UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

MÁRIO PINZAN SCATENA

BIÓLOGO

Análise Molecular em Morcegos do Gênero *Artibeus* Leach, 1821 (Chiroptera, Phyllostomidae) a partir de Espécimes Depositados em Coleção Científica

Orientador: **Prof[a]. Dr[a]. Eliana Morielle Versute**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de mestre em Biologia Animal

-2006-

Scatena, Mário Pinzan.

Análise molecular em morcegos do gênero *Artibeus* Leach, 1821 (Chiroptera, Phyllostomidae) a partir de espécimes depositados em coleção científica / Mário Pinzan Scatena. - São José do Rio Preto : [s.n], 2006

60 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eliana Morielle-Versute

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Morcego. 2. Chiroptera. 3. *Artibeus*. 4. Filogenia molecular. 5. Formalina. I. Morielle-Versute, Eliana. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 599.4

DATA DA DEFESA: 12/04/2006

Banca Examinadora

TITULARES:

PROFA. DRA. ELIANA MORIELLE VERSUTE (ORIENTADORA)

PROFA. DRA. ELIANE CRISTINA VICENTE

PROF. DR. WAGNER ANDRÉ PEDRO

SUPLENTES:

PROF. DR. FERNANDO DE CAMARGO PASSOS

PROF. DR. FRANCISCO LANGEANI NETO

Este trabalho foi realizado no Departamento de Zoologia e Botânica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista, sob orientação da Profa. Dra. Eliana Morielle Versute, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (Fundunesp).

Dedico este trabalho, com amor e gratidão aos meus pais, Regina e Paulo, os maiores exemplos de caráter na minha vida.

O que você fizer será insignificante, mas é de maior importância que o faça.

Mahatma Gandhi, 1869-1948

AGRADECIMENTOS

Aqui demonstro minha sincera gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho:

- A Prof[a]. Dr[a]. Eliana Morielle Versute, pela orientação profissional, persistência e paciência;

- As Prof[as]. Dr[as]. Claúdia Márcia Aparecida Carareto, Maria Elisabete Jorge Amaral e Ana Elizabete Silva pela disponibilização de seus laboratórios;

- As doutorandas Paula Renata Lopes Moreira e Sandra Regina Marchesin por me ensinarem todas as técnicas utilizadas no projeto, pela ajuda na análise dos dados e pelos valiosos conselhos;

- Aos demais colegas do laboratório de Chiroptera: Karina, Maurício e Mateus pelo apoio e amizade;

- Aos funcionários do Departamento de Zoologia e Botânica, em especial o técnico Jorge pela disponibilidade e pelo pronto atendimento;

- Ao atendimento dos funcionários da seção de pós-graduação, sempre prontos a esclarecer dúvidas com grande paciência, em especial: Silvia e Rosana;

- A todos os funcionários da biblioteca, em especial à bibliotecária Maria Luisa, pela orientação na montagem da dissertação;

- A todos os profissionais e técnicos do Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, em especial a Vanessa Naomi pela excelência na qualidade do serviço prestado;

- Aos meus pais, Regina e Paulo, meus padrinhos, Piccina e Cláudio, minha irmã, Marina e a todos os demais familiares que viveram os dramas e alegrias desta etapa da minha vida;

- Aos irmãos e companheiros que passaram por minha vida nesses seis anos república, Xaropinho, Boi, Biel, Adriano, Peba, Nego, Gorgs, Darwin, Tonho, Nandão, Patrick e Nicolau;

- Aos amigos que trago desde a graduação, Necrose, Bituca, Daia, Ceará, Véião, Ralado, Tartaruga...

- Aos eternos irmãos Cabeça, Nani, ThiThi e Caião, pela amizade que nem a distância e nem o tempo conseguiram abalar.

ÍNDICE

RESUMO 09

ABSTRACT 10

1. INTRODUÇÃO 11

1.1. Panorama Geral da Ordem Chiroptera 11
1.2. A Família Phyllostomidae e o Gênero *Artibeus* 13
1.3. As Coleções Científicas 15
1.4. O Mecanismo de Ação da Formalina 16
1.5. Métodos de Estudos em Chiroptera 18
1.6. Objetivos 19
1.7. Referências Bibliográficas 20

2. RESULTADOS 24

APLICABILIDADE DA EXTRAÇÃO DE DNA DE ESPÉCIMES COLECIONADOS PARA ANÁLISES DE PCR E SEQUENCIAMENTO 25

ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS ESPÉCIES DE GRANDES *ARTIBEUS* LEACH, 1821 (CHIROPTERA PHYLLOSTOMIDAE) BASEADA EM SEQÜÊNCIAS DO GENE DO CITOCROMO B 45

3. CONCLUSÕES GERAIS 61

RESUMO

O presente trabalho analisou a viabilidade da extração de DNA de tecidos fixados em formalina e sua aplicabilidade em experimentos de PCR e sequenciamento. Um total de 123 amostras de tecidos de 54 espécimes depositados em coleção científica (DZBSJRP) foram utilizados para a extração de DNA. Os tecidos passaram por pré-tratamentos antes da extração de DNA em diferentes temperaturas e pHs, na tentativa de minimizar os efeitos da fixação sobre os ácidos nucléicos. Os resultados demonstraram que o tratamento em soluções neutras à 37^{o}C, por no mínimo quatro dias melhora a qualidade do DNA extraído e seu desempenho nas reações de amplificação e de sequenciamento. As seqüências geradas foram utilizadas em uma análise filogenética de parcimônia das espécies brasileiras de grandes *Artibeus*. Os alinhamentos das seqüências e as árvores produzidas apresentaram altos valores de "bootstrap" para a maioria dos clados, evidenciando que as seqüências obtidas de tecidos fixados também podem gerar dados confiáveis e que podem contribuir para o esclarecimento de aspectos evolutivos de muitos grupos animais que encontram-se bem representados em coleções científicas.

ABSTRACT

The present work analyzed the viability of the extraction of DNA of formalin fixed tissues and the applicability in PCR and sequencing experiments. A totality of 123 samples of tissues representing 54 specimens deposited in scientific collection (DZBSJRP) were used for the extraction of DNA. The tissues were exposed to different treatments before extraction of DNA involving different temperatures and pHs, in the attempt of minimizing the effects of the fixation on the nucleic acids. The results demonstrated that the treatment in neutral solutions at 37°C during at least four days improve the quality of extracted DNA and the conditions of amplification reactions and sequencing. The sequences obtained after amplifications were used in a phylogenetic analysis of parsimony involving Brazilian species of great *Artibeus*. The alignments of the sequences and the trees produced evidenced that the sequences of amplified of formalin-fixed tissue can also generate reliable data and than contribute to the explanation of evolutionary aspects of many animal groups that are archived in scientific collections.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Panorama Geral da Ordem Chiroptera

A ordem Chiroptera é representada pelos morcegos, um dos grupos de mamíferos eutérios mais bem sucedidos e os únicos capazes de realizar o vôo verdadeiro, devido ao aparecimento de especializações morfológicas únicas. Uma membrana alar formada por uma dupla camada de pele fina, estende-se de cada lado do corpo ligando os membros posteriores e anteriores, os quais apresentam falanges extremamente desenvolvidas com ossos muito alongados, exceto a primeira falange, em geral reduzida, criando uma superfície de suporte para as asas. Pode haver também uma membrana entre os membros posteriores, por vezes envolvendo a cauda. As pernas sofreram uma rotação de forma que a patela é dirigida para trás, e a musculatura peitoral, usada durante o vôo está inserida no esterno comumente em forma de quilha (EISENBERG & REDFORD 1999).

A habilidade de voar, aliada a endotermia, a ecolocação e hábitos noturnos capacitaram esses animais a explorarem uma grande variedade de nichos ecológicos, levando ao desenvolvimento de muitas especializações morfológicas e hábitos alimentares como resposta às adaptações a estes nichos.

Os morcegos são encontrados em todos os continentes, exceto a Antártica, exibindo sua maior riqueza e abundância de espécies nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Atualmente a ordem apresenta cerca de 980 espécies agrupadas em 192 gêneros, 18 famílias e duas subordens, Microchiroptera e Megachiroptera (NOWAK 1999). As famílias Pteropodidae, Rhinopomatidae, Nycteridae, Megadermatidae, Rhinolophidae, Hipposideridae, Craseonycteridae, Mystacinidae e Myzopodidae ocorrem apenas no Velho Mundo, enquanto Thyropteridae, Natalidae, Furipteridae, Mormoopidae, Phyllostomidae e Noctilionidae estão restritas ao Novo Mundo. As famílias restantes, Emballonuridae, Molossidae e Vespertiliondae são mundialmente distribuídas (EISENBERG & REDFORD 1999).

Os megaquirópteros apresentam porte relativamente grande podendo atingir até 1,70m de envergadura e 2Kg de massa corpórea, sendo

denominados popularmente de raposas voadoras. A primeira e segunda falange apresentam uma unha cada, as orelhas são pequenas com trago pouco desenvolvidos ou ausente. A ecolocação é pouco desenvolvida nesses animais, sendo a visão o principal meio de orientação. O grupo contém apenas a família Pteropodidae, com 42 gêneros e 162 espécies (KOOPMAN 1984). Alimentam-se de partes florais e frutos (fitofagia) em vôos crepusculares e noturnos.

Os microquirópteros geralmente exibem um porte menor, variando de pouco até 200g e de 0,10 a 1,0 cm de envergadura (*Vampyrum spectrum*), a segunda falange não possui garra, as orelhas são complexas, podendo apresentar trago e antitrago. A subordem engloba as outras 17 famílias das quais nove ocorrem no Brasil, com cerca de 140 espécies (AGUIAR & TADDEI 1995).

O grupo tem um registro fóssil pobre, devido principalmente ao pequeno porte da maioria das espécies, a delicadeza de seu esqueleto e acapacidade de voar. Os morcegos mais antigos conhecidos datam do final do Eoceno na América do Norte e Europa (HAND 1990). Estes fósseis indicam que os morcegos já tinham desenvolvido completamente o vôo, portanto os primeiros ancestrais do grupo apresentavam pré-adaptações para o vôo ainda desconhecidas ou que não podem ser identificadas na análise dos fósseis.

Devido à variedade de hábitos alimentares, os morcegos desempenham funções ecológicas importantes. Os insetívoros compreendem o maior número de espécies e desempenham um importante papel no controle de populações de insetos. Os frugívoros contribuem com a dispersão de sementes eliminando-as em suas fezes e os nectarívoros com a polinização de flores carregando partículas de pólen que ficam aderidas em seus corpos durante a alimentação (HODGKINSON *et al.* 2003). Existem apenas três espécies de morcegos hematófagos: *Desmodus rotundus*, *Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*. Estes alimentam-se principalmente de sangue de aves e mamíferos e contribuem para o controle de populações de vertebrados herbívoros em áreas naturais (MAYEN 2003).

A origem e as relações evolutivas da ordem Chiroptera ainda são muito controversas. Classicamente Chiroptera é considerado um grupo monofilético alocado na superordem Archonta, juntamente com Primates, Dermoptera e

Scandentia (GREGORY 1910). Contudo, PETTIGREW (1986) desafiou esta visão tradicional propondo que os megaquirópteros são mais relacionados aos primatas do que aos microquirópteros, sugerindo que o grupo é na verdade difilético. NIKAIDO *et al.* (2000) baseado em dados moleculares, sugeriu que Chiroptera é mais relacionado com Fereuungulata (Carnívora + Perissodactyla + Certatiodactyla) do que com Archonta e VAN DEN BUSSCHE *et al.* (2004) encontraram indícios que reforçam esta hipótese.

As relações entre as diferentes famílias de morcegos são também motivo de muito debate. Estudos filogenéticos sugerem que Emballonuridae representa o grupo mais basal dentro da subordem Microchiroptera (SMITH, 1976, SIMMONS, 1998) e, estudos morfológicos sustentam a hipótese de que foram os emballonurídeos os primeiros a chegarem ao Novo Mundo e por isso têm sido considerados os possíveis ancestrais das famílias que ocorrem somente no Novo Mundo. Quatro grupos monofiléticos foram propostos na filogenia de SMITH (1976): Emballonuroidea (Emballonuridae + Rhinopomatidae + Craseonycteridae), Rhinolophoidea (Nycteridae + Megadermatidae + Rhinolophidae + Hipposideridae), Noctilionoidea (Noctilionidae + Mormoopidae + Phyllostomidae) e Vespertilionoidea (Mystacinidae + Molossidae + Myzopodidae + Thyropteridae + Furipteridae + Natalidae + Vespertilionidae). Esta hipótese foi questionada por vários trabalhos subseqüentes (VAN VALEN 1979, PIERSON 1986, NOVACEK 1991, SIMMONS 1998) e até o momento não há um consenso entre pesquisadores a respeito desta problemática.

