



**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**Marcia de Jesus Oliveira Mascarenhas**

***Carollia perspicillata* (CHIROPTERA, PHYLLOSTOMIDAE) DE OCORRÊNCIA NO  
ESTADO DO MARANHÃO: UM ENFOQUE MORFOLOGICO E MOLECULAR**

**SÃO LUÍS – MA**

**2017**

**MARCIA DE JESUS OLIVEIRA MASCARENHAS**

***Carollia perspicillata* (CHIROPTERA, PHYLLOSTOMIDAE) DE OCORRÊNCIA NO  
ESTADO DO MARANHÃO: UM ENFOQUE MORFOLOGICO E MOLECULAR**

Dissertação apresentado à coordenação do  
Programa de Pós-Graduação mestrado em  
Ciência Animal da Universidade Estadual do  
Maranhão – UEMA. Área de Concentração:  
Conservação e Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudene Barros – CESC/UEMA

Co-orientador: Prof. Dr. Elmary Fraga – CESC/UEMA

**SÃO LUÍS – MA**

**2017**

**MARCIA DE JESUS OLIVEIRA MASCARENHAS**

***Carollia perspicillata* (CHIROPTERA, PHYLLOSTOMIDAE) DE OCORRÊNCIA NO  
ESTADO DO MARANHÃO: MORFOLOGICO E MOLECULAR**

Dissertação apresentado à coordenação do Programa de Pós-Graduação mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA. Área de Concentração: Conservação e Reprodução Animal.

**APROVADO EM:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Maria Claudene Barros – Orientadora  
Doutorado em Ciências Biológicas  
Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA**

---

**Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga  
Doutorado em Genética e Biologia Molecular  
Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA**

---

**Prof. Dr. Flávio Kulaif Ubaid  
Doutorado em Ciências Biológicas  
Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA**

**São Luís - MA**

**2017**

## RESUMO

A espécie *Carollia perspicillata*, morcego frugívoro, pertence ao gênero *Carollia* família Phyllostomidae. Esta é bastante abundante em ambientes tropicais e tem um grande potencial na dispersão de sementes, visto seu hábito alimentar. Comumente morcegos do gênero *Carollia* vêm sendo classificados como um complexo de espécies devido a grande similaridade destes. Estudos com dados morfológicos e moleculares vêm sendo aplicados a fim de conhecer essa fauna tão pouco estudada. Neste contexto, objetivou-se identificar a espécie *C. perspicillata* e informar quanto a sua dinâmica populacional no estado do Maranhão, para tanto utilizou-se de dados morfométricos, craniométricos e moleculares. Amostras de *C. perspicillata* foram coletadas nos municípios de Caxias, Carutapera, Godofredo Viana, Turiaçu, Cândido Mendes, Chapadinha, Codó, Urbano Santos, São Luís e Vargem Grande. As medidas morfométricas e craniométricas foram aferidas com auxílio de paquímetro digital. Um total de 39 medidas foram analisadas nos softwares BioEstar e Statistic. O DNA total foi extraído usando o kit Wizard Genomic DNA Purification da Promega. Os genes mitocondriais COI e rRNA 16S foram amplificados via PCR e posteriormente sequenciados. Para análise dos dados moleculares, utilizaram-se os softwares: BioEdit, DAMBE, MEGA, DNAsp, NETWORK, BAPS e ARLEQUIN. Os resultados morfológicos juntamente aos moleculares apontaram a ocorrência de um status específico *C. perspicillata* no estado do Maranhão, no entanto, a existência de até três linhagens. Portanto, estes dados reforçam a necessidade de uma revisão taxonômica nesse grupo.

**Palavras Chave: Morcego, Crânio, Genes mitocondriais**

## ABSTRACT

The species *Carollia perspicillata*, a frugivorous bat, belongs to the genus *Carollia* family Phyllostomidae. This is quite abundant in tropical environments and has great potential in seed dispersal, given its food habit. Commonly bats of this genus *Carollia* have been classified as a species complex due to their great similarity. Studies with morphological and molecular data have been applied in order to know this fauna so little studied. In this context, the objective was to identify the species *C. perspicillata* and to report its population dynamics in the state of Maranhão, using morphometric, craniometric and molecular data. Samples of *C. perspicillata* were collected in the municipalities of Caxias, Carutapera, Godofredo Viana, Turiçu, Cândido Mendes, Chapadinha, Codó, Urbano Santos, São Luís and Vargem Grande. The morphometric and craniometric measurements were measured with the aid of a digital caliper. A total of 39 measures were analyzed in the BioEstar and Statistic software. Total DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification kit from Promega. The mitochondrial genes COI and 16S rRNA were amplified via PCR and sequenced sequentially. For the analysis of the molecular data, we used the software: BioEdit, DAMBE, MEGA, DNAsp, NETWORK, BAPS and ARLEQUIN. The morphological results together with the molecular indicated the occurrence of a single specific status *C. perspicillata* in the state of Maranhão, however, but the molecular data allowed to verify the existence of up to three lineages. Therefore, these data reinforce the need for a taxonomic revision in this group.

