e nuclear RAG2. Foram utilizados 11 espécies de Molossidae (*Cynomops abrasus*, *C. planirostris*, *Eumops auripendulus*, *E. bonariensis*, *E. glaucinus*, *E. perotis*, *Molossops temminckii*, *Molossus rufus*, *M. molossus*, *Nyctinomops laticaudatus* e *N. macrotis*), quatro de Phyllostomidae (*Artibeus lituratus*, *A. planirostris*, *Carollia perspicillata* e *Phyllostomus discolor*), seis de Vespertilionidae (*Myotis nigricans*, *M. riparius*, *Lasiurus ega*, *L. cinereus*, *Lasiurus* sp. e *Eptesicus furinalis*), duas de Emballonuridae (*Rhynchonycteris naso* e *Peropteryx macrotis*). A partir dos dados gerados para as espécies, o relacionamento filogenético entre os táxons das famílias Molossidae e Phyllostomidae foram especulados. Em Molossidae, o gênero *Eumops*, principalmente *E. perotis* e *E. glaucinus* formaram um clado monofilético. O táxon *E. bonariensis* apresentou incongruências, revelando a complexidade deste gênero. Membros do gênero *Molossus* formaram clado robusto e consistente, corroborando dados da literatura referente a monofilia das espécies, contudo, apresentou-se derivado a todos os outros táxons enquanto, *C. abrasus* e *C. planirostris* ocuparam posição basal. A análise filogenética para os táxons de Phyllostomidae permitiu confirmar a hipótese de monofilia de *A. lituratus* e *A. planirostris*, e apontar *C. perspicillata* como grupo irmão destes. *Phyllostomus discolor* apresentou-se basal em relação aos outros três táxons examinados. A

análise genética das 23 espécies das famílias Molossidae, Phyllostomidae, Vespertilionidae e Emballonuridae gerou um número grande de fragmentos, sendo 107 para o gene RAG2 e 155 para o 12/16S, combinados em 139 e 402 haplótipos, respectivamente. Os valores de variação gênica detectados foram baixos para as duas seqüências (0,13 - RAG2 e 0,15 - 12/16S) refletindo o conservacionismo dessas, reforçado pelos valores altos de identidade genética inter e intra-específicas (74 – 100%). As espécies com maior variabilidade genética foram variáveis nas análises do RAG2 (*Eumops perotis*, *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata* e *Molossus rufus*) e 12/16S (*Nyctinomops laticaudatus* e *Carollia perspicillata*), contudo uma delas, *C. perspicillata* foi a que apresentou maior variação intra-específica. No conjunto de espécies e gêneros das famílias, Molossidae foi a que mais variou, em consequência da variação apresentada especialmente pelas espécies de *Eumops* e *Nyctinomops*. A variabilidade detectada no presente estudo para as diferentes espécies é extremamente importante e poderá orientar ou subsidiar estudos com diferentes finalidades. A complexidade dos táxons de Chiroptera observada em outras análises, como citogenética e morfológica também foi revelada pela análise de RFLP, reforçando a importância dessa metodologia nos estudos evolutivos do grupo.

Palavras chaves: variabilidade genética, filogenética, PCR-RFLP, polimorfismos, morcegos.

Abstract

The aim of this study was to assess the relationships of genetic and evolutive proximity among Chiroptera species, through the obtention of molecular data through mitochondrial (12/16S) and nuclear (RAG2) genes by PCR-RFLP technique. Eleven species of Molossidae (*Cynomops abrasus*, *C. planirostris*, *Eumops auripendulus*, *E. bonariensis*, *E. glaucinus*, *E. perotis*, *Molossops temminckii*, *Molossus rufus*, *M. molossus*, *Nyctinomops laticaudatus* and *N. macrotis*), four species of Phyllostomidae (*Artibeus lituratus*, *A. planirostris*, *Carollia perspicillata* and *Phyllostomus discolor*), six species of Vespertilionidae (*Myotis nigricans*, *M. riparius*, *Lasiurus ega*, *L. cinereus*, *Lasiurus* sp. and *Eptesicus furinalis*), two species of Emballonuridae (*Rhynchonycteris naso* and *Peropteryx macrotis*) were used in the study. The phylogenetic relationship among members of Molossidae and Phyllostomidae family were speculated through data generated by the technique for each species. In Molossidae, the genus *Eumops* – specially *E. perotis* and *E. glaucinus* – formed a monophyletic clade. The taxon *E. bonariensis* presented incongruences, revealing its complexity. Members of *Molossus* genus formed a robust and consistent clade, supporting data of other studies on monophyly of species, however derived to all other taxa while *C. abrasus* and *C. planirostris* presented a basal position. The phylogenetic analysis of Phyllostomidae supports the hypothesis of monophyly between *A. lituratus* and *A. planirostris*, and indicates *C. perspicillata* as a related group. *Phyllostomus discolor* presented a basal position in relation to the other three taxa assessed. The genetic analysis of the 23 species from Molossidae,

Phyllostomidae, Vespertilionidae and Emballonuridae families generated a large number of fragments: 107 for RAG2 and 155 for 12/16S combined, respectively, in 139 and 402 haplotypes. The values detected for gene variation were low for both sequences (0,13 for RAG2 and 0,15 for 12/16S) and reflected their conservative feature, reinforced by high values of inter and intra-species Genetic Identity (74-100%). The species with a high gene divergence were variable in the analyses of RAG2 (*Eumops perotis*, *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata* and *Molossus rufus*), although one of them (*C. perspicillata*) also presented the highest intra-specific variation. Among the species and genera of the families, Molossidae had the highest variation due to the variation in *Eumops* and *Nyctinomops* species. The variability detected by this study to the different species is extremely important and can direct or subsidize studies with different purposes. The complexity of Chiroptera taxa observed in cytogenetic and morphologic analyses was also revealed by the RFLP technique, reinforcing the importance of this methodology in evolutive studies of the group.

Key-words: genetic variability, phylogenetics, PCR-RFLP, polymorphism, bats.