1.2. A Família Phyllostomidae e o Gênero *Artibeus*

A família Phyllostomidae constitui um grupo diverso, com aproximadamente 148 espécies agrupadas em 48 gêneros (NOWAK 1999). Este grupo caracteriza-se morfologicamente pela presença de um apêndice nasal em forma de ponta de lança (exceto nos desmodontíneos, que se apresenta em forma de ferradura), denominado de folha nasal. Os filostomídeos utilizam uma grande variedade de recursos alimentares, como néctar, pólen, frutos, partes florais, insetos, peixes, anfíbios, pequenos mamíferos, inclusive morcegos e sangue. Dentre os frugívoros, as espécies do gênero *Artibeus* Leach, 1821, incluída na subfamília Stenodermatinae, destacam-se em muitas

áreas em que ocorrem pela sua intensa participação na dispersão de sementes dos gêneros *Ficus*, que é um recurso-chave para muitas outras espécies de mamíferos (LOPEZ & VAUGHAN 2004), e *Cecropia*, uma espécie pioneira importante no processo de sucessão ecológica e na recuperação de ambientes degradados. (LOBOVA *et al.* 2003)

Artibeus apresenta uma ampla distribuição, ocorrendo desde o México até o norte da Argentina e sul do Brasil (KOOPMAN 1982). Atualmente são conhecidas 21 espécies na região neotropical (KOOPMAN 1982; DAVIS 1984; OWEN 1987), das quais nove ocorrem no Brasil: *Artibeus anderseni* Osgood, 1916, *A. gnomus* Thomas, 1893, *A. cinereus* (Gervais 1856), *A. concolor* Peters 1865, *A. fimbriatus* Gray, 1838, *A. jamaicensis* Leach, 1821, *A. lituratus* (Olfers, 1818), *A. obscurus* Schinz, 1821 e *A. planirostris* (Spix, 1823) (HANDLEY 1987, AGUIAR & TADDEI 1995). Dessas nove espécies, três ocorrem na maior parte do território brasileiro, *A. jamaicensis*, *A. lituratus* e *A. planirostris*. *Artibeus anderseni* é encontrado no oeste e *A. concolor* na região norte do Brasil. *Artibeus cinereus*, *A. gnomus* e *A. obscurus* são encontrados na Amazônia, atingindo o norte do Mato Grosso e parte da região leste do país. *Artibeus fimbriatus* distribui-se na região leste do país, da Bahia a Santa Catarina e já foi encontrada no Rio Grande do Sul (RUI *et al*. 1999). Uma décima espécie, *A. amplus* Handley, 1987, descrita para a Colômbia e Venezuela pode ocorrer em áreas adjacentes do Brasil.

A sistemática das espécies do gênero *Artibeus*, baseada principalmente em dados morfométricos e morfológicos, ainda é motivo de muita controvérsia devido, muitas vezes, a falta de informações sobre a variação e a distribuição geográfica das espécies. Em suas análises filogenéticas da subfamília Stenodermatinae, OWEN (1987; 1988; 1991) dividiu o gênero em quatro subgêneros, *Dermanura*, *Enchisthenes* e *Koopmania* representando as espécies pequenas, e *Artibeu*s as grandes. A restrição de *Artibeus* para incluir apenas as maiores formas, assim como o reconhecimento de *Dermanura*, *Enchisthenes e Koopmania* foi questionado posteriormente por LIM (1993) e, KOOPMAN (1993), os tratou em nível subgenérico.

Há também muita discussão em nível específico. Um problema abordado constantemente nos trabalhos sistemáticos do gênero está relacionado com o nível taxonômico de *A. planirostris*, que já foi considerada

uma subespécie de *A. jamaicensis* (HANDLEY 1987) e uma espécie distinta desta (OWEN 1987; KOOPMAN 1993). As espécies *A. fimbriatus* e *A. lituratus* são espécies morfologicamente convergentes em vários aspectos e foram confundidas durante muito tempo em suas áreas de ocorrência. HANDLEY (1989) redescreveu *A. fimbriatus* diferenciando-a das demais espécies e forneceu informações sobre sua distribuição geográfica.

Apesar dos numerosos esforços empregados na resolução dos problemas taxonômicos do gênero *Artibeus*, a problemática persiste principalmente em relação à caracterização e variação geográfica das espécies brasileiras (TADDEI *et al.* 1998).

Em vista da importância dos morcegos e da complexidade taxonômica, muitos estudos, nas mais variadas áreas das ciências biológicas, têm sido realizados na tentativa de se compreender a biologia e esclarecer melhor as relações evolutivas desses animais. Apesar da grande quantidade de dados produzidos, que podem ser interpretados filogeneticamente, há deficiência de filogenias robustas e bem resolvidas.

1.3. As Coleções Científicas

O estudo da biodiversidade compreende o reconhecimento das espécies de seres vivos que habitam uma dada região, sua descrição e classificação, incluindo também o estudo dos ecossistemas e das populações que os compõem. Esse estudo pode ser desenvolvido, através da pesquisa ecológica, visando o conhecimento das causas imediatas dos fenômenos observados. Por outro lado o estudo da origem evolutiva, suas causas e processos também contribuem de forma significativa para o conhecimento nesse campo. As coleções situadas em museus de história natural e institutos de pesquisa de todo o mundo representam um registro permanente da herança natural, sendo essencial ao estudo da biodiversidade.

As coleções zoológicas têm como função principal reunir ordenadamente e armazenar os espécimes de animais mortos ou parte destes espécimes, devidamente preservados para estudo (MARTINS 1994). As informações contidas nas coleções são indispensáveis para o desenvolvimento dos mais variados setores como a agricultura, gestão ambiental, pesquisa científica,

educação e formação de profissionais, auxiliando no desenvolvimento econômico, social e tecnológico.

Mais recentemente, com o advento da revolução nas metodologias de pesquisa na área da biologia molecular as coleções científicas passaram a representar bancos genéticos, onde pode ser armazenadas amostras de material biológico.

O material zoológico pode ser preservado de duas formas: a seco, para peles, ossos, conchas, e exoesqueletos, ou em meio líquido, para vertebrados menores (peixes, anfíbios, répteis e morcegos) e para a maioria dos invertebrados (MARTINS 1994). Neste último caso a imersão do espécime em álcool 70% garante a preservação para animais de porte diminuto. Os demais vertebrados devem receber uma injeção de fixador antes da imersão em álcool (MARTINS 1994).

As primeiras coleções científicas brasileiras surgiram ainda no século XIX: a do Museu Nacional do Rio de Janeiro, a do Museu Paraense Emílio Goeldi e a do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Hoje essas três instituições abrigam o maior e mais representativo acervo da biodiversidade no país. No século seguinte, paralelamente a esses grandes centros diversos outros institutos constituíram coleções regionais que passaram a formar uma rede de informação de proporções ainda mal estimadas (ZAHER & YOUNG 2003), exceto para o estado de São Paulo devido aos esforços de pesquisadores e o incentivo do Programa Biota, criado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A coleção de quirópteros do Departamento de Zoologia e Botânica da UNESP de São José do Rio Preto abriga hoje cerca de 9600 exemplares de morcegos, sendo dois holótipos e seis parátipos. A coleção representa bem a variação e riqueza da fauna brasileira, e já serviu de referência para muitas pesquisas na área da taxonomia, sistemática, ecologia e genética.

1.4. O Mecanismo de Ação da Formalina

Para evitar a destruição dos tecidos por autólise ou por microrganismos os espécimes e/ou tecidos animais colecionados devem passar por um processo denominado de fixação, que consiste no tratamento dos tecidos, o

mais rápido possível com substâncias químicas ou, menos frequentemente, por métodos físicos. Na fixação química os tecidos são geralmente imersos em soluções de agentes desnaturantes ou que estabilizam as moléculas formando pontes com moléculas vizinhas (ABRAHAMSOHN 2004).

O fixador mais utilizado para espécimes colecionados e cortes histológicos é a formalina (formaldeído 10%). O processo de fixação é essencial para estudos histológicos e citológicos, pois preservam, até certo ponto, a estrutura e a composição celular de forma semelhante as que tinham no tecido ou órgão vivo. Contudo, a ação dos fixadores, como o formaldeído, provoca a degradação de moléculas orgânicas, como proteínas e ácidos nucléicos, comprometendo a utilização desses materiais em ensaios imunohistoquímicos e estudos moleculares.

MCGHEE & VON HIPPEL (1977 a,b) determinaram as etapas envolvidas na reação química que ocorrem entre as moléculas de formaldeído e ácidos nucléicos, demonstrando que são similares àquelas observadas entre o formaldeído e proteínas. Segundo esses autores, inicialmente os grupos amino das bases nitrogenadas sofrem uma adição de um grupo hidroximetil (-CH_2OH), formando lentamente um complexo metileno (-CH_2-) estável. A adenina aparentemente é a base mais crítica na ligação cruzada com o formaldeído, pois é rica em grupos amino e, de fato, MASUDA *et al.* (1999) observaram que a taxa da adição de grupos hidroximetil é maior nesta base. À semelhança da reação formalina-proteína, a taxa de modificação do DNA induzida pela formalina aparentemente é dependente dos valores de temperatura e pH, e sob certas condições são reversíveis (SHI *et al.* 2001). Baseado nesta premissa SHI *et al.* (2002) demonstraram que a extração de DNA de tecidos fixados e embebidos é melhorada quando secções desses tecidos são aquecidas a altas temperaturas (120^oC) em soluções-tampão com valores altos de pH (11-12).

O aperfeiçoamento da extração de ácidos nucléicos de tecidos fixados em formalina é indispensável aos estudos moleculares para a obtenção das informações contidas nesses tecidos. Muitos trabalhos sugeriram técnicas para reverter ou minimizar os efeitos da formalina sobre os ácidos nucléicos (SHIBATA 1994, SIBONY *et al.* 1995, FAULKNER & LEIGH 1998, SHI *et al.* 2002 E SHI *et al.* 2004). Entretanto, estes trabalhos se aplicavam à tecidos preservados em

blocos de parafina e, até o momento, não há grandes esforços no sentido de desenvolver técnicas para a recuperação de ácidos nucléicos em tecidos preservados em álcool, como os preservados em meio líquido na maioria das coleções de pesquisa.

1.5. Métodos de Estudo em Chiroptera

Conforme pode ser depreendido de vários estudos em Chiroptera, as análises clássicas que utilizaram exclusivamente caracteres morfológicos e morfométricos mostraram-se limitadas para resolver alguns dos problemas sistemáticos. Em vista disso muitos autores começaram a empregar outras abordagens em suas análises, como técnicas imunológicas, citogenéticas e moleculares. Destas abordagens as que vêm se destacando mais, são as técnicas moleculares, pois estão fornecendo informações que têm contribuído para esclarecer vários problemas da sistemática de muitos grupos de mamíferos, inclusive de morcegos.

Uma técnica molecular bastante utilizada atualmente é o sequenciamento do DNA mitocondrial e nuclear, após o isolamento e amplificação de seqüências inteiras, parte delas, ou de todo o DNA, através de clonagem ou da técnica da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores adequados para cada situação. O sequenciamento das amostras amplificadas ou clonadas, por meio de seqüenciadores automáticos, permite a rápida caracterização da seqüência de interesse, disponibilizando as informações, por exemplo, para estudos comparativos.

A utilização de genes seqüenciados, como caracteres em estudos sistemáticos envolvendo quirópteros, tem contribuído para propor novas hipóteses sobre as relações evolutivas das altas categorias taxonômicas de mamíferos (PUMO *et al.* 1998; NIKAIDO *et al.* 2000, NIKAIDO *et al.* 2001, VAN DEN BUSSCHE & HOOFER 2004), para a construção de filogenias robustas de famílias de morcegos (BAKER *et al.* 2000), para testar hipóteses biogeográficas e propor modelos evolutivos (PUMO *et al.* 1996).

1.6. Objetivos

A aplicação de técnicas moleculares em material colecionado representa uma revolução no estudo genético e pode fornecer caracteres que auxiliem no esclarecimento de questões sistemáticas e biogeográficas de espécies ou grupos taxonômicos bem representados em coleções, e para os quais as informações podem dar embasamento para inferências evolutivas mais consistentes. Nesse sentido os objetivos do presente trabalho foram:

- Estabelecer uma técnica para obtenção de DNA de qualidade a partir tecidos de animais depositados em coleções científicas;

- Utilizar essas amostras de DNA para gerar marcadores moleculares por meio do sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares;

- Aplicar os marcadores moleculares em uma análise sistemática e biogeográfica das espécies de morcegos do gênero *Artibeus* que ocorrem em território brasileiro.

1.7. Referências Bibliográficas

ABRAHAMSOHN, P. A. 2004. Histologia e seus métodos de estudo, p.1-22. *In:* Junqueira L. C. & Carneiro J., (Eds.). **Histologia Básica**, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 488p.

AGUIAR, M. S. & V. A. TADDEI. 1995. A newsletter of the neotropical section of the IUCN/SSC Chiroptera specialist group. **Chiroptera Neotropical**, Belo Horizonte, **1** (2): 24

BAKER, R. J., C. A. PORTER, J. C. PATTON, R. A. VAN DEN BUSSCHE. 2000. Systematics of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. **Occasional Papers, Museum of Texas Tech University**. Lubbock, **202**:1-16

DAVIS, W. B. 1984. Review of the large fruit-eating bats of the *Artibeus "lituratus"* complex (Chiroptera: Phyllostomidae) in Middle America. **Occasional Papers, Museum of Texas Tech University**. Lubbock, **93**: 1-16.

EISENBERG, J. F. & K. H. REDFORD. 1999. **Mammals of the Neotropics, The Central Neotropics.** Chicago, The University of Chicago Press, Vol. 3, 609p.