Keywords: Bat, Skull, Mitochondrial Genes

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *C. perspicillata* evidenciando a folha nasal e papilas distribuídas em V 13
- Figura 2.** Genoma mitocondrial (modificado a partir de Janke et al., 1994). As setas mostram os genes utilizados nesse estudo. 14
- Figura 3.** Pontos de coleta das amostras de *Carollia* nos biomas Amazônia Legal e Cerrado no estado do Maranhão. 17
- Figura 4.** Crânio de *C. perspicillata* mostrando a composição dentária e arco zigomático incompleto. 20
- Figura 5.** Crânio de espécimes do gênero *Carollia* mostrando a composição dentária com disposição ventral frontal diferente entre os espécimes. Em A 2° incisivo de fácil visualização; B 2° incisivo difícil visualização; C, D, E e F 2° incisivo de fácil visualização 21
- Figura 6.** Teste não paramétrico de Mann Whitney (U). Em A variação de medidas entre fêmeas e machos para o Antebraço e em B a variação de medidas para o polegar. 22
- Figura 7.** Escores da função discriminante das populações de *C. perspicillata* no estado do Maranhão. 24
- Figura 8.** Rede de haplótipos com base no gene mitocondrial COI para populações de *C. perspicillata* no estado do Maranhão. 28
- Figura 9.** Árvore filogenética Neighbor-Joining (NJ) com o uso do algoritmo Kimura 2 parâmetro com base no gene mitocondrial COI, observado entre os 41 haplótipos de *C. perspicillata* do Estado do Maranhão. Os valores dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP) e (Máxima Likelihood (ML)) da esquerda para direita. CHA=Chapadinha, SLZ= São Luís, GVIA= Godofredo Viana, CAX=Caxias, CAR=Carutapera, COD=Codó, TUR=Turiaçu, USAN= Urbano Santos, VGRA = Vargem Grande, CMEN = Cândido Mendes. 30
- Figura 10.** Análise bayesiana para o gene COI dos espécimes de *C. perspicillata* do estado do Maranhão. 1-Chapadinha, 2 – Caxias, 3 – Codó, 4 – Urbano Santos, 5 – Vargem Grande, 6 – São Luís, 7 – Godofredo Viana, 8 – Carutapera, 9 – Cândido Mendes, 10 – Turiaçu. 31
- Figura 11.** Árvore filogenética Máxima Likelihood com o uso do algoritmo Kimura 2 parâmetro, com base no gene mitocondrial rRNA 16S de *C. perspicillata*. Os valores dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* (Máxima Likelihood (ML), Neighbor-Joining (NJ) e Máxima Parcimônia (MP)). CHA=Chapadinha, GVIA= Godofredo Viana, CAX=Caxias, CAR=Carutapera, COD=Codó, TUR=Turiaçu, USAN= Urbano Santos, VGRA = Vargem Grande. 35
- Figura 12.** Análise bayesiana para o gene 16S dos espécimes de *C. perspicillata* do estado do Maranhão. 1- Caxias, 2 – Cândido Mendes, 3 – Carutapera, 4 – Chapadinha, 5 – Codó, 6 – Godofredo Viana, 7 –,São Luís 8 – Turiaçu, 9 – Urbano Santos, 10 – Vargem Grande. 36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Condições de PCR para isolamento dos genes: rRNA 16S e COI.	19
<b>Tabela 2.</b> Matriz de análise fatorial com fatores principais de variáveis dos componentes da última rotação com VARIMAX normalizado. Comum = R - quadrado múltiplo) valores amostrados > 0,7	23
<b>Tabela 3.</b> Similaridade de sequencias obtidas dos espécimes do Maranhão com as disponíveis na plataforma BOLDSystems.	25
<b>Tabela 4.</b> Diversidade genética com base no gene mitocondrial COI nos espécimes de <i>C. perspicillata</i> do estado do Maranhão.	26
<b>Tabela 5.</b> Haplótipos de <i>C. perspicillata</i> com suas respectivas frequências e localidades de coleta com base no gene mitocondrial COI.	27
<b>Tabela 6.</b> Percentual médio de divergência nucleotídica gerada para o gene COI nas populações de <i>C. perspicillata</i> .	29
<b>Tabela 7.</b> Análise molecular de variância (AMOVA) com base no gene mitocondrial COI nas populações de <i>C. perspicillata</i> do estado do Maranhão.	31
<b>Tabela 8.</b> Diversidade genética de <i>C. perspicillata</i> do estado do Maranhão com base no gene mitocondrial rRNA 16S	32
<b>Tabela 9.</b> Haplótipos de <i>C. perspicillata</i> com suas respectivas frequências e localidades de coleta com base no gene mitocondrial rRNA 16S.	33
<b>Tabela 10.</b> Percentual médio de divergência nucleotídica gerada para o gene rRNA 16S nas populações de <i>C. perspicillata</i>	34

## LISTA DE ABREVIACOES

**Ant. E-** Antebraço esquerdo

**Ant. D-** Antebraço direito

**Po-** Polegar

**III Me-** Terceiro Metacarpo

**1a Fal-** Primeira falange

**2a Fal-** Segunda falange

**IV Me-** Quarto Metacarpo

**1a Fal-** Primeira Falange

**2a Fal-** Segunda Falange

**V Me-** Quinto Metacarpo

**1a Fal-** Primeira falange

**2a Fal-** Segunda falange

**Ti-** Tíbia

**Uro. Alt-** Uropatgio Altura

**U. Comp-** Uropatgio comprimento

**Ct-** Comprimento total

**Cc-** Comprimento côndilo-canino

**B-** Comprimento basal

**Cpt-** Comprimento palatal

**C-M2/3S-** Comprimento da série de dentes superiores

**C-M2/3I-** Comprimento da série de dentes inferiores

**Cm-** Comprimento da mandíbula

**Lc-** Largura externa dos *cingula*-caninos

**Lm-** Largura externa dos molares

**Li-** Largura interorbital

**Lp-** Largura posorbitria

**Lex-** Largura da caixa craniana

**Lmt-** Largura mastidea



**Lpt-** Largura palatal

**Acx-** Altura da caixa craniana

**Ao-** Altura do occipital

**CC+Inc-** Comprimento do crânio até os incisivos

**Cca-PMO-** Comprimento do canino ao processo mastóideo oposto

**CNaFo-** Comprimento do nasal ao forâmen

**LBTiL-** Largura bula timpânica porção mais larga

**LBTPP-** Largura bula timpânica na porção mais próximas

**DInCa-** Distância entre incisivo e os caninos

**BcCs-** Altura da base do crânio a crista sagital

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Características gerais dos Morcegos</b>	<b>11</b>
<b>1.2 Família Phyllostomidae e <i>Carollia perspicillata</i></b>	<b>12</b>
<b>1.3 Características Morfométricas e Craniométricas</b>	<b>13</b>
<b>1.4 Marcadores moleculares</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>15</b>
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Área de estudo</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Obtenção das amostras</b>	<b>16</b>
<b>3.3 Caracteres morfológicos</b>	<b>17</b>
<b>3.4 Técnicas moleculares</b>	<b>18</b>
<b>3.5 Análises dos dados</b>	<b>19</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Análises morfológica</b>	<b>20</b>
<b>4.2 Análises estatísticas</b>	<b>22</b>
<b>4.3 Análises moleculares</b>	<b>24</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>40</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>41</b>
<b>ANEXO</b>	<b>48</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Características gerais dos Morcegos

Morcegos pertencem à ordem Chiroptera, palavra derivada do grego *cheir* (mão) e *pteron* (asa). Estes constituem um dos grupos de mamíferos mais diversificados do mundo, com 18 famílias, 202 gêneros e 1.120 espécies (PERACCHI et al., 2011; REIS et al., 2013), representando aproximadamente 25% das espécies conhecidas de mamíferos do mundo (WILSON e REEDER, 2005; REIS et al., 2013) e constituindo a segunda maior ordem em número de espécies (NOWAK, 1991; EMMONS e FEER, 1997).

Os morcegos desempenham papéis ecológicos importantes na natureza, interagem com um amplo espectro de organismos e atuam como polinizadores, dispersores de sementes e controladores de populações de insetos (KUNZ e FENTON, 2003; BIANCONI et al., 2004; CHAVES et al., 2012) dessa forma são notáveis contribuidores da riqueza e diversidade da mastofauna de vários ecossistemas (MARES et al., 1981; SCHNEIDER, 2000), ocupam uma grande variedade de abrigos, tanto estruturas construídas pelo homem, como cavernas, minas, fendas feitas em rocha, como ambientes naturais, uma vez que a grande maioria das espécies usam plantas como abrigo (KUNZ e LUMSDEN, 2003; PERACCHI et al., 2011). Estão ligados à transmissão de algumas doenças, pois seus abrigos são propícios a proliferação de fungos, como o *Histoplasma capsulatum*, transmissor da histoplasmose e suas fezes atuam como alérgenos, podendo levar a asma e a rinite (BREDT et al., 1996). Os hematófagos são os responsáveis pela transmissão, quase total dos casos de raiva em bovinos e equinos, infectando milhares de animais anualmente (SCHNEIDER et al., 2009).

Tradicionalmente os Chiroptera são divididos em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera (KOOPMAN, 1994). Os Megachiroptera não ocorrem no Brasil e são representados por apenas uma família a Pteropodidae com 150 espécies distribuídas pelo velho mundo, na região tropical da África, Índia sudeste da Ásia e Austrália (SIMMONS, 2005). Os morcegos desta família são conhecidos popularmente por raposas voadoras, devido à grande similaridade de suas faces com a da raposa, apresentam tamanho médio a grande, como o *Pteropus vampyrus* que atinge aproximadamente 1,5 kg de peso e possui uma envergadura de 1,7 m (REIS et al., 2011). A subordem Microchiroptera é composta por 17 famílias e 930 espécies, geralmente apresentam tamanho médio, mas podem ocorrer espécies diminutas como *Furipterus borrens* com peso médio de três gramas e 15 cm de envergadura (NOWAK, 1994).

Estudos recentes têm proposto duas subordens em substituição a classificação tradicional: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera. Segundo Fenton e Ratcliffe (2010) essa

nova classificação está apoiado por uma combinação de dados morfológicos e genéticos. A subordem Yinpterochiroptera compreende seis famílias: Rhinolophidae, Hipposideridae, Hinopomatidae, Craseonycteridae, Megadermatidae e Pteropodidae, enquanto a Yangochiroptera 14 famílias das quais nove ocorrem nas Américas e no Brasil: Emballonuridae, Furipteridae, Molossidae, Mormoopidae, Natalidae, Noctilionidae, Phyllostomidae, Thyropteridae e Vespertilionidae com 68 gêneros e 179 espécies (PERACHI et al., 2011; PAGLIA et al., 2012; NOGUEIRA et al. 2014; FEIJO, 2015).

## 1.2 Família Phyllostomidae e *Carollia perspicillata*

A família Phyllostomidae é a mais diversificada em números de espécie de morcegos compreendendo mais de 200 espécies, 60 gêneros (SOLARI e MARTÍNEZ-ARIAS, 2014), subdividida em cinco subfamílias: Desmodontinae, Glossophaginae, Phyllostominae, Carollinae e Stenodermatinae. Esta apresenta como característica marcante a presença de uma folha nasal membranosa em forma de lança ou folha, na extremidade do focinho (PERACCHI et al., 2011) e destaca-se como a mais versátil na exploração de alimentos dentre os Chiroptera, podendo explorar frutos, néctar, pólen, folhas, insetos, vertebrados e sangue (GARDNER, 1977; BREDT et al, 2012; REIS et al, 2013; BAKER, 2016). Os frugívoros desempenham importante papel na dispersão de sementes, alguns botânicos afirmam que os morcegos são os dispersores mais importantes entre todos os mamíferos (HUBER, 1910). Mikich (2002) sugere que várias espécies de árvores da floresta de algumas regiões tropicais são dispersas por eles. De acordo com Bredt et al. (1996) e Mikich (2002) os melhores dispersores de sementes nas Américas são os filostomídeos, o que os coloca entre os principais responsáveis pela regeneração das florestas neotropicais. Esse potencial de dispersão está associado com seu hábito de forrageio e sua mobilidade, pois percorrem grandes distâncias em busca de alimentos (GALINDO-GONZÁLEZ, 1998).

Dentre as espécies mais abundantes da família Phyllostomidae está *Carollia perspicillata* (Linnaeus, 1758), esta possui tamanho médio, envergadura aproximadamente de 25 cm, massa média de 18,5g e comprimento total entre 66 e 95 mm (Figura 1). Possui orelhas curtas e menores que a cabeça; a folha nasal é bastante curta e triangular; o lábio inferior possui formato de “V” com uma verruga centro marginal ornada por várias papilas pequenas, apresenta coloração variando de marrom quase negro a um marrom ferruginoso ou cinza (CLOUTIER e THOMAS, 1992; REIS et al., 2013). Segundo Simmons (2005) é uma das espécies de mamíferos mais abundantes nos continentes neotropicais. Esta espécie é frugívora podendo complementar sua alimentação com insetos. *C. perspicillata* possui

fundamental importância na dispersão de sementes de diversas plantas pioneiras, auxiliando na restauração natural de áreas degradadas (RICARDO et al. 2014) cerca de 200 plantas possuem frutos consumidos por *C. perspicillata* (FABIÁN et al. 2008; BREDT et al. 2012), revelando assim ser um excelente dispersor de sementes, uma vez que sua digestão é rápida e eficaz o que traz evidências de partição de recursos por esta espécie.

**Figura 1.** *C. perspicillata* evidenciando a folha nasal e papilas distribuídas em V



Fonte: GENBIMOL

### 1.3 Características Morfométricas e Craniométricas

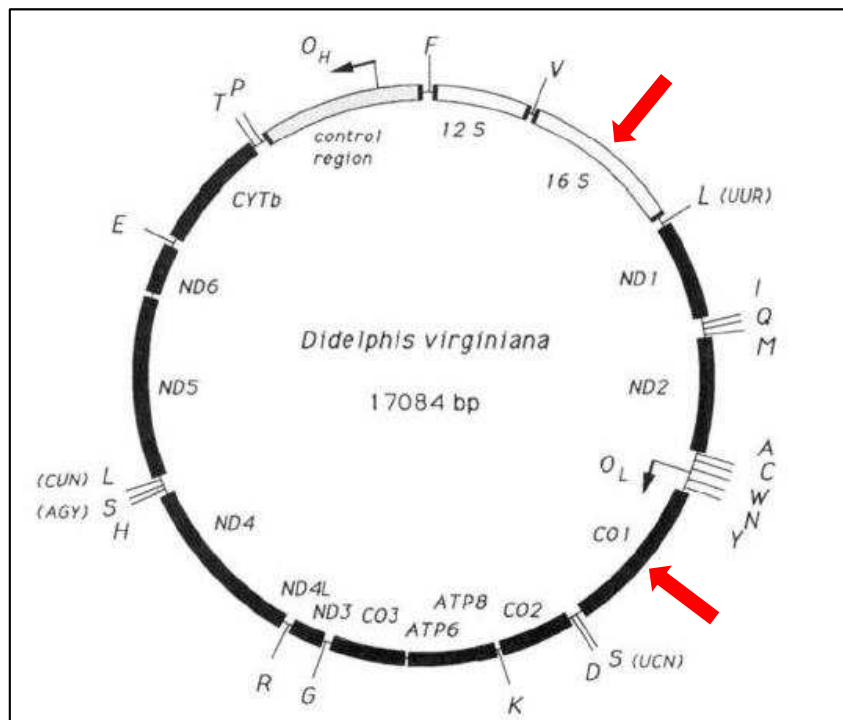
Morfometria e craniometria são medidas utilizadas para quantificar a diferenciação morfológica de uma espécie. A craniometria é geralmente definida como sendo uma técnica, ou sistema convencional que determina a medição do crânio de maneira sistematizada universalmente. A craniometria permite o conhecimento das variabilidades morfológicas dos crânios (PEREIRA e ALVIM, 2006).

No estudo da morfometria utiliza-se de medidas para mensurar as diferenças entre as espécies, criando referências para comparações (PERES-NETO, 1995). Dentre as suas aplicações, uma é a identificação de populações de organismos vivos, que podem assumir formas ou tamanhos diferentes conforme o ambiente em que se desenvolveram. A análise morfométrica constitui uma importante ferramenta no estudo da morfologia, seja para a detecção de padrões, ou mesmo determinação de anomalias e variações tanto de tamanho quanto da forma (STÜPP DE SOUZA, 2008). Vários estudos morfométricos e craniométricos em morcegos vêm sendo realizados a fim de classificar e organizar as espécies, em vista as grandes similaridades a nível de subfamília e gênero (BAKER et al., 2002).