FAULKNER, S. W. & D. A. LEIGH. 1998. Universal amplification of DNA isolated from small regions of paraffin-embedded, formalin-fixed tissue. **BioTechnics**. Natick, **24**: 47-50.

GREGORY, W. K. 1910. The order of mammals. **Bulletin of American Museum of Natural History.** Nova Iorque, **27**: 1-524.

HAND, S. J. First Tertiary molossid (Microchiroptera: Molossidae) from Australia: Its phylogenetic and biogeografic implications. 1990. **Memoirs of the Queensland Museum**. Queensland, 28:175-192.

HANDLEY, C. O. 1987. New species of mammals from Northern South America: fruit-eating bats, genus *Artibeus* Leach. **Fieldiana: Zoology**. Chicago, **39**: 163-172.

———. 1989. The *Artibeus* of Gray 1838, p. 443-468. *In:* K. H. Redford & J. F. Einsenberg (Eds.). **Advances in Neotropical Mammalogy.** Gainsville, The Sandhill Crane Press, 614p.

HODGKISON R, S. T. BALDING, A. ZUBALD, T. H. KUNZ. 2003. Fruit bats (Chiroptera: Pteropodidae) as seed dispersers and pollinators in a lowland Malaysian rain forest. **Biotropica**, Lawrence, 35 (4): 491-502.

KOOPMAN, K. F. 1982. Biogeography of the bats of South America, p.273-302. *In*: M. A. Mares & H. H. Genaways (Eds.). **Mammalian Biology in South America.** Special Publication Series Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh. Vol. 6, 539p.

———. 1984. A synopsis of the families of bats. **Bat Research News**. Bloomington, **25**: 25:29.

———. 1993. Order Chiroptera, p. 137-241. *In:* D. E. Wilson & D. M. Reeder (Eds.). **Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference.** Smithsonian Institution Press, Washington DC.

LIM, K. B. 1993. Cladistic rappraisal of neotropical Stenodermatinae bat phylogeny. **Cladistics**. Nova Iorque, **9**: 147-165.

LOBOVA, T.A., S. A. MORI, F. BLANCHARD, PECKHAM H., P. CHARLES-DOMINIQUE. 2003. *Cecropia* as a food resource for bats in French Guiana and the significance of fruit structure in seed dispersal and longevity. **American Journal of Botany**. Columbus, 90(3): 388-403.

LOPEZ, L. E. & C. VAUGHAN. 2004. Observations on the role of frugivorous bats as seed dispersers in Costa Rican secondary humid forests. **Acta Chiropterologica**. Varsóvia, 6(1): 111-119.

MACGHEE, J. D. & P. H. VON HIPPEL. 1977a. Formaldehyde as a probe of DNA structure. 3. Equilibrium denaturation of DNA and synthetic polynucleotides. **Biochemistry.** Washington, **16**: 3276-3293.

———. 1977b. Formaldehyde as a probe of DNA structure. 4. Mechanism of the initial reaction of formaldehyde with DNA. **Biochesmistry.** Washington, **16**: 3267-3275.

MARTINS, U. R. 1994. A coleção taxonômica, p.19-44. *In* Papavero N., (Ed.). **Fundamentos básicos de Taxonomia Zoológica**. São Paulo, Editora UNESP, 285p.

MASUDA, N., T. OHNISHI, S. KAWAMOTO, M. MONDEN, K. OKUBO. 1999. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. **Nucleic Acids Research**. Oxford, **27**: 4436-4443.

MAYEN, F. 2003. Haematophagous bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. **Journal of Veterinary Medicine series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**. Berlin, 50 (10): 469-472.

NIKAIDO, M., M. HARADA, Y. CAO, M. HASEGAWA, N. OKADA. 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, ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). **Journal of Molecular Evolution**. Nova Iorque, **51**: 318-328.

NIKAIDO, M., K. KAWAI, Y. CAO, M. HARADA, S. TOMITA, N. OKADA, M. HASEGAWA. 2001. Maximum likelihood analysis of the complete mitochondrial genomes of eutherians and a reevaluation of the phylogeny of bats and insectivores. **Journal of Molecular Evolution.** Nova Iorque, **53**: 508-516.

NOVACEK, M. J. 1991. Aspects of morphology of the cochlea in microchiropteran bats: an investigation of character transformation. **Bulletin American Museum of Natural History**. Nova Iorque, **206**: 84-100.

NOWAK, R. M. 1999. **Walker's Mammals of the World.** Baltimore, Johns Hopkins University, Vol. 1, 836p.

OWEN, R. D. 1987. Phylogenetic analyses of the bat subfamily Stenodermatinae (Mammalia: Chiroptera). **Special Publications, The Museum, Texas Tech University**. Lubbock, **26**: 1-65.

———. 1988. Phenetic analysis of the bat subfamily Stenodermatinae (Chiroptera: Phyllostomidae). **Journal of Mammalogy**. Provo. 69 (4): 795-810.

———. 1991. The systematic status of *Dermanura concolor* (Peters, 1965) (Chiroptera: Phyllostomidae), with description of a new genus. Contributions to Mammalogy in Honor of Karl F. Koopman. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. Nova Iorque. **206**: 1-432.

PETTIGREW J. D. 1986. Flying primates? Megabats have the advanced pathway from eye to midbrain. **Science.** Washington, **231** (4743):1304-1306.

PIERSON, E. D. 1986. **Molecular systematics of the Microchiroptera: higher taxon relationships and biogeography**. Ph.D. dissertation, University of California, Berkeley.

PUMO, D. E., I. KIM, J. REMSEN, C. J. PHILLIPS, H. H. GENOWAYS. 1996. Molecular systematics of the fruit bat, *Artibeus jamaicensis*: origin of na unusual island population. **Journal of Mammalogy**. Provo, **77** (2): 491-503.

PUMO, D. E., P. S. FINAMORE, W.R. FRANEK, C. J. PHILLIPS, S. TARZANI, D.BALZANARO. 1998. Complete mitocondrial genome of a neotropical fruit bat, *Artibeus jamaicensis*, and a new hypothesis of the relationships of bats to other euterian mammals. **Journal of Molecular Evolution**. Nova Iorque, **47**: 709-717.

RUI, A. M., M. E. FÁBIAN, J. O. MENEGHETI. 1999. Distribuição geográfica e análise morfológica de *Artibeus lituratus* Olfers e de *Artibeus fimbriatus* Gray (Chiroptera, Phyllostomidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. Curitiba, **16** (2): 447-460.

SHI, S. R., M. E. KEY, K. L. KALRA. 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissues sections. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. Seattle, **39**: 741-748.

SHI, S-R., R. J. COTE, C. R. TAYLOR. 2001. Antigen retrieval techniques: Current perspectives. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. Seattle **49** (8): 931-937.

SHI, S-R., R. J. COTE, L. WU, C. LIU, R. DATAR, Y. SHI, D. LIU, H. LIM, C. R. TAYLOR. 2002. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections base on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. Seattle, **50** (8): 1005-1011.

SHI, S-R., R. DATAR, C. LIU, L. WU, Z. ZHANG, R. J. COTE, C. R. TAYLOR. 2004. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. **Histochemistry and Cell Biology**. Nova Iorque, **122**: 211-218.

SIMMONS, N. B. 1998. A reprasial of interfamilial relationships of bats. p.3-26. *In:* KUNZ, T. H. & P. A. RACEY (Eds), **Bats: Phylogeny, Morphology, Echolocation and Conservation Biology.** Smithsonian Institution Press, London, 365p.

SHIBATA, D. 1994. Extraction of DNA from paraffin-embedded tissue for analysis by polymerase chain reaction: new tricks from an old friend. **Human Pathology**. Rochester, **25**: 561-563.

SIBONY, M., F. COMMO, P. CALLARD, J-M GASC. 1995. Methods in laboratory investigation - Enhancement of mRNA in situ hybridization signal by microwave heating. **Laboratory Investigation**. Baltimore, **73** (4): 586-591.

SMITH, J.D. Chiropteran evolution. 1976. **Special Publications, The Museum, Texas Tech University**. Austin, **10**: 49-69.

TADDEI, V. A., E. MORIELLE-VERSUTE, C. A. NOBILE. 1998. Distribuição geográfica e análise morfológica comparativa em *Artibeus obscurus* (Schinz, 1821) e *Artibeus fimbriatus* Gray, 1838 (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae). **Ensaios e Ciência**, Campo Grande, **2** (2): 71-127.

VAN DEN BUSSCHE, R. A. & S. R. HOOFER. 2004. Phylogenetic relationships among recent chiropteran families and the importance of choosing appropriate out-group taxa. **Journal of Mammalogy**. Provo, **85** (2): 321-330.

VAN VALEN, T. A. 1979. The evolution of bats. **Evolutionary Theory**. **4**: 104-121.

ZAHER, H. & P. S. YOUNG. 2003. As coleções zoológicas brasileiras: panorama e desafios. **Ciência e Cultura**, Campinas, **55** (3): 24-26.

2. RESULTADOS

Os resultados obtidos nas diferentes etapas do estudo estão apresentados a seguir em dois trabalhos. O primeiro descreve a padronização de uma metodologia para a obtenção de DNA de qualidade a partir de tecidos fixados em formalina e analisa sua aplicabilidade em reações de amplificação e sequenciamento. O segundo apresenta uma análise filogenética molecular dos morcegos do gênero *Artibeus* que ocorrem em território brasileiro.

APLICABILIDADE DA EXTRAÇÃO DE DNA DE ESPÉCIMES COLECIONADOS PARA ANÁLISES DE PCR E SEQUENCIAMENTO

MÁRIO PINZAN SCATENA[1], ELIANA MORIELLE VERSUTE[2]

[1] Mestrando do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da UNESP – Universidade Estudual Paulista – Campus de São José do Rio Preto.

[2] Departamento de Zoologia e Botânica – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP - Universidade Estudual Paulista – Campus de São José do Rio Preto.

Palavras-chave: coleções científicas, formalina, extração de DNA, PCR, sequenciamento.

RESUMO

As coleções científicas, pela quantidade de informação que preservam, são fundamentais aos estudos taxonômicos e sistemáticos dos mais variados grupos de animais. Para preservar as características morfológicas e histológicas dos órgãos e tecidos, os espécimes colecionados passam por um processo de fixação, geralmente em formalina. Contudo, a fixação provoca a degradação do DNA, comprometendo a utilização desses tecidos em estudos moleculares. A variação e a dificuldade na identificação de muitos *taxa* têm estimulado vários pesquisadores a implementarem novas abordagens que auxiliem na melhor caracterização desses grupos, revelando os relacionamentos evolutivos e os processos pelos quais eles ocorreram. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi estabelecer uma técnica de extração de DNA de tecidos colecionados, minimizando a ação da fixação e, avaliar o desempenho das amostras de DNA extraídas de tecidos fixados em análises de "PCR" e sequenciamento. Os resultados obtidos sugerem que um pré-tratamento dos tecidos em solução-tampão de pH neutro e temperaturas em torno de 37^{o}C por ao menos quatro dias, melhora a qualidade e o rendimento do DNA extraído, assim como a qualidade dos produtos das reações de amplificação e sequenciamento. Porém, a comparação entre o desempenho do DNA obtido de tecidos fixados e tecidos frescos mostrou que, apesar de ambas gerarem seqüências confiáveis para a aplicação em análises filogenéticas, as amostras de DNA de tecido fixado apresentaram uma taxa de erro maior nas diferentes etapas do estudo.

ABSTRACT

The scientific collections are fundamental to the taxonomic and systematic studies for the amount of information that they keep. To preserve the morphologic and histological features of the tissues, the collected specimens are exposed to a fixation process, usually in formalin. However, the fixation induces degradation of DNA, committing the use of those tissues in molecular studies. The variation and difficulty in the identification of many *taxa* have stimulated many researchers, in implement new approaches that aid in the best characterization of those groups, revealing the evolutionary relationships. This way, the present work aimed to establish a technique of extraction of DNA of collected tissues, minimizing the action of the fixation and to evaluate the acting of the samples of extracted DNA of fixed tissues in of PCR and sequencing analysis. The results suggest that the treatment of the tissues in tamponed solutions of neutral pH and temperatures around 37º for at least four days improves the quality and the income of extracted DNA, as well as the quality of the products of the amplification reactions and sequencing. However, the comparison among the performance of DNA obtained from fixed and fresh tissues showed that in spite of both generate reliable sequences for the application in phylogenetic analyses, the samples of DNA of fixed tissues presented a larger rate of errors in the different stages of the study.

INTRODUÇÃO

A descrição dos mais variados *taxa* e a identificação dos espécimes animais fundamentam-se principalmente na análise comparativa de seus atributos. Destes, os caracteres morfológicos são frequentemente os mais utilizados, encontrando-se preservados e bem representados nas coleções de pesquisa espalhadas por instituições e museus de todo o mundo (MARTINS 1994).

Grande parte dos espécimes de vertebrados depositados em coleções de pesquisa estão preservados em meio líquido, imersos em álcool 70%. Exceto para animais muito pequenos, como peixes e pererecas menores, os espécimes devem passar por um processo de fixação antes da imersão em álcool, sendo que o fixador mais comumente utilizado é a formalina (formaldeído 10%).

A aplicação da formalina tem como principal função insolubilizar as proteínas dos tecidos com a finalidade de evitar a destruição das células por autólise, ou por bactérias, além de estabilizar a estrutura celular (ABRAHAMSOHN 2004). Porém, sua ação sobre as moléculas de ácidos nucléicos é prejudicial, provocando a degradação e comprometendo a utilização de tecidos fixados em experimentos bioquímicos e moleculares (MCGHEE & VON HIPPEL 1977 a,b).

Há aproximadamente 20 anos começaram a aparecer trabalhos que apresentavam protocolos de extração de ácidos nucléicos de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (GOELZ *et al.* 1985, DUBEAU *et al.* 1986). Mas, somente na década de 90 apareceram as primeiras publicações que apresentavam técnicas para reverter ou minimizar os efeitos da formalina sobre as moléculas de ácidos nucléicos (SHIBATA 1994, SIBONY *et al.* 1995, FAULKNER & LEIGH 1998). Entretanto, estas se aplicavam quase que exclusivamente a área da patologia médica e, até o momento, não há na literatura especializada, trabalhos que aplicam técnicas de recuperação de ácidos nucléicos em áreas relacionadas à genética e evolução animal.

Um dos trabalhos pioneiros na área, foi o de SHI *et al.* (1991) que adaptaram um método imunohistoquímico de recuperação de antígenos (proteínas), o qual consiste no simples aquecimento em água de secções de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina, promovendo assim o

aumento do sinal imunohistoquímico desses tecidos, minimizando, em parte, os efeitos deletérios da fixação. Mais recentemente, SHI *et al.* (2002) testaram a eficiência da extração de DNA de tecidos fixados e embebidos, aplicando o princípio da técnica de recuperação de antígenos (AR). Os autores partiram da hipótese de que pode haver analogia entre a recuperação de proteínas para técnicas imunohistoquímicas e a extração de ácidos nucléicos de tecidos fixados e emblocados. Os resultados desse trabalho demonstraram que o aquecimento das secções de tecidos em altas temperaturas e pHs alcalinos aumentam significativamente a quantidade e qualidade do DNA extraído, melhorando o desempenho destas amostras em experimentos de PCR.

Este trabalho teve o objetivo de estabelecer uma técnica para a extração de DNA de qualidade de tecidos fixados em formalina, e testar o desempenho desses produtos na amplificação e sequenciamento de diferentes fragmentos de genes nucleares e mitocondriais.

MATERIAL E MÉTODO

1. Tecidos

As amostras de tecidos consistiram em fragmentos com cerca de 5 mm^3, retirados após incisão abdominal. Foram utilizadas, no presente trabalho, 123 amostras de fígado e músculo obtidas de 54 espécimes pertencentes a cinco espécies de morcegos do gênero *Artibeus* depositados na Coleção de Chiroptera do Departamento de Zoologia e Botânica da UNESP/*Campus* de São José do Rio Preto (DZSJRP). Os exemplares colecionados foram previamente fixados em formalina por aproximadamente 24 horas e conservados em álcool 70%, sendo o tempo médio de conservação na coleção, de 20 anos. Quatro amostras de tecidos frescos congelados a -20^oC (C1, C2, C3 e C4), obtidas de dois espécimes de *A. planirostris* e *A. lituratus*, foram utilizadas como grupo controle. A **Tabela 1** mostra o número de amostras e o tipo de tecido utilizado para cada espécie.

Tabela 1: Número de espécimes e amostras, e tipos de tecidos utilizados para cada espécie (M = músculo; F = fígado).

Espécies	Espécimes	Amostras	Tecidos
A. obscurus	15	52	27M/25F
A. jamaicensis	7	14	7M/7F
A. planirostris	6	6	4M/2F
	2 (controle)	2	1M/1F
A. fimbriatus	17	39	18M/21F
A. lituratus	9	12	6M/6F
	2 (controle)	2	1M/1F
Total	58	127	---

2. Pré-tratamento

O pré-tratamento consistiu na reidratação do tecido em solução salina seguida da lavagem dos fragmentos em duas soluções tampão em diferentes pHs e temperaturas por um período de tempo variável de 20 minutos a sete dias.

Após serem recortados várias vezes, os fragmentos foram colocados em tubo estéril contendo 1mL de solução salina de Hanks onde permaneceram por 24 horas a temperatura ambiente (TA). Decorrido este tempo as amostras foram submetidas a cinco tratamentos diferentes antes da extração de DNA.

Nos tratamentos 1, 2 e 3 os fragmentos de tecidos foram retirados do Hanks e mantidos em solução tampão Tris-EDTA (TE: 10mM Tris/1mM EDTA - pH 8,0) por um, quatro e sete dias respectivamente. Nos tratamentos 2 e 3 o TE foi trocado em intervalos de 48 horas para evitar que o acúmulo de álcool e formalina alterassem o pH da solução. Nos tratamentos 4 e 5 as amostras foram mantidas em solução tampão glicina-NaOH (GN: Glicina 0,2M/NaOH 0,2M – pH 10,6) por 20 minutos e uma hora respectivamente.

Nos tratamentos 1, 2, 3 e 5 as amostras foram mantidas a 37^{o}C e, no tratamento 4, a temperatura aplicada foi de 80^{o}C. As amostras utilizadas como controle não sofreram nenhum tipo de pré-tratamento, pois não passaram pelo processo de fixação em formalina.

3. Extração de DNA

Após a centrifugação da suspensão com os fragmentos a 3000 rpm e da retirada do sobrenadante, foram adicionados ao tubo 300 µL de tampão de extração (10mM Tris/1mM EDTA/100 mM NaCl), 30 µL de SDS 20% e 15 µL de proteinase K (4 mg/mL). A digestão enzimática ocorreu em banho-maria a 56^{o}C por oito horas aproximadamente e, uma hora antes do fim da digestão, 1 µL de RNAse (10 µg/mL) foi acrescentado a cada amostra. Ao término da digestão adicionou-se ½ volume de acetato de potássio 5M ao tubo, que foi agitado vigorosamente, seguido de 2,5 volumes de etanol absoluto gelado para precipitar o DNA, que após seco, foi dissolvido em TE (100 a 200 µL) e armazenado a -20^{o}C.

Os produtos das extrações foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e 0,15 µg/mL de brometo de etídeo, corrido a 100V, por 40 minutos em tampão TAE 1x (4,84g Tris/1,14 mL ácido acético glacial/0,5M EDTA - pH 8,0). Após a corrida o gel foi visualizado em luz UV e fotografado com uma máquina "Polaroid GelCam" (Ultra-Lum).

4. Amplificação do DNA ("PCR – Polimerase Chain Reaction")

As amostras que tiveram a presença de DNA comprovada pela análise em gel de agarose foram utilizadas para a amplificação de seqüências gênicas com cinco pares de oligonucleotídeos iniciadores ("primers"), que amplificam fragmentos variando de 460 a 1500pb, fabricados pela "Invitrogen Brasil Ltda" (**Tabela 2**).

O par de iniciador RAG2-1/2 (LEWIS-ORITT 2001) foi desenhado para amplificar o gene nuclear Rag 2 ("recombinant activiting gene 2"). O par 12S-1/2 (MORALES 1993) foi desenhado para amplificar parte do gene codificador da subunidade menor (12S) e parte da maior (16S) do ribossomo mitocondrial, e o par 12S-3/4 (KOCHER 1989) foi desenhado para amplificar parte da subunidade menor (12S) desta mesma organela. Os pares de iniciadores Bat 05/04 e Bat 17/14 (MARTINS 2003) foram desenhados para amplificar, respectivamente, a porção inicial e terminal do gene mitocondrial codificador do citocromo b.

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400" utilizando os seguintes componentes, em um volume final de 15 µL: 4,0 µL de DNA genômico, 200 µM

de cada dNTP, 0,75 ρmol de cada iniciador, 3,0 mM de $MgCl_2$, 7,5 ηg de BSA, 1,5 unidade de Taq polimerase em tampão 1X. As reações específicas para os diferentes iniciadores estão demonstradas na **Tabela 3**.

Foram utilizadas três diferentes tipos de enzimas polimerase durante o trabalho. A princípio as reações foram realizadas com a enzima "Taq Polimerase TaqGen" (Biosystems). Outras duas enzimas foram testadas na tentativa de melhorar o desempenho das reações, a "Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity" (Invitrogen) e, posteriormente, a "Platinum Taq DNA Polymerase" (Invitrogen). Estas enzimas são termo-estáveis, ou seja, apresentam reatividade apenas quando aquecidas a altas temperaturas, o que minimiza a formação de dímeros de iniciadores e de fragmentos inespecíficos. Os segmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose e fotografados como descrito no item anterior.

Tabela 2: Código e seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, e o tamanho esperado dos fragmentos amplificados.

Primers	Seqüência (5'→ 3')	Tamanho amplificado
RAG2-1	ggctggcccaaragatcctg	1470pb
RAG2-2	graaggatttcttggcaggagt	1470pb
12S-1	aaaaagcttcaaactgggattagataccccactat	1500pb
12S-2	tgactgcagagggtgacgggcggtgtgt	1500pb
12S-3	tgggattagataccccactat	500pb
12S-4	tgattatgctacctttgcacggt	500pb
BAT-05A	cgactaatgacatgaaaaatcaccgttg	460pb
BAT-04A	gtagctcctcagaatgatatttgtcctc	460pb
BAT-17A	acctcctaggagacccagacaatt	460pb
BAT-14A	tattccctttgccggtttacaagacc	460pb

Tabela 3: Reações de amplificação para os cinco pares de primers.

Evento	N° de ciclos			Temperatura (°C)			Tempo		
	BAT	12S	RAG	BAT	12S	RAG	BAT	12S	RAG
Denaturação	1	1	1	94	95	94	90s	3m	2m
Denaturação	35	40	35	94	95	94	30s	50s	60s
Anelamento	35	40	35	50	50	60	45s	35s	45s
Extensão	35	40	35	72	72	72	70s	2m	90s
Extensão	1	1	1	72	72	72	10m	30s	4m

5. Purificação, Quantificação e Seqüenciamento dos Segmentos

Os produtos da amplificação foram enviados ao Serviço de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, onde foram purificados utilizando o "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (Amershan), quantificados com o "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen) e seqüenciados utilizando o sequenciador MegaBACE 1000.

As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase II DNA polimerase) e os mesmos oligonucleotídeos das reações de amplificação.

6. Análise das Seqüências

O programa "Sequence Analyser" foi utilizado para gerar os eletroferogramas. As seqüências foram manipuladas no programa "BioEdit Sequence Alignment Editor" (HALL 1999) e os alinhamentos realizados pelos programas "Clustal W 1.81" (THOMPSON *et al.* 1994) e "Blast 2 Sequences". (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi). A qualidade das seqüências foi determinada pela a analise dos eletroferogramas e dos alinhamentos.

RESULTADOS

1. Extração de DNA

A **Tabela 4** apresenta o número de amostras utilizadas em cada tratamento, bem como o número e a freqüência de amostras nas quais as extrações foram bem sucedidas, ou seja, apresentaram uma banda de DNA genômico de alto peso molecular.

Os melhores resultados em relação à qualidade e quantidade do DNA extraído foram alcançados quando os tecidos foram submetidos ao tratamento 3, em que as amostras permaneceram por sete dias em TE. Neste caso em 49 (90%) das 54 amostras o DNA foi extraído com sucesso dos tecidos, como ilustra a **Figura 1A** (amostras 1, 7 e 8). As amostras submetidas ao Tratamento 2 também apresentaram resultados satisfatórios, porém com uma freqüência de sucesso de 60%. Nas amostras submetidas ao Tratamento 1 a banda de

DNA genômico só apareceu em 18% delas e para a maioria das amostras o DNA estava em uma concentração muito baixa e acompanhado de material degradado, observado na forma de um arrasto no gel de agarose (**Figura 1A,** amostras 2, 4 e 6). As amostras mantidas em tampão GN (tratamentos 4 e 5) produziram DNA altamente degradado, especialmente aquelas submetidas à alta temperatura do Tratamento 4.

Tabela 4: Discriminação por espécie do número de amostras utilizadas em cada tratamento e a freqüência de amostras extraídas com sucesso.

Tratamentos / Espécies	1 1 Dia (TE)	2 4 Dias (TE)	3 7 Dias (TE)	4 20 min (GN)	5 1hora (GN)	Total
A. obscurus	10	5	20	15	2	52
A. jamaicensis	---	---	10	2	2	14
A. planirostris	---	---	4	1	1	6
A. fimbriatus	10	5	12	8	4	39
A. lituratus	2	---	8	1	1	12
Total	22	10	54	27	10	123*
Freqüência	4 (18%)	6 (60%)	49 (90%)	2 (7%)	0 (0%)	61 (49%)

*as amostras controle não estão computadas nos totais, pois não sofreram pré-tratamento.

2. Produtos da PCR

As 61 amostras em que a extração de DNA foi satisfatória foram utilizadas em diferentes reações de amplificação, combinando-se os cinco diferentes pares de iniciadores e os três tipos de enzimas polimerase, na tentativa de estabelecer as melhores condições de amplificação.