## 1. 4 Marcadores moleculares

Os primeiros estudos sobre o uso do Genoma mitocondrial (mtDNA) como marcador molecular datam das décadas de 70-80 com estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos (AVISE, 1994; ARIAS et al., 2003). O genoma mitocondrial vem sendo utilizado em vários estudos como marcador molecular por possuir características genéticas e estruturais extremamente peculiares e únicas, apresenta facilidade em isolá-lo, possui um grande número de cópias por célula e tem tamanho pequeno e organização simples. É um genoma pequeno (com aproximadamente 16 kb nos animais) e circular, com raras exceções. Apresenta herança materna, possui 37 genes (13 genes codificadores de proteínas, 22 para RNA transportadores e 2 para as subunidades ribossômicas) e possui uma região não codificadora D-loop (Figura 2). O conteúdo gênico é bastante conservado e a ordem em que os genes se encontram organizados no genoma costuma ser também conservada. A taxa evolutiva, ou seja, de substituições de base é muito alta, quando comparada a do genoma nuclear (ARIAS et al., 2003; MARQUES, 2003; SCHNEIDER, 2007).

**Figura 2.** Genoma mitocondrial (modificado a partir de Janke et al., 1994). As setas mostram os genes utilizados nesse estudo.



Estudos moleculares com os genes rRNA 16S, rRNA 12S, COI, Cyt b em quirópteros têm proporcionado caracterização de espécies crípticas, identificação das espécies, estudos

populacionais e relacionamentos filogenéticos (BURLAND e WILMER, 2001; BUSSCHE e HOOFFER, 2004; MARTINS et al., 2009; OLIVEIRA, 2013). Neste contexto foram amplificados nesse estudo os genes rRNA 16S e COI para a espécie *C. perspicillata* de ocorrência no estado do Maranhão. Dentre os genes mitocondriais o gene rRNA16S é o que se apresenta mais conservado com baixas taxas de mutações, sendo bastante utilizado em estudos para a identificação e caracterização de espécies (COLEMAN, 2003; NAEGELE et al., 2006). O gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI ou Cox1) apresenta 1.551 pares de bases, dos quais 648 são consideradas como *barcoding* (MURAKAMI et al., 1998) e servem como um código de barras de DNA, possuindo vantagens na identificação de espécies, especialmente em espécies crípticas, tendo em vista que possui divergências intraespecíficas menores que as interespecíficas (HEBERT et al., 2003).

O presente trabalho objetivou identificar através da morfologia e molecular as espécies do gênero *Carollia* de ocorrência no estado do Maranhão e inferir sobre a dinâmica populacional da espécie *C. perspicillata*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Identificar através da morfometria, craniometria e molecular as espécies do gênero *Carollia* de ocorrência no estado do Maranhão e inferir sobre a dinâmica populacional da espécie *C. perspicillata*

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar a espécie *C. perspicillata* usando a craniometria e morfometria externa;
- Revelar o padrão craniométrico da espécie *C. perspicillata*
- Identificar via DNA *barcoding* a espécie *C. perspicillata*;
- Inferir sobre a dinâmica populacional de *C. perspicillata* de ocorrência no estado do Maranhão.

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 Área de estudo**

O Estado do Maranhão possui área superficial da ordem de 331.983,29 km<sup>2</sup>, sendo o oitavo maior Estado brasileiro e o segundo do Nordeste em extensão territorial (IBGE, 2002).

Está localizado entre os paralelos 1°01' e 10°21' sul e os meridianos 41°48' e 48°50' oeste. Ao norte limita-se com o Oceano Atlântico, sul e sudoeste com Tocantins, oeste com o Pará e a leste e sudeste limita-se com Piauí. O Maranhão encontra-se numa posição estratégica entre três macrorregiões brasileiras: Nordeste, Norte e Centro Oeste, representa uma área de transição entre biomas, composto de Amazônia legal, Cerrado e Caatinga o que lhe atribui grande diversidade morfológica e ambiental (MARANHÃO, 2011).

A floresta amazônica maranhense, do ponto de vista estrutural, é bastante semelhante à floresta úmida amazônica, possui florestas exuberantes, porém frágeis e que sofrem com o processo de devastação, visto que são sustentadas por seu ciclo biológico (MUNIZ, 2011). Segundo Valois (2003) estima-se que na Amazônia o estado do Maranhão possua cerca de 40% da sua área de floresta já desmatada.

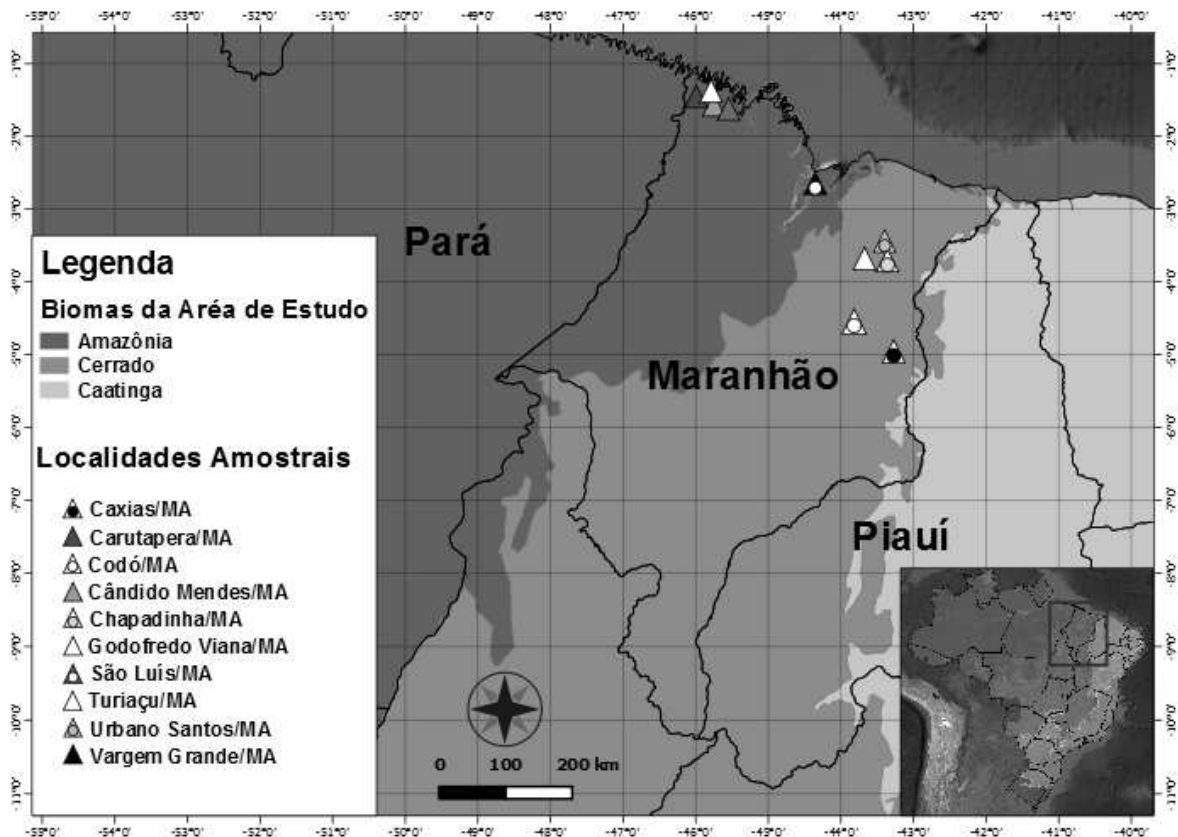
O Cerrado Maranhense possui formações florestais com extensões significativas com destaque para as florestas estacionais decíduais e em menor abrangência florestas ombrófilas densas (MARANHÃO, 2011). As árvores do Cerrado, que compõem a vegetação permanente, são muito peculiares, com troncos tortuosos, cobertos por uma cortiça grossa, cujas folhas são geralmente grandes e rígidas (FERRI, 1977). Estima-se que na área do Cerrado são encontradas um terço da biodiversidade brasileira e cerca de 5% da flora e fauna mundiais. O Cerrado é considerado a savana biologicamente mais diversificada do mundo (HOGAN et al, 2002; SAWYER, 2002). Há uma grande diversidade de habitats e de espécies e a maioria destas está restrita a áreas específicas que, em caso de destruição, seriam levadas à extinção (MMA, 1999; HOGAN et al, 2002; SAWYER, 2002; KLINK e MACHADO, 2005).