A comparação do desempenho das diferentes enzimas utilizadas mostrou que as reações com as enzimas “Taq Polimerase TaqGen” e “Platinum Taq Polimerase” geraram produtos apenas com o fragmento de interesse amplificado. Porém, os melhores resultados em relação à quantidade e grau de pureza do amplificado foram obtidos com a “Platinum Taq Polimerase” (**Figura 1B**). A “Platinum Taq Polimerase High Fidelity” gerou além do fragmento de interesse, outros inespecíficos, não apresentando a eficiência esperada. Em vista do melhor desempenho da “Platinum Taq Polimerase” nas reações de amplificação, a comparação entre a qualidade do produto dos cinco pares de iniciadores baseou-se nas amplificações com esta enzima.

Inicialmente as reações foram realizadas com os iniciadores que amplificavam os maiores fragmentos de DNA. O iniciador 12S-1/2 (1500pb) gerou o fragmento de interesse apenas em 18 (38%) das 47 amostras testadas. Já os iniciadores RAG2-1/2 (1470pb) amplificaram com sucesso apenas sete (20%) amostras de 35 testadas. Nestes dois últimos casos a maioria dos amplificados apresentou apenas material degradado (**Figura 1C)**.

Os iniciadores desenhados para amplificar os menores fragmentos, 12S-3/4 (500pb), Bat 05/04 (460pb) e Bat17/14 (460pb), foram os que mostraram melhores resultados, pois geraram um único produto de PCR em 44 (72%) das 61 amostras de DNA utilizadas na amplificação. Embora a banda esperada estivesse presente, ela veio acompanhada, na maioria das amostras, de contaminantes, observados na forma de arrasto (DNA degradado, RNA e proteínas residuais) ou bandas de baixo peso molecular (dímeros de iniciadores), como demonstrado na **Figura 1D**.

Em todas as reações foram utilizadas amostras controle (DNA de tecido fresco) que serviram de parâmetro para a verificação das condições das reações de amplificação e da qualidade dos amplificados. Os controles (C1, C2, C3 e C4) sempre geraram amplificados representativos e com pouco arrasto, exceto quando amplificadas com a “Platinum Taq Polimerase High Fidelity”. Neste caso os produtos do “PCR” apresentaram, geralmente, mais de um fragmento amplificado.

A concentração e o grau de pureza do amplificado são os fatores mais críticos para o sucesso da reação de sequenciamento. Embora 69 amostras tenham sido amplificadas, apenas 31 (45%) atingiram a concentração mínima necessária (20ηg/μL) exigida pelo serviço de sequenciamento, para o sucesso do processo.

3. Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas nas 27 melhores amostras, 19 do grupo-teste (material fixado) e mais oito do grupo-controle (material fresco), selecionadas pela análise da quantidade de DNA amplificado. No serviço de sequenciamento elas foram purificadas e seqüenciadas. A **Figura 1E** mostra o perfil dos amplificados antes e depois da purificação.

O sequenciamento foi realizado nos dois sentidos da fita de DNA, portanto, cada amostra de amplificado forneceu duas seqüências para a reação. As 27 amostras enviadas geraram 54 seqüências, das quais 36 (20 testes e 16 controles) representaram seqüências consideradas confiáveis pela análise dos eletroferogramas e dos alinhamentos porém, a quantidade de "gaps" (intervalos) e bases inespecíficas, ou seja que não podem ser lidas pelo seqüenciador, é maior nas seqüências obtidas de tecido fixado. A **Figura 2** ilustra o alinhamento de 95 sítios nucletídicos realizado para 20 seqüências do gene do citocromo b, evidenciando 14 sítios variáveis em branco e 81 conservados marcados. As outras 18 seqüências não apresentaram o tamanho esperado e o grau de identidade dos alinhamentos foi muito baixo.

DISCUSSÃO

A obtenção de dados que auxiliem na reconstrução da história evolutiva dos seres vivos tem guiado nas últimas décadas muitos pesquisadores no desenvolvimento de novas técnicas e na utilização de novas abordagens para gerar caracteres que se apliquem a análise filogenética. As coleções de pesquisa devido à quantidade de informações que preservam representam uma ferramenta essencial para o estudo da taxonomia e sistemática dos mais variados grupos de animais. Porém, o principal tipo de informação preservada nas coleções são os dados anatômico-morfológicos, limitando sua utilização em estudos bioquímicos, citogenéticos e moleculares.

Recentemente muitas publicações têm demonstrado a viabilidade da extração de ácidos nucléicos de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (COOMBS *et al*. 1999; MASUDA *et al*. 1999; SHI *et al.* 2002 e SHI *et al.* 2004). Entretanto, a grande maioria das coleções de pesquisa na área da zoologia não utiliza o processo de embebição, apenas a fixação em formalina, para a preservação de seus espécimes. Dentre os métodos sugeridos nesses trabalhos destaca-se o aquecimento dos tecidos a altas temperaturas em soluções alcalinas. SHI *et al.* (2002) argumentaram que este tipo de tratamento provavelmente atue sobre os tecidos desnaturando e hidrolisando as proteínas,

resultando na ruptura das membranas celulares e provocando a quebra das ligações cruzadas formadas pela ação da formalina.

A aplicação desse princípio nos tecidos colecionados não mostrou grande eficiência. Aparentemente a combinação de altas temperaturas e pH alcalinos provoca um aumento na degradação do DNA extraído desses tecidos. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a melhor metodologia para minimizar os efeitos inibidores da formalina sobre o DNA é tratar os tecidos fixados em soluções de pH neutro (7,0 a 8,0), no mínimo por quatro dias em temperaturas mais baixas (37^{o}C). Este contraste deve-se, provavelmente, a presença do processo de embebição nas amostras utilizadas naqueles trabalhos, onde a parafina deve atuar como uma barreira adicional à ação da temperatura e do pH alcalino sobre os tecidos e moléculas.

Os resultados apresentados aqui sugerem que o fator mais importante para melhorar a qualidade do DNA extraído é o tempo de encubação na solução tampão. Porém, as condições de fixação/preservação, assim como o tempo de preservação dos espécimes em diferentes coleções podem influenciar o processo de extração do DNA. Nesse sentido, recomenda-se que uma bateria de testes-piloto seja realizada para estabelecer o tratamento mais adequado para cada tipo de material ou espécime utilizado.

A quantificação do DNA extraído, geralmente avaliada por espectrofotometria, não foi realizada neste estudo, pois o fator que aparentemente mais influencia a amplificação das seqüências por PCR é a qualidade do DNA extraído dos tecidos fixados (SHI *et al.* 2002), que pode ser avaliada diretamente pela qualidade do amplificado, como sugerido por BAREA *et al.* (2004). Entretanto, o grau de pureza não é o único fator a influenciar a amplificação. Os melhores resultados foram obtidos quando os fragmentos menores (460 a 500pb) foram amplificados com a “Platinum Taq Polimerase”, indicando que a qualidade do produto da reação de amplificação esta ligada, não apenas a qualidade do DNA extraído, mas também a eficiência da enzima polimerase e ao tamanho do fragmento amplificado. Entretanto, uma enzima mais eficiente necessariamente não melhora a qualidade do amplificado, como observado com a “Platinum Taq Polimerase High Fidelity”. Possivelmente melhores resultados podem ainda ser obtidos, alterando-se alguns parâmetros da reação como a concentração dos componentes da reação (MEUNIER &

GRIMONT 1993, DAVIN-REGLI *et al.* 1995, HALLDÉN *et al.* 1996) e o número de ciclos da reação de amplificação (SHIBATA *et al.* 1994).

As 19 amostras do grupo-teste enviadas para o sequenciamento foram amplificadas com o mesmo e mais de um iniciador em duas situações diferentes, uma na reação de "PCR" e outra na reação de sequenciamento. O mesmo ocorreu para as amostras de DNA utilizadas em várias reações de amplificação com diferentes iniciadores, gerando, em grande parte, os fragmentos esperados. Esses resultados evidenciam que há reprodutibilidade na amplificação das amostras obtidas de tecidos fixados.

A viabilidade das seqüências geradas neste trabalho esta ligada principalmente a qualidade do amplificado obtido por PCR, que por sua vez é determinada pela concentração e grau de pureza. Os resultados obtidos mostram que uma vez estabelecidos os parâmetros ideais para a reação de amplificação e após a purificação, o sequenciamento pode gerar produtos confiáveis para a aplicação em análises filogenéticas, muito embora eles possam vir acompanhados de alguns erros quando comparados às seqüências obtidas de tecidos frescos.

Embora seja necessário determinar com mais precisão os fatores e as condições que envolvem a recuperação de ácidos nucléicos de tecidos fixados em formalina, os resultados obtidos criam um panorama otimista em relação à utilização deste tipo de material em estudos moleculares. O aproveitamento das informações contidas nas coleções de pesquisa para gerar dados moleculares pode auxiliar no esclarecimento de aspectos evolutivos e biogeográficos de grupos problemáticos, principalmente aqueles que são difíceis de se coletar ou estão ameaçados de extinção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, P. A. 2004. Histologia e seus métodos de estudo. In Junqueira L. C. & Carneiro J., eds. **Histologia Básica.** Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1-22.

BAREA, J. A., M. I. M. C. PARDINI, T. GUSHIKEN. 2004. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para a utilização em reação de

polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, **26** (4): 274-281.

COOMBS, N. J., A. C. GOUGH, J. N. PRIMROSE. 1999. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. **Nucleic Acids Research**. Oxford. **27** (16): e12.

DAVIN-REGLI, A., Y. ABED, R. N. CHARREL, C. BOLLET, P. DE MICO. 1995. Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. **Research in Microbiology**, Paris, **146** (7): 561-568.

DUBEAU, L., L. A. CHANDLER, J. R. GRALOW, P. W. NICHOLS, P. A. JONES. 1986. Southern Bloting Analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. **Cancer Research**, Filadélfia, **46**: 2964-2969.

FAULKNER, S. W. & D. LEIGH. 1998. Universal amplification of DNA isolated from small regions of paraffin-embedded, formalin-fixed tissue. **BioTechnics**. Natick. **24**: 47-50.

GOELZ, S. E.; S. R. HAMILTON; B. VOGELSTEIN. 1985 Purification of DNA from formaldehyde-fixed and paraffin-embedded tissue. **Biochemical And Biophysical Research Communications**. São Diego, **130** (1): 118-126.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. Oxford. **41**: 95-98.

HALLDÉN, C., M. HANSEN, N. O. NILSSON, A. HJERDIN, T. SÄLL. 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**. Nova Iorque, **93**: 1185-1192.

KOCHER, T. D. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals - amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciencies of the United States of America**. Washington. **86**: 6196 – 6200.

LEWIS-ORITT, N., C. A. PORTER, R. J. BAKER. 2001 Molecular systematics of the family Mormoopidae (Chiroptera) based on cytochrome B and recombination activating gene 2 sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. São Diego, **20**: 426-436.

MARTINS, U. R. 1994. A coleção taxonômica. In Papavero N., ed. **Fundamentos básicos de Taxonomia Zoológica**. São Paulo, Editora UNESP, 19-44.

MARTINS, F. 2003. **Filogeografia intraespecífica do morcego hematófago. *Desmodus rotundus*.(Chiroptera, Phyllostomidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 79p.

MASUDA, N., T. OHNISHI, S. KAWAMOTO, M. MONDEN, K. OKUBO. 1999. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. **Nucleic Acids Research**. Oxford. **27**: 4436-4443.

MACGHEE, J. D. & P. H. VON HIPPEL. 1977a. Formaldehyde as a probe of DNA structure. 3. Equilibrium denaturation of DNA and synthetic polynucleotides. **Biochesmistry.** Washington. **16**: 3276-3293.

———— 1977b. Formaldehyde as a probe of DNA structure. 4. Mechanism of the initial reaction of formaldehyde with DNA. **Biochesmistry.** Washington. **16**: 3267-3275.

MEUNIER, J. R. & P. A. D. GRIMONT. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Research in Microbiology**, Paris, **144**: 373-379.

MORALES, J. C.; PATTON, J. C.; BICKHAM, J. W. 1993 Partial Endonuclease Digestion Mapping of Restriction Sites Using PCR-amplified DNA. **PCR Methods and Aplications. 2**: 228-233.

SHI, S. R., M. E. KEY, K. L. KALRA. 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissues sections. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. Seattle, **39**: 741-748.

SHI, S-R., R. J. COTE, L. WU, C. LIU, R. DATAR, Y. SHI, D. LIU, H. LIM, C. R. TAYLOR. 2002. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections base on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. Seattle, **50** (8): 1005-1011.

SHI, S-R., R. DATAR, C. LIU, L. WU, Z. ZHANG, R. J. COTE, C. R. TAYLOR. 2004. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. **Histochemistry and Cell Biology**. Nova Iorque. **122**: 211-218.

SHIBATA, D. 1994. Extraction of DNA from paraffin-embedded tissue for analysis by polymerase chain reaction: new tricks from an old friend. **Human Pathology**. Rochester, **25**: 561-563.

SIBONY, M., F. COMMO, P. CALLARD, J-M GASC. 1995. Enhancement of mRNA in situ hybridization signal by microwave heating. **Laboratory Investigation**. Baltimore. **73** (4): 586-591.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensivity of progressive multiple sequence aligment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. Oxford. **22** (22): 4673-4680.

Figura 1: Imagem dos géis com produtos da extração de DNA, das reações de amplificação e da purificação, evidenciando os principais resultados obtidos nestas etapas. **A:** bandas de DNA genômico de amostra controle (C) e amostras testes submetidas ao tratamento 3 (colunas 1, 7 e 8) e tratamento 1 (colunas 2, 4 e 6). **B:** bandas com o fragmento de 460pb amplificados com "Taq polimerase TaqGen" (colunas 1 a 4) e "Platinum Taq polimerase" (colunas 5 a 8) evidenciando a concentração e o grau de pureza superior nas últimas quatro amostras.**C:** DNA degradado de seis amplificados (colunas 1 a 6) obtidos de amostras teste. **D:** bandas com os fragmentos de 500pb amplificados com "Platinum Taq Polimerase", evidenciando a presença de arrasto na porção inferior do gel. **E:** bandas com fragmentos de aproximadamente 500 e 460pb amplificados com "Platinum Taq Polimerase", antes (colunas 1 a 4 e 5 a 6 respectivamente) e após (colunas 9 a 16) a purificação. **L:** Ladder.

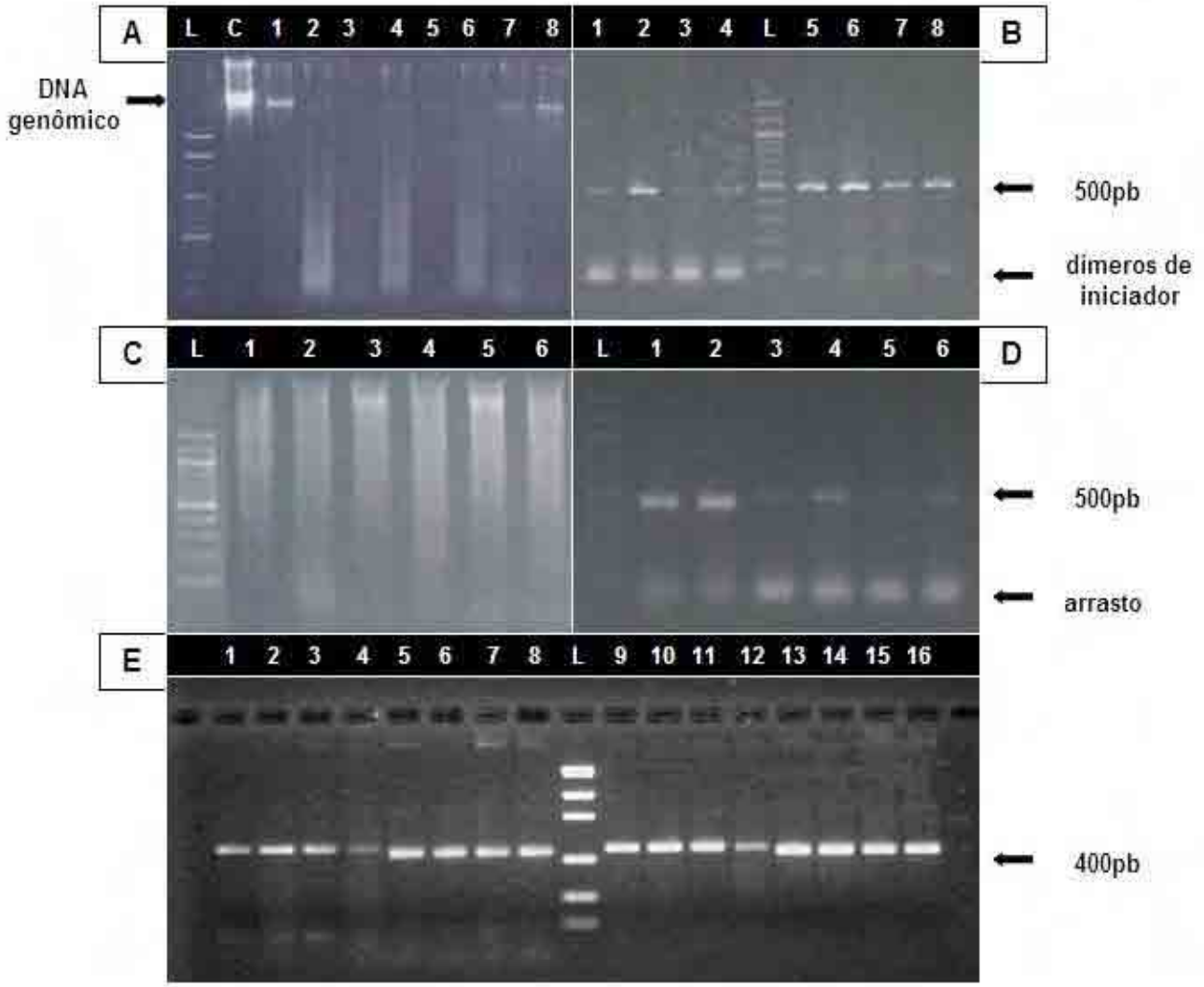
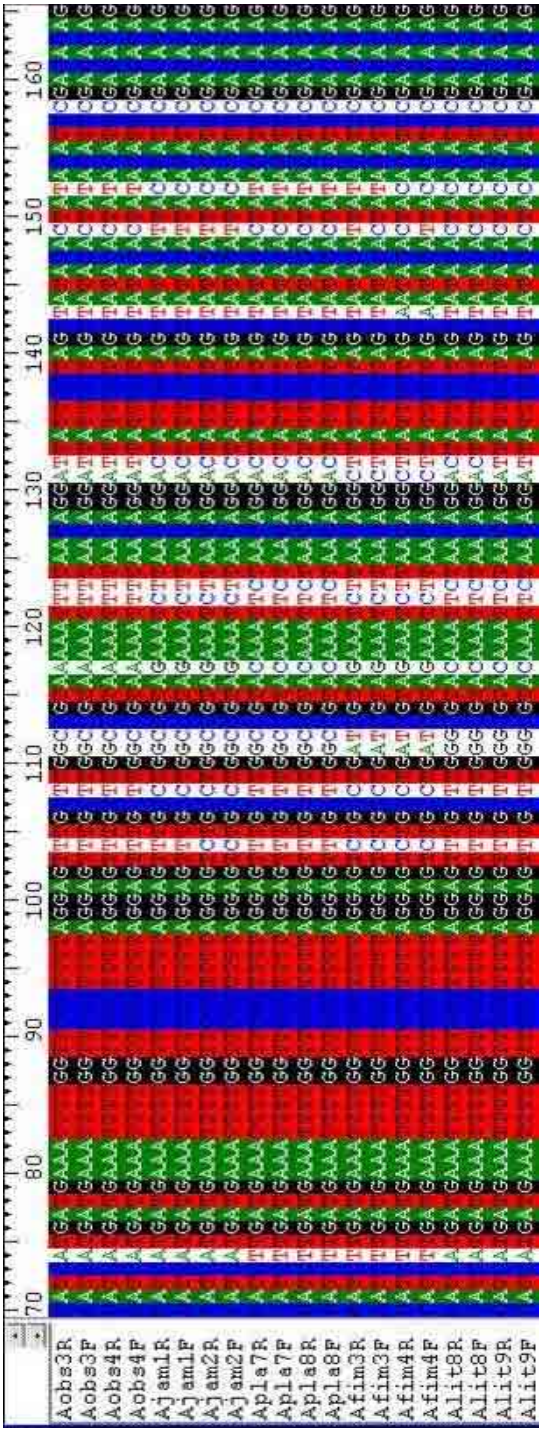

A
L C 1 2 3 4 5 6 7 8
DNA genômico
B
1 2 3 4 L 5 6 7 8
500pb
dímeros de iniciador
C
L 1 2 3 4 5 6
D
L 1 2 3 4 5 6
500pb
arrasto
E
1 2 3 4 5 6 7 8 L 9 10 11 12 13 14 15 16
400pb

Figura 2: Imagem do alinhamento de 95 nucleotídeos, para 20 seqüências de *Artibeus* realizado no programa "Clustal W 1.81" evidenciando os sítios conservados (coloridos) e os variáveis (em branco). Aobs=*A. obscurus*; Ajam=*A. jamaicensis*; Apla=*A. planirostris*; Afim=*A. fimbriatus*; Alit=*A. lituratus*; R=fita de DNA "reverse"; F=fita de DNA "forward"; A=adenina; T=timina; C=citosina e G=guanina.


70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
Aobs3R
Aobs3F
Aobs4R
Aobs4F
Ajam1R
Ajam1F
Ajam2R
Ajam2F
Apla7R
Apla7F
Apla8R
Apla8F
Afim3R
Afim3F
Afim4R
Afim4F
Alit8R
Alit8F
Alit9R
Alit9F

ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS ESPÉCIES DE GRANDES *ARTIBEUS* LEACH, 1821 (CHIROPTERA PHYLLOSTOMIDAE) BASEADA EM SEQÜÊNCIAS DO GENE DO CITOCROMO B

MÁRIO PINZAN SCATENA[1], ELIANA MORIELLE VERSUTE[2]

1. Mestrando do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da UNESP – Universidade Estudual Paulista – Campus de São José do Rio Preto.

2. Departamento de Zoologia e Botânica – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP - Universidade Estudual Paulista – Campus de São José do Rio Preto.

Palavras-chave: Phyllostomidae, *Artibeus*, filogenia molecular, citocromo b.

RESUMO

Este trabalho apresenta uma proposta filogenética baseada em seqüências do gene mitocondrial do citocromo b de seis espécies de grandes *Artibeus*, com o objetivo de caracterizar melhor as relações filogenéticas e a distribuição das espécies brasileiras. A topologia da árvore mais parcimoniosa incluiu clados consistentes formados por (*A. jamaicensis* + *A. fimbriatus*) e [*A. lituratus* + (*A. obscurus* + *A. planirostris* + *A. amplus*)]. As espécies também formaram grupos terminais apoiados por altos valores de "bootstrap", mas algumas relações inter-específicas permanecem inconclusivas. Os resultados mostraram também que *A. jamaicensis* e *A. planirostris* não formam um grupo monofilético, mas que *A. jamaicensis* ocorre em território brasileiro, provavelmente em simpatria com outras espécies do gênero, contradizendo uma proposta recente que limita a distribuição desta espécie ao noroeste da América do Sul.

ABSTRACT

The present study analysed the phylogenetic relationships of six species of great *Artibeus* recognize in Brasil using the cytochrome b mitochondrial gene. The topology of the maximum parsimony tree included a well supported clade formed for (*A. jamaicesis* + *A. fimbriatus*) and [*A. lituratus* + (*A. obscurus* + *A. planirostris + A. amplus*)]. The species also form terminal groups supported by high values of “bootstrap”, but inter-specific relationships of the clade (*A. obscurus* + *A. planirostris + A. amplus*) stay unresolved. The results also showed that *A. jamaicensis* and *A. planirostris* do not form a monophyletic group, but *A. jamaicensis* are incident in Brazilian territory, probably in sympatric relationship with other species of the group, contradicting a recent proposal that limited the distribution of this species to the northwest of South America.

INTRODUÇÃO

Os morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* apresentam uma ampla distribuição geográfica na região neotropical, ocorrendo desde o México até o norte da Argentina (KOOPMAN 1982; MARQUES-AGUIAR 1994). Atualmente são reconhecidas 10 espécies de grandes *Artibeus* (HANDLEY 1987, 1989, 1991; OWEN 1987; DAVIS 1984; MARQUES-AGUIAR 1994), das quais cinco foram registradas em território brasileiro, *A. obscurus* Schinz, 1821, *A. jamaicensis* Leach, 1821, *A. planirostris* (Spix, 1823), *A. fimbriatus* Gray, 1838 e *A. lituratus* (Olfers, 1818) (HANDLEY 1987, AGUIAR & TADDEI 1995), além de *A. amplus* Handley 1987, que foi inicialmente descrita para Venezuela e Colômbia, mas também pode ocorrer em áreas adjacentes do Brasil.

Apesar de ser um dos grupos mais estudados dentro da ordem Chiroptera, a taxonomia e sistemática do gênero, baseadas principalmente em dados morfológicos e morfométricos, ainda são muito controversas, devido, principalmente a falta de informações sobre a distribuição geográfica e a variação de alguns táxons. *Artibeus fimbriatus* e *A. lituratus* já foram confundidos em suas áreas de ocorrência devido à semelhança morfológica, mas HANDLEY (1989) redescreveu *A. fimbriatus* diferenciando-as. *Artibeus amplus* é um dos táxons menos conhecidos dentro do grupo e só foi considerada uma espécie válida na década de noventa (LIM & WILSON 1993), porém os limites geográficos e as relações filogenéticas desta espécie permanecem incertos. Provavelmente o caso mais debatido e confuso na literatura é o de *A. planirostris*, que já foi considerada uma subespécie de *A. jamaicensis* (HANDLEY 1987) e uma espécie distinta desta (LIM & WILSON 1993). Baseado em dados morfométricos, LIM (1997) propôs que *A. jamaicensis* e *A. planirostris* formam um grupo monofilético juntamente com *A. obscurus*, mas não fez nenhuma inferência sobre a relação deste clado com as demais espécies do gênero.