### **3.2 Obtenção das amostras**

Os espécimes de morcegos foram coletados em diferentes municípios no estado do Maranhão: Caxias, Carutapera, Godofredo Viana, Turiçu, Candido Mendes, São Luís, Codó, Chapadinha, Urbano Santos e Vargem Grande (Figura 3).



**Figura 3.** Pontos de coleta das amostras de *Carollia* nos biomas Amazônia Legal e Cerrado no estado do Maranhão.



As expedições foram realizadas aos municípios e as coletas realizadas por três noites consecutivas, os morcegos foram coletados com o uso de redes de neblina que foram armadas junto às fontes de alimento e em possíveis rotas de voo no horário de 18:00 às 23:00 horas. Após a coleta, os mesmos foram acondicionados em sacos de pano e transportados ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA (GENBIMOL). No laboratório os espécimes foram anestesiados, fotografados, medidos com o auxílio de um paquímetro digital (300 mm-12”), identificados, pesados, sexados e verificados quanto à condição reprodutiva, em seguida foram sacrificados e retirou-se o tecido muscular. Os morcegos foram fixados em posição anatômica de coleção, com formol a 10% e conservados em álcool 70% GL. Os tecidos do uropatágio dos espécimes dos municípios de São Luís, Codó, Chapadinha, Urbano Santos e Vargem Grande utilizados nas análises, foram cedidos pela equipe do professor Círio Lívio da UFMA.

### 3.3 Caracteres morfológicos

Realizou-se identificação dos espécimes através dos caracteres morfológicos, como: Coloração da pelagem, composição do crânio, disposição das papilas, disposição dos dentes

além da morfometria e craniometria. Para realização craniométrica a retirada do crânio de cada espécime foi realizada por meio de rebatimento bucal e a limpeza da pele por meio manual e com o auxílio de larvas de insetos do gênero *Dermestes* (Coleoptera, Dermestidae). Depois de limpos, os crânios foram clareados com água oxigenada a 10%, levados à estufa a uma temperatura de 37°C para secagem e posteriormente identificados com numeração e acondicionados individualmente em frascos limpos.

Com auxílio de paquímetro digital, foram realizadas 16 medidas externas e 23 cranianas, adaptadas de Vizzotoe Taddei (1973), Martins (2008) e Andrade (2011), sendo essas: pé (Pé), antebraço esquerdo (Ant E), antebraço direito (Ant D), polegar (Po), III metacarpo (III Me), 1ª falange do terceiro metacarpo (1ª Fal- III), 2ª falange do terceiro metacarpo (2ª Fal- III), IV metacarpo (IV Me), 1ª falange do quarto metacarpo (1ª Fal- IV), 2ª falange do quarto metacarpo (2ª Fal- IV), V metacarpo (V Me), 1ª falange do quinto metacarpo (1ª Fal- V), 2ª falange do quinto metacarpo (2ª Fal- V), tíbia (Ti), uropatágio altura (Uro. Alt), uropatágio comprimento (Uro. Comp), comprimento total (Ct), comprimento côndilo-canino (Cc), comprimento basal (Cb), comprimento palatal (Cpt), comprimento da série de dentes superiores (CM2/3S), comprimento da série de dentes inferiores (CM2/3I), comprimento da mandíbula (Cm), Largura externa dos cingula-caninos (Lc), largura externa dos molares (Lm), largura interorbital (Li), largura posorbitária (Lp), largura zigomática (Lz), largura da caixa craniana (Lcx), largura mastóidea (Lmt), largura palatal (Lpt), altura da caixa craniana (Acx), altura do occipital (Ao), comprimento do crânio até o incisivos (CInc), comprimento do canino ao processo mastóideo oposto (CaPMO), comprimento do nasal ao forâmen (NaFo), largura bula timpânica porção mais larga (LBTiL), largura bula timpânica na porção mais próximas (LBTPP) distância entre incisivo e o caninos (DInca), altura da base do crânio a crista sagital (BcCs) e comprimento basal (B).

### 3.4 Técnicas moleculares

O DNA total foi extraído usando o kit Wizard Genomic DNA Purification Promega seguindo as instruções do fabricante (Anexo I).

Fragmentos dos genes rRNA 16S e COI foram amplificados a partir do DNA total utilizando-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para o gene rRNA 16S utilizou-se os primers descritos por Palumbi et al. (1991) e para o COI o descrito por Folmer et al. (1994) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Condições de PCR para isolamento dos genes: rRNA 16S e COI.

GENE	PRIMERS	Condições de PCR
rRNA 16S	16S-L1987 5' GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC 3' 16S-H2609 5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'	94°C por 5' (Desnaturação inicial) 30 ciclos: 94°C por 30" (Desnaturação) 50°C por 1' ( <i>Anealling</i> ) 72°C por 2' (Extensão) 72°C por 7' (Extensão final)
COI	LCO-1490 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3' HCO-21985' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'	94°C por 5' (Desnaturação inicial) 30 ciclos 94°C por 45" (Desnaturação) 55°C por 50" ( <i>Anealling</i> ) 72°C por 1" (Extensão) 72°C por 10' (Extensão final)

Os produtos das PCRs foram visualizados em gel de agarose a 1% e purificados usando o kit ExoSap IT conforme fabricante. Estes foram submetidos à reação de sequência pelo método de Sanger et al. (1977) e depois precipitados e levados ao sequenciador automático de DNA. Protocolos descritos no anexo I.

### 3.5 Análises dos dados

#### Análises morfométricas

A análise univariada foi realizada no programa BioEstat 5.0 (AYRES et al. 2007) onde foi testados quanto à simetria, através do teste de normalidade de *Lillieffors* que infere o grau de distribuição de uma amostra em relação a sua distribuição (HAIR *et al.*, 2009). Para análise da variação nos valores absolutos das medidas para machos e fêmeas foi realizado o teste de Mann-Whitney (U) destinado a comparar amostras independentes e não paramétricas.

No software STATISTICA 13.0.159.7 (STATSOFT, 1993) foi realizado testes de suposições inerentes às bases estatísticas da análise multivariada onde foram utilizados para determinar a contribuição de cada um dos caracteres, a fim de estimar sobre a possível segregação de grupos geográficos. A associação entre as variáveis foi testada pelo método de rotação ortogonal Varimax normalizado, que redistribuiu as variâncias dos primeiros fatores na busca de um padrão mais simples.

A análise discriminante foi realizada para calcular as distâncias entre os grupos baseadas na Matriz de Distância de Mahalanobis (D2). O gráfico canônico também foi realizado para resumir a maior parte da informação original a um número mínimo de fatores em todos os grupos amostrais e originou um gráfico de dispersão das populações.

## Análises Moleculares

As sequências de DNA foram alinhadas no programa Bioedit (HALL, 1999). A qualidade da informação foi estimada através do programa DAMBE (XIA e XIE, 2001). As análises de distâncias evolutivas e relações de parentesco foram realizadas no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). A significância dos agrupamentos foi estimada pela análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). Para obtenção do número de haplótipos e frequências haplotípica e nucleotídica foi utilizado o programa DnaSP 5.10 (ROZAS et al., 2003). Para verificar a existência de diferenciação populacional foi utilizado o programa ARLEQUIN, versão 3.1 (EXCOFFIER et al., 2007). A distribuição dos haplótipos foi inferida por meio da construção de rede haplótipos, obtida através do programa NETWORK 4.5.1.0 (BANDELT et al., 1999). Para verificar a estruturação populacional da espécie foi realizado análise bayesiana utilizando o programa BAPS6 (CORANDER et al., 2008).

## 4 RESULTADOS

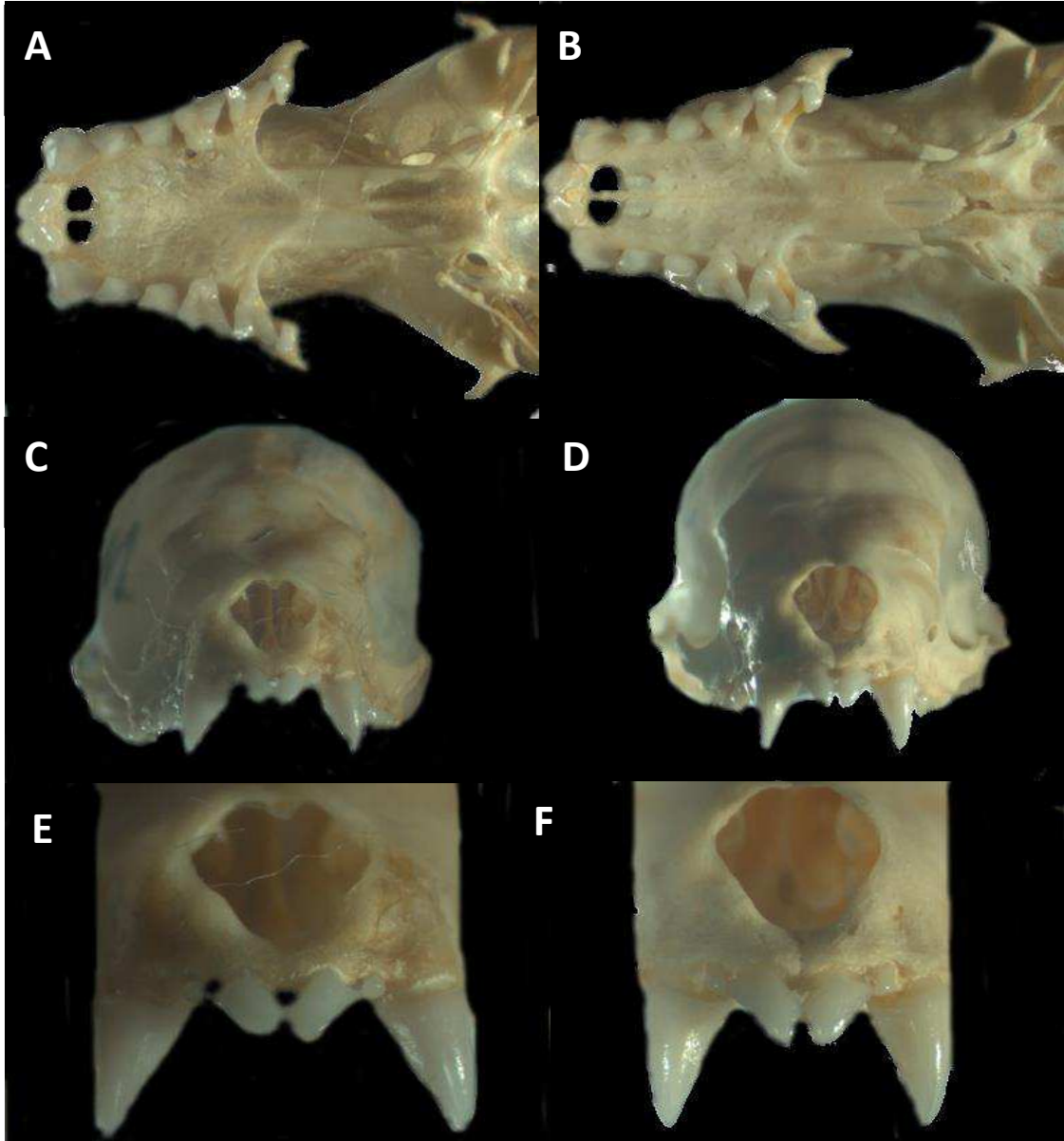
### 4.1 Análises Morfológica

Foram selecionados 50 espécimes do gênero *Carollia* dos municípios de Caxias/MA, Turiacu/MA, Godofredo Viana/MA e Carutapera/MA, onde verificou-se que a coloração variou de marrom quase negro a um marrom ferruginoso, apresentaram arco zigomático incompleto, distribuição das papilas em forma de V e composição dentária de acordo com a literatura, com i 2/2, c 1/1, pm 2/2, m 3/3 = 32 dentes (Figura 4). Os crânios apresentaram variações na disposição dos dentes no que se refere ao 2º incisivo, quando visualizados ventralmente foi facilmente evidenciado em vários espécimes a presença do 2º incisivo, enquanto para outros espécimes este foi dificilmente visto (Figura 5).

**Figura 4.** Crânio de *Carollia* mostrando a composição dentária e arco zigomático incompleto.



**Figura 5.** Crânio de *Carollia* mostrando a composição dentária com disposição ventral (A e B) e frontal (C a F). Em A) O 2° incisivo de fácil visualização; Em B) 2° incisivo difícil visualização; Em C, D, E e F) O 2° incisivo de fácil visualização.



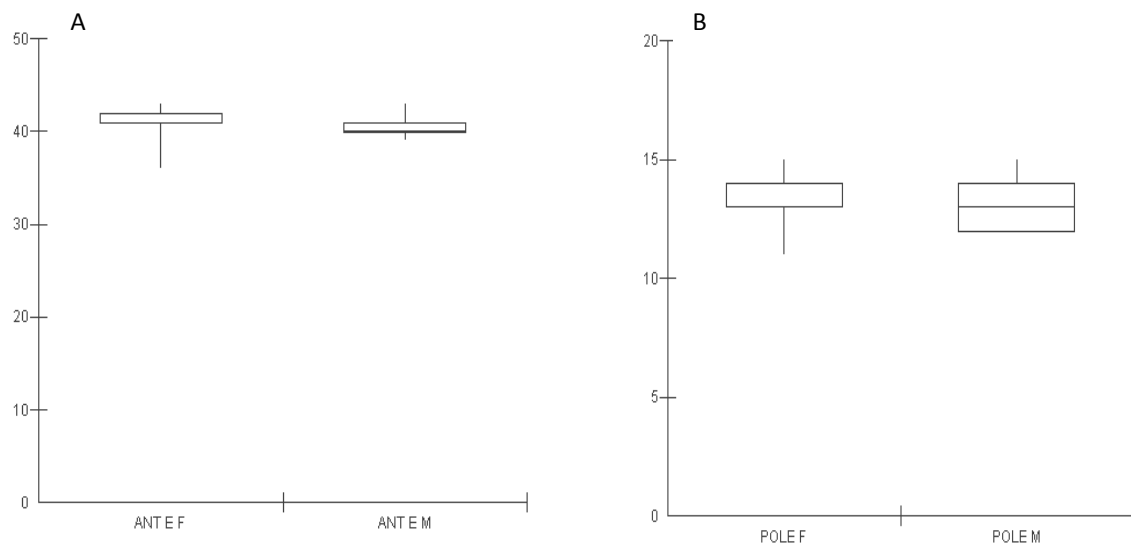
A análise morfológica não mostrou variações significativas no tamanho e coloração dos espécimes e as medidas que diferenciam as espécies, antebraço e tíbia tiveram sobreposição. Antebraço variou de 39 mm a 43,89mm e a tíbia de 17,1mm a 20,62mm