A aplicação das técnicas moleculares tem ajudado a elucidar aspectos biogeográficos e filogenéticos de muitos grupos de Chiroptera (GIANNINI & SIMMONS 2003; TELLING *et al.* 2005; DÁVALOS 2005), inclusive de *Artibeus* (VAN DEN BUSSCHE *et al.* 1998; LIM 2004; GUERRERO 2004), porém, certas questões

ainda persistem principalmente em relação à categoria taxonômica de *A. planirostris.*

LIM (1997) propôs que *A. jamaicensis* e *A. planirostris* sejam espécies alopátricas, geograficamente separadas pela região de savana do Llanos venezuelano que flanqueia o rio Orinoco, a primeira ocorrendo ao norte e a segunda ao sul deste rio. Mais recentemente, LIM *et al.* (2004) propuseram uma filogenia, baseada em seqüências do gene do citocromo b, que corroborou essa hipótese, e tratou *A. planirostris* e *A. jamaicensis* como um grupo parafilético. Porém, este trabalho utilizou dados de espécimes coletados na Venezuela, Bolívia e em áreas da região noroeste da Amazônia brasileira e, a falta de informações moleculares de áreas adjacentes como América Central e outras regiões do Brasil não permite extrapolar este padrão para toda a área de distribuição dessas espécies.

Em vista da problemática apresentada, o presente estudo teve o objetivo de gerar uma filogenia baseada em seqüências do gene mitocondrial do citocromo b, que auxilie no esclarecimento das relações evolutivas entre as espécies de *Artibeus* que ocorrem em território brasileiro.

MATERIAL E MÉTODO

1. Espécimes

Foram utilizadas para a extração de DNA, amostras de fígado ou músculo obtidas de 10 espécimes representativos de cinco espécies de *Artibeus* que ocorrem em território brasileiro, como demonstrado na **Tabela 1**. Os exemplares foram coletados em duas regiões distintas, nos estados do Amazonas e de São Paulo, e encontram-se depositados na Coleção de Chiroptera do Departamento de Zoologia e Botânica da UNESP/*Campus* de São José do Rio Preto. Os tecidos utilizados foram obtidos de espécimes colecionados previamente fixados em formol (DZSJRP) e do banco de tecidos da coleção (CFC), os quais encontram-se conservados, em álcool absoluto ou congelados a – 20 ^{o}C.

Tabela 1: Número de amostras e identificação dos haplótipos e das localidades para cada um dos espécimes utilizados no estudo, e seus respectivos números de registro na Coleção de Quirópteros.

Espécies	Nº Amostras	Haplótipo	Espécimes	Localidade
A. obscurus	2	Aobs3	DZSJRP 15349	Humaitá/AM
		Aobs4	DZSJRP 16176	Campinas/SP
A. jamaicensis	2	Ajam1	DZSJRP 13151	Humaitá/AM
		Ajam2	DZSJRP 13220	Humaitá/AM
A. planirostris	2	Apla7	CFC 701	São José do Rio Preto/SP
		Apla8	CFC 729	São José do Rio Preto/SP
A. fimbriatus	2	Afim3	DZSJRP 16167	Pariquera-açu/SP
		Afim4	DZSJRP 16184	Pariquera-açu/SP
A. lituratus	2	Alit8	CFC 595	Olímpia/SP
		Alit9	CFC 735	São José do Rio Preto/SP

2. Extração de DNA

A extração de DNA dos tecidos frescos e fixados procedeu-se como descrito nos itens 2 e 3 (Material e Método) do primeiro artigo.

3. Amplificação das Seqüências Gênicas

Um fragmento de aproximadamente 460pb de DNA mitocondrial, correspondente ao final do gene que transcreve o RNA transportador da glutamina e à porção inicial do gene do citocromo b, foi amplificado com os pares de oligonucleotídeos iniciadores, 5'-cgactaatgacatgaaaaatcaccgttg-3' e 5'-gtagctcctcagaatgatatttgtcctc-3', previamente descritos em MARTINS (2003).

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400" utilizando os seguintes componentes, em um volume final de 15 µL: 4,0 µL de DNA genômico, 200 µM de cada dNTP, 0,75 ρmol de cada iniciador, 3,0 mM de $MgCl_2$, 7,5 ηg de BSA, 1,5 unidade de "Platinum Taq Polimerase" em tampão 1X. A reação específica para o iniciador está demonstrada na **Tabela 2**.

Tabela 2: Reação de amplificação para o par de iniciador BAT 05/04.

Evento	Temperatura (°C)	Tempo	N° de Ciclos
Denaturação	94	90 seg	1
Denaturação Anelamento Extensão	94 50 72	30 seg 45 seg 70 seg	35
Extensão	72	10 min	1

4. Purificação, Quantificação e Sequenciamento dos Segmentos

Os produtos da amplificação foram enviados ao Serviço de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, onde foram purificados com o "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (Amershan), quantificados com "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen) e seqüenciados utilizando o sequenciador MegaBACE 1000.

As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase II DNA polimerase) e os mesmos oligonucleotídeos das reações de amplificação.

5. Análise das Seqüências

Os eletroferogramas foram gerados pelo programa "Sequence Analyser" utilizando o "Base Caller Cimarron 3.12", e as seqüências foram alinhadas nos programas "Clustal W 1.81" (THOMPSON *et al.*, 1994) e "blast 2 sequences" (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi). Os alinhamentos foram realizados com o pareamento das seqüências "forward" com o inverso das seqüências "reverse" de cada haplótipo. Com os alinhamentos gerados foram realizadas análises filogenéticas utilizando o método de máxima parcimônia, com o algoritmo "branch-and-bound", no programa PAUP v.4.0b10 (SWOFFORD 1997). A robustez dos ramos dos cladogramas foi testada por análise de "bootstrap" (BS) com 1000 réplicas. Os índices de distância genética foram calculados pelo método de Kimura 2-parâmetros (KIMURA 1980).

Para completar o grupo interno e compor o grupo externo seis seqüências do citocromo b, sendo quatro de *A. amplus* e duas de *A. concolor*, previamente depositadas no GenBank, foram incluídas na análise filogenética (**Tabela 3)**.

Tabela 3: Haplótipos das espécies incluídas na análise filogenética com o número de acesso no "GenBank" e a referência de cada seqüência, representada pelo nº de registro no museu onde o espécime encontra-se tombado ou a referência da publicação da mesma.

Espécies	Haplótipo	Nº GenBank	Referência
A. amplus	Aamp1	AY684756	ROM 107847
	Aamp2	AY684755	ROM 106761
A. concolor	Acon1	U66519	Van Den Bussche *et al*. 1998

RESULTADOS

Foram utilizados para a amplificação do gene do citocromo b dois espécimes de cada uma das cinco espécies de *Artibeus* utilizadas no estudo. O sequenciamento dos amplificados produziu duas seqüências de cada haplótipo que somadas às seqüências obtidas no GenBank, geraram um matriz de análise com 26 seqüências. Os produtos do sequenciamento apresentaram tamanhos variáveis de 410 a 490pb porém, a análise dos eletroferogramas mostrou que algumas regiões iniciais de 30 a 112pb, correspondentes ao fragmento do gene que transcreve o RNAt da glutamina, apresentavam alguns erros, como bases inespecíficas e "gaps" (intervalos), observados principalmente nas seqüências obtidas da amplificação do DNA de tecido fixado. A fim de garantir a homogeneidade na análise das seqüências, estas regiões foram excluídas, resultando fragmentos com 378 sítios nucleotídicos, dos quais 238 foram constantes e 140 foram parcimoniamente informativos, ou seja, compartilhados por dois ou mais táxons.

Na **Tabela 4** são apresentadas as distâncias genéticas, par a par, entre os 13 haplótipos obtidos neste trabalho, de acordo com o método de Kimura 2-parâmetros. A distância genética intra-específica variou de 0 a 4,1%, sendo a média de 2,0%. No conjunto dos haplótipos e espécies a média total das distâncias foi de 13,6%. As maiores distâncias intra-específicas foram encontradas para *A. obscurus* (3,8%), *A. jamaicensis* (4,1%) e *A. lituratus* (4,1%). As distâncias inter-específicas variaram de 4,7%, entre *A. planirotris* e *A. amplus*, a 23,3%, sendo que as maiores distâncias encontradas no grupo

interno foram observadas entre *A. jamaicensis/A. lituratus* (23,3%) e *A. jamaicensis/A. planirostris* (22,5%). Os mesmos resultados foram observados nas análises realizadas no programa "blast 2 sequences" que fornece a porcentagem de similaridade de nucleotídeos entre duas seqüências. As médias de similaridade intra-específicas e inter-específicas neste programa foram respectivamente de 97% e 88%. *A. jamaicensis/A. lituratus*, *A. jamaicensis/A. planirostris* e *A. jamaicensis/A. lituratus* apresentaram um valor de similaridade de aproximadamente 85% porém, o par A*. amplus/A. fimbriatus* também apresentou similaridade baixa (84%).

A análise de máxima parcimônia forneceu três árvores igualmente parcimoniosas com 221 passos, índice de consistência 0,7466 e índice de retenção 0,9083. As relações filogenéticas entre os diferentes táxons foram consistentes nas três árvores geradas, como ilustrado em uma das árvores representada na **Figura 1**. Topologias alternativas envolvendo rearranjos ocorreram apenas no clado formado por *A. obscurus/A. planirostris/A. amplus*, que não apresentou um suporte muito consistente (BS=56). *Artibeus lituratus* foi alocado como grupo-irmão de *A. obscurus/A. planirostris/A. amplus*, formando um clado monofilético robusto (BS=84). O outro grupo formado por *A. jamaicensis* e *A. fimbriatus* formaram um clado bastante consistente (BS=100). Os grupos formados por *A. lituratus*+(*A. obscurus+A. planirostris+A. amplus)* e *A. jamaicensis+A. fimbriatus*, por sua vez, também formaram um clado monofilético muito robusto (BS=100). Os táxons terminais formaram clados com altos valores de suporte (BS=95 a 100), exceto para *A. fimbriatus* (BS=77 e 80). A mesma situação foi observada no clado que agrupa as quatro seqüências de *A. planirostris* (BS=72).

Tabela 4: Distâncias genéticas (em %), estimada pelo método Kimura-2 parâmetros, para a variação do gene do citocromo b em espécies de *Artibeus* brasileiras. A seqüência de números na linha corresponde a seqüência dos haplótipos na coluna. Acon=*A. concolor*; Aobs=*A. obscurus*; Ajam=*A. jamaicensis*; Apla=*A. planirostris*; Afim=*A. fimbriatus*; Alit=*A. lituratus*; Aamp=*A. amplus*; R=fita de DNA "reverse"; F=fita de DNA "forward".

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**
1 Acon1	-												
2 Aobs3	16,5	-											
3 Aobs4	17,4	3,8	-										
4 Ajam1	25,5	19,1	21,2	-									
5 Ajam2	26,2	20,8	23,0	4,1	-								
6 Apla7	14,8	5,8	8,7	18,3	20,7	-							
7 Apla8	13,9	6,7	9,0	19,3	22,2	3,3	-						
8 Alit8	15,5	10,0	11,8	20,7	23,3	6,7	7,3	-					
9 Alit9	14,2	8,1	10,0	19,0	21,4	6,7	5,8	4,1	-				
10 Aamp1	14,9	7,9	9,7	18,7	21,5	5,8	4,7	8,5	7,0	-			
11 Aamp2	14,9	7,9	9,7	18,7	20,7	5,8	4,7	8,5	7,0	1,6	-		
12 Afim3	22,1	18,7	20,7	16,5	13,9	17,3	17,0	20,4	17,3	18,0	17,3	-	
13 Afim4	22,1	19,0	21,1	16,9	14,2	16,9	16,6	19,3	16,2	18,0	17,3	1,9	-