## 4.2 Análises estatísticas

### Análise Univariada

A análise univariada, com as medidas morfométricas e craniométricas, permitiu conhecer os *outliers* mostrando que tais medidas não seriam utilizadas nas análises. Cada medida de machos e fêmeas foi comparada por meio do teste não paramétrico de Mann Whitney ( $U$ ) o mesmo revelou não ser importante analisar machos e fêmeas separadamente, pois não apresentaram dimorfismo sexual quanto as medidas. O teste não paramétrico de Mann Whitney ( $U$ ) mostrou valores de  $P$  não significativos para separação das 39 medidas, os valores de  $P$  variaram de 0,0 Ant D a 0,93 Polegar (Figura 6), seria significativa valores de  $P > 1$ . Quando analisado a amostragem, não mostrou mudanças significativas mesmo mudando o escore de aumento amostral.

**Figura 6.** Teste não paramétrico de Mann Whitney ( $U$ ). Em A variação de medidas entre fêmeas e machos para o Antebraço e em B a variação de medidas para o polegar.



### Análise multivariada

#### Análise Fatorial

Na análise estatística fatorial e de comunalidade foi selecionado as medidas que permaneceriam na análise, o valor 0,7 foi utilizado para a mensuração do grau de significância de cada uma das características trabalhadas a partir do método de rotação por Varimax que redistribuiu as variâncias dos primeiros fatores na busca de um padrão mais simples. Todas as medidas selecionadas pela análise fatorial atenderam a níveis aceitáveis de

explicação, tanto pelas cargas significativas, quanto pela alta comunalidade, ou seja, quantia de variância no compartilhamento com as demais medidas da análise (Tabela 2).

**Tabela 2.** Matriz de análise fatorial com fatores principais de variáveis dos componentes da última rotação com VARIMAX normalizado. Comum = R - quadrado múltiplo) valores amostrados > 0,7

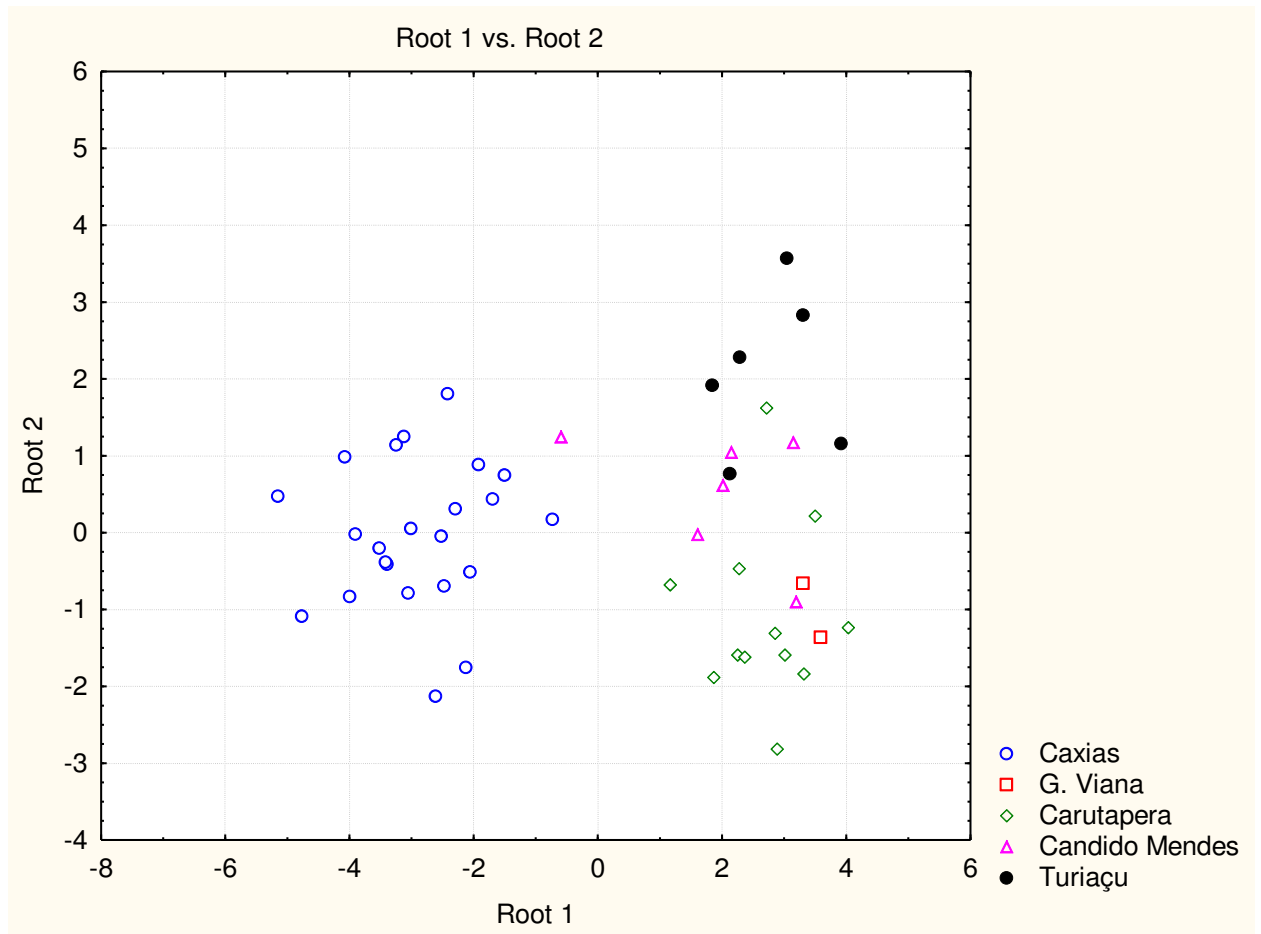
<b>Variável</b>	<b>Fator 1</b>	<b>Fator 2</b>
At. E	0.713928	-
Ant. D	0.756098	-
III Me	0.741788	-
Vme	0.808795	-
B	-	0.746358
Ao	-	0.862219
CC+Inc	-	0.898475
Cca-PMO	-	0.834137
NaFo	-	0.905816
BTPP	-	0.833368
BcCs	-	0.782384
Eigenvalue	7.876531	6.042218
Total variance %	20.72771	15.90057
Cumulative %	20.72771	36.62829

#### *Análise discriminante Canônica*

A discriminação entre a média das variáveis pelo método *Foward Stepwise* foi significativa, com  $\lambda=03570$ ,  $F(16,16) = 27.014$ ;  $p < 0000$ . A medida que mais contribuiu para a discriminação em geral foi  $L_{pt} = 0,155$  e a que menos contribuiu foi  $U. Com. = 0,03$ . Na análise canônica foi calculado as diferenças (ortogonais) das funções discriminantes independentes. Os coeficientes padronizados para variáveis canônicas de determinadas medidas indicam quais características contribuíram para a função discriminante. A primeira função discriminante principal utilizada nessa análise foi a medida Inca com 0.561 na primeira raiz e 3.782 na segunda raiz bem como  $L_p$  com -0.114 e -0.974 na primeira e segunda raiz respectivamente.