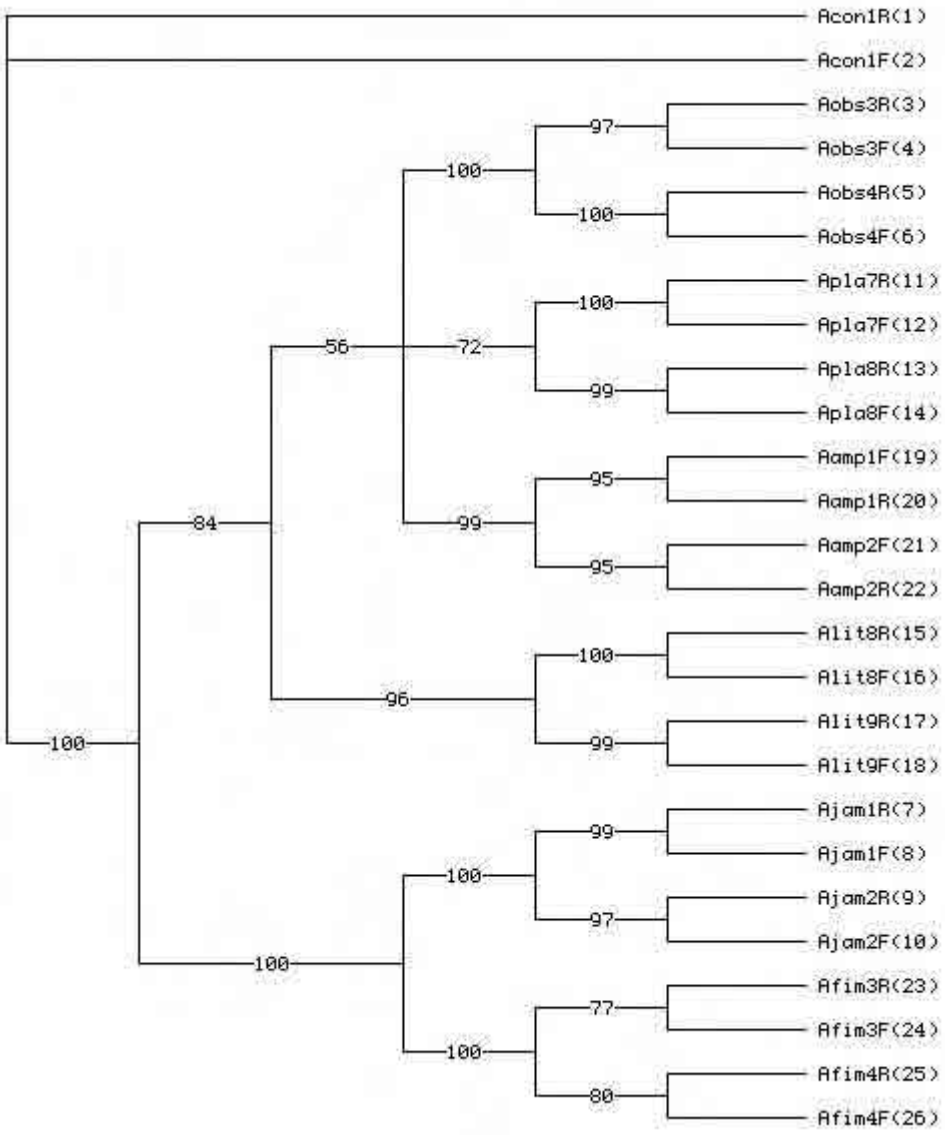


Figura 1: Relações filogenéticas entre as espécies brasileiras de grandes *Artibeus* ilustradas por uma das três árvores igualmente parcimoniosas, baseada na variação de 378 sítios de nucleotídeos do gene do citocromo b. As porcentagens de "bootstrap" estão representadas sobre os ramos. Acon=*A. concolor*; Aobs=*A. obscurus*; Apla=*A. planirostris*; Aamp=*A. amplus*; Alit=*A. lituratus*; Ajam=*A. jamaicensis*; Afim=*A. fimbriatus*; R=fita de DNA "reverse"; F=fita de DNA "forward".

DISCUSSÃO

As relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Artibeus* propostas no presente trabalho são consistentes e corroboram em parte as propostas de VAN DEN BUSSCHE *et al.* (1998) e LIM *et al.* (2004), muito embora não incluiu todos os táxons analisados nestes trabalhos. Na árvore apresentada por VAN DEN BUSSCHE *et al.* (1998) há um clado monofilético formado por *A. planirostris* e *A. jamaicensis*, com *A. obscurus* como grupo-irmão. Esta topologia foi questionada por LIM *et al.* (1998) que propuseram uma relação parafilética entre *A. jamaicensis* e *A. planirostris*, e um grupo monofilético formado por *A. obscurus*, *A. planirostris* e A. *amplus*. Os resultados aqui obtidos também sugerem estes dois arranjos, porém os dois trabalhos falharam na tentativa de propor uma relação consistente entre estas três espécies. A relação filogenética de *A. litutatus* pode ser inferida com mais segurança, pois este aparece nas três filogenias como grupo-irmão do clado (*A. jamaicensis* + *A. planirostris* + *A. obscurus*). A parafilia de *A. jamaicensis* é apoiada também pela relação desta com *A. fimbriatus* que formaram um clado bastante robusto alocado como grupo-irmão do clado [*A. lituratus*+(*A. obscurus*+*A. planirostris*+*A. amplus*)].

A situação mais conflitante observada na comparação dos resultados dos três trabalhos está relacionada com *A. jamaicensis*. LIM (1997) propôs que *A. jamaicensis* tem uma distribuição na América do Sul restrita ao norte do rio Orinoco na Venezuela, não ocorrendo no Brasil onde, possivelmente é excluída devido à competição com *A. planirostris* ou outras espécies. Os resultados apresentados aqui mostraram que a média das distâncias genéticas obtidas entre *A. jamaicensis* da Amazônia brasileira e *A. planirostris* do estado de São Paulo é alta (20,3%), e indicativa de divergência específica em mamíferos (WEISS 1998). Estes resultados sugerem que o espécime proveniente da região amazônica, pode ser reconhecido como *A. jamaicensis*, mas a falta de dados de regiões intermediárias e adjacentes às analisadas não permite inferências mais consistentes em relação à distribuição dessas duas espécies.

As diferenças observadas entre as três árvores comparadas podem ser decorrentes principalmente de três fatores. Primeiro, o número amostral utilizado nas várias análises, que quando baixo pode dificultar a obtenção de

uma árvore que demonstre realmente relações filogenéticas robustas. Apesar do número baixo de espécimes utilizados, a maioria das análises filogenéticas já realizadas também utilizaram números amostrais reduzidos e produziram resultados consistentes (VAN DEN BUSSCHE *et al.* 1998; NIKAIDO *et al.* 2001; BAKER *et al.* 2004; LIM *et al.* 2004; DÁVALOS 2005).

O tamanho reduzido da seqüência do citocromo b utilizada constitui o segundo fator. As seqüências finais aplicadas na análise filogenética apresentavam apenas 378 sítios de nucleotídeos, entretanto 140 sítios foram informativos, representando um número alto de caracteres para uma análise filogenética. O terceiro fator seria a ocorrência de possíveis erros na reação e/ou na leitura do sequenciamento para as amostras obtidas de tecidos fixados. A influência de prováveis erros no alinhamento das seqüências e na análise filogenética foi minimizada com a exclusão das regiões iniciais, que apresentavam altas taxas de “gaps” e bases inespecíficas, comparadas com o resto das seqüências. As seqüências resultantes dos cortes apresentaram erros apenas em dois sítios nucleotídicos no pareamento de *A. fimbriatus* e *A. planirostris*, o que provavelmente provocou uma sensível redução nos valores de “bootstrap” dos clados que alocaram essas duas espécies, mas não comprometeu a robustez da árvore gerada.

Os valores das distâncias intra-específicas para *A. obscurus* (3,8%), *A. jamaicensis* (4,1%) e *A. lituratus* (4,1%) foram altos em comparação com os outros táxons analisados. Estes resultados eram esperados para o primeiro táxon que tinha haplótipos provenientes de regiões diferentes (SP e AM), porém os haplótipos representativos dos outros dois táxons apresentaram uma distância relativamente alta para exemplares coletados na mesma região (SP para *A. lituratus* e AM para *A. jamaicensis*). DITCHFIELD (2000), analisando seqüências do gene do citocromo b observou que a variação filogeográfica entre haplótipos de diferentes regiões é alta para *A. lituratus*, assim como a variação local, mostrando que esta espécie apresenta pouca estruturação geográfica.

Os resultados apresentados, embora não permitam inferências mais consistentes em relação à sistemática das espécies de grandes *Artibeus*, indicam que a problemática envolvendo as relações filogenéticas ainda persiste, principalmente devido à falta de informações mais abrangentes sobre

a distribuição e a variação geográfica deste controverso, mas importante componente da fauna neotropical.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M. S. & V. A. TADDEI. 1995. A newsletter of the neotropical section of the IUCN/SSC Chiroptera specialist group. **Chiroptera Neotropical,** Belo Horizonte, **1** (2): 24.

BAKER, M. L., J. P. WARES, C. G. HARRISON, R. D. MILLER. 2004. Relationships among the families and the orders of marsupials and the major mammalian lineages based on recombination activating gane-1. **Journal of Mammalian Evolution**. Riverside, **11**(1):1-16.

DÁVALOS L. M. 2005. Molecular phylogeny of Funnel-eared bats (Chiroptera : Natalidae), with notes on biogeography and conservation. **Molecular Phylogenetics And Evolution**. São Diego, 37 (1): 91-103.

DAVIS, W. B. 1984. Review of the large fruit-eating bats of the *Artibeus "lituratus"* complex (Chiroptera: Phyllostomidae) in Middle America. **Occasional Papers, Museum of Texas Tech University**. Lubbock, **93**: 1-16.

DITCHFIELD, A. D. 2000. The comparative phylogeography of neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. **Molecular Ecology**. Oxford, **9**(9):1307-1318.

GIANNINI N. P. & N. B. SIMMONS. 2003. A phylogeny of megachiropteran bats (Mammalia: Chiroptera: Pteropodidae) based on direct optimization analysis of one nuclear and four mitochondrial genes. **Cladistics – The Internacional Journal of Willi Henning Society**. Londres, 19 (6): 496-511.

GUERRERO J. A., E. DE LUNA, D. GONZALEZ. 2004. Taxonomic status of Artibeus jamaicensis triomylus inferred from molecular and morphometric data. **Journal of Mammalogy**. Lawrence, 85 (5): 866-874.

HANDLEY, C. O. 1987. New species of mammals from Northern South America: fruit-eating bats, genus *Artibeus* Leach. **Fieldiana: Zoology**. Chicago, **39**: 163-172.

———. 1989. The *Artibeus* of Gray 1838, p. 443-468. *In:* K. H. Redford & J. F. Einsenberg (Eds.). **Advances in Neotropical Mammalogy.** Gainsville, The Sandhill Crane Press, 614p.

———. 1991. The identity of *Phyllostoma planirostre* Spix,1823 (Chiroptera? Stenodermatinae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**. Nova Iorque. **206**: 12-17.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**. Nova Iorque. 16 (2): 111-120.

KOOPMAN, K. F. 1982. Biogeography of the bats of South America, p.273-302. *In*: M. A. Mares & H. H. Genaways (Eds.). **Mammalian Biology in South America.** Special Publication Series Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh. Vol. 6, 539p.

LIM, B. K. & D. E. WILSON. 1993. Taxonomic status of *Artibeus amplus* (Chiroptera: Phyllostomidae) in northern South America. **Journal of Mammalogy**. Provo. **74**: 763-768.

LIM, B. K. 1997. Morphometric differentiation and species status of the allopatric fruit-eating bats *Artibeus jamaicensis* and A. *planirostris* in Venezuela. **Studies on Neotropical Fauna and Environments**. Sz Lisse. **32**: 65-71.

LIM, B. K., M. D. ENGSTROM, T. E. LEE, J. C. PATTON, J. W. BICKHAN. 2004. Molecular differentiation of large species of fruit-eating bats (*Artibeus*) and phylogenetic relationships based on the cytochome b gene. **Acta Chiropterologica**. Varsóvia. 6(1): 1-12.

MARQUES-AGUIAR, S. A. 1994. A systematic review of the large species of *Artibeus* Leach, 1821 (Mammalia: Chiroptera) with some phylogenetic inferences. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Zoológica**. Belém, **10**(1): 3-83.

MARTINS, F. 2003. **Filogeografia intraespecífica do morcego hematófago. *Desmodus rotundus*.(Chiroptera, Phyllostomidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 79p.

OWEN, R. D. 1987. Phylogenetic analyses of the bat subfamily Stenodermatinae (Mammalia: Chiroptera). **Special Publications, The Museum, Texas Tech University**. Lubbock. **26**: 1-65.

SWOFFORD, D. 1997. **PAUP:** Phylogenetic analysis using parcimony. Version 4.0b10. Smithsonian Institution, Washington, D.C.

TEELING E. C., M. S. SPRINGER, O. MADSEN, P. BATES, S. J. O'BRIEN, W. J. MURPHY. 2005. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. **Science**. Washington, **307** (5709): 580-584

THOMPSON, J. D.; D. G. HIGGINS, T. J. GIBSON. 1994. Clustal W: improving the sensivity of progressive multiple sequence aligment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. Oxford. **22** (22): 4673-4680.

VAN DEN BUSSCHE, R. A., J. L. HUDGEONS, R. J. BAKER. 1998. Phylogenetic accuracy, stabilility, and congruence: relationships within and among the New World bat genera Artibeus, Dermanura, and Koopmania. p. 59-71. *In*: Kunz T. H. & P. A. Racey (Eds.), **Bat Biology and Conservation**. Smithsonian Institution Press, Washington, 365p.

WIENS, J. J. 1998. Combining data sets with different phylogenetic histories. **Systematic Biology**. Londres. **47**: 568-581.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados e discussões apresentados nos dois trabalhos permitiram as seguintes conclusões:

- O pré-tratamento de tecidos fixados em soluções-tampão, com pH neutro a 37^{o}C minimiza a ação da formalina sobre os ácidos nucléicos, melhorando a qualidade do DNA extraído e o desempenho das reações de amplificação e sequenciamento de genes;

- As seqüências obtidas da amplificação de DNA extraído de tecidos fixados são confiáveis para análises filogenéticas apesar de aparentemente serem mais passíveis de erro quando comparadas com seqüências obtidas de DNA extraído de tecidos frescos;

- Da filogenia proposta para as espécies brasileiras de grandes *Artibeus* não foi possível inferir uma relação consistente entre *A. obscurus*, *A. planirostris* e A*. amplus*, mas indicou que estas três espécies formam um grupo monofilético robusto juntamente com *A. lituratus*;

- As topologias das três árvores mais parcimoniosas apresentadas mostraram também que *A. jamaicensis* e *A. planiroistris* não formam um grupo monofilético e, que o primeiro táxon pode ocorrer em regiões brasileiras.