Considerando a análise canônica verifica-se nos mapas territoriais de dispersão uma distinção entre as populações analisadas com separação da população de Caxias para as populações de Turiaçu, Cândido Mendes, Carutapera e Godofredo Viana (Figura 7). Observou-se a presença de duas linhagens de *C. perspicillata* considerando as medidas morfométricas e craniométricas. Deste modo, percebe-se que as populações aqui estudadas se comportam de maneira distinta havendo aproximação entre as populações de Turiaçu, Candido Mendes, Carutapera e Godofredo Viana.

**Figura 7.** Escores da função discriminante das populações de *C. perspicillata* no estado do Maranhão.



### 4.3 Análises moleculares

#### Gene COI

#### Identificação da espécie

Um fragmento de 653 pares de bases (pb) do gene Citocromo oxidase subunidade I (COI) do DNA mitocondrial foi sequenciado para 81 espécimes de *Carollia* de dez populações provenientes dos municípios maranhenses, onde 600 sítios foram conservados, 53 variáveis e 26 filogeneticamente informativos para parcimônia. Para a identificação da espécie foi estimado o grau de similaridade das sequências nucleotídicas obtidas no presente trabalho com as sequências depositadas na plataforma BOLDSystems (*The Barcode of Life Data System*). A variação foi menor do que 0,5% (99,51% a 100%) para espécie *C. perspicillata* (Tabela 3).



**Tabela 3.** Similaridade de sequencias obtidas dos espécimes do Maranhão com as disponíveis na plataforma BOLDSystems.

GENBIMOL/ Código	Localidade	Molecular/BOLD	Similaridade (%)
BR2-04	Chapadinha	<i>C. perspicillata</i>	99,67
BR1-3	Chapadinha	<i>C. perspicillata</i>	100
BR1-7	Chapadinha	<i>C. perspicillata</i>	99,67
BR1-8	Chapadinha	<i>C. perspicillata</i>	99,84
BR1-15C	Chapadinha	<i>C. perspicillata</i>	99,68
CESC 124	Caxias	<i>C. perspicillata</i>	100
CESC 119	Caxias	<i>C. perspicillata</i>	100
CESC 134	Caxias	<i>C. perspicillata</i>	99,49
CESC 140	Caxias	<i>C. perspicillata</i>	100
CESC 141	Caxias	<i>C. perspicillata</i>	99,84
CR1-1	Codó	<i>C. perspicillata</i>	99,51
CR1-2	Codó	<i>C. perspicillata</i>	100
CR1-3	Codó	<i>C. perspicillata</i>	99,84
CR1-5	Codó	<i>C. perspicillata</i>	99,35
CR2-1	Codó	<i>C. perspicillata</i>	99,67
EP2-4	Urbano Santos	<i>C. perspicillata</i>	99,51
EP4-2	Urbano Santos	<i>C. perspicillata</i>	99,84
EP4-3	Urbano Santos	<i>C. perspicillata</i>	100
EP4-6	Urbano Santos	<i>C. perspicillata</i>	100
EP	Urbano Santos	<i>C. perspicillata</i>	100
FP8-3	Vargem Grande	<i>C. perspicillata</i>	100
FP8-11	Vargem Grande	<i>C. perspicillata</i>	100
FP8-12	Vargem Grande	<i>C. perspicillata</i>	100
FP8-15	Vargem Grande	<i>C. perspicillata</i>	100
FP8-42	Vargem Grande	<i>C. perspicillata</i>	99,67
MERCK 68	São Luís	<i>C. perspicillata</i>	99,68
MERCK 71	São Luís	<i>C. perspicillata</i>	100
MERCK 73	São Luís	<i>C. perspicillata</i>	99,84
MERCK 60	São Luís	<i>C. perspicillata</i>	100
MERCK 62	São Luís	<i>C. perspicillata</i>	99,84
RRM 09	Godofredo Viana	<i>C. perspicillata</i>	100
RRM 11	Godofredo Viana	<i>C. perspicillata</i>	100
RRM 12	Godofredo Viana	<i>C. perspicillata</i>	100
RRM 24	Godofredo Viana	<i>C. perspicillata</i>	99,84
RRM 115	Godofredo Viana	<i>C. perspicillata</i>	100
RRM 36	Carutapera	<i>C. perspicillata</i>	99,68
RRM 15	Carutapera	<i>C. perspicillata</i>	99,84
RRM 57	Carutapera	<i>C. perspicillata</i>	100
RRM 58	Carutapera	<i>C. perspicillata</i>	100
RRM 63	Carutapera	<i>C. perspicillata</i>	100
RRM 69	Cândido Mendes	<i>C. perspicillata</i>	100
RRM/ 76	Cândido Mendes	<i>C. perspicillata</i>	100
RRM 151	Turiaçu	<i>C. perspicillata</i>	100
RRM 154	Turiaçu	<i>C. perspicillata</i>	99,84
RRM 156	Turiaçu	<i>C. perspicillata</i>	100
RRM 161	Turiaçu	<i>C. perspicillata</i>	99,67
RRM 173	Turiaçu	<i>C. perspicillata</i>	100

A análise do gene COI apresentou 46 haplótipos, diversidade haplotípica de 0,927 e nucleotídica de 0,008. Quando as populações foram analisadas isoladamente observou-se que os maiores valores de diversidade haplotípica ocorreram para as populações de Caxias, Chapadinha, Codó, Carutapera, São Luís e Urbano Santos. Os menores índices de diversidade haplotípica foi encontrado na população de Cândido Mendes. Os testes de neutralidade de D e  $F_s$  não foram significativos, considerando todas as populações agrupadas ou populações isoladas, com  $P$  significativo, isto é,  $0,10 > P > 0,05$  indicando que o polimorfismo está de acordo com o modelo neutro de mutações (Tabela 4)

**Tabela 4.** Diversidade genética com base no gene mitocondrial COI nos espécimes de *C. perspicillata* do estado do Maranhão.

<b>Populações</b>	<b>N</b>	<b>NH</b>	<b>S</b>	<b>h</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b>D de Tajima</b>	<b><math>F_s</math> de Fu</b>
Cândido Mendes	2	1	-	0	0	-	-
Caxias	12	9	16	0,939	0,006	-0,835	-1,108
Carutapera	6	5	11	0,933	0,007	-0,105	-0,345
Chapadinha	12	11	19	0,985	0,007	-0,909	-0,930
Codó	12	11	18	0,985	0,007	-0,702	-0,826
Godofredo Viana	5	3	5	0,700	0,004	1,123	1,220
São Luís	6	5	8	0,933	0,004	-0,735	-0,682
Turiaçu	5	3	7	0,700	0,004	-1,161	1,220
Urbano Santos	8	7	10	0,964	0,004	-1,512	-1,565
Vargem Grande	13	7	11	0,846	0,005	0,051	-0,813
<b>Populações agrupadas</b>	<b>81</b>	<b>46</b>	<b>26</b>	<b>0,927</b>	<b>0,008</b>	<b>-1,679</b>	<b>-3,115</b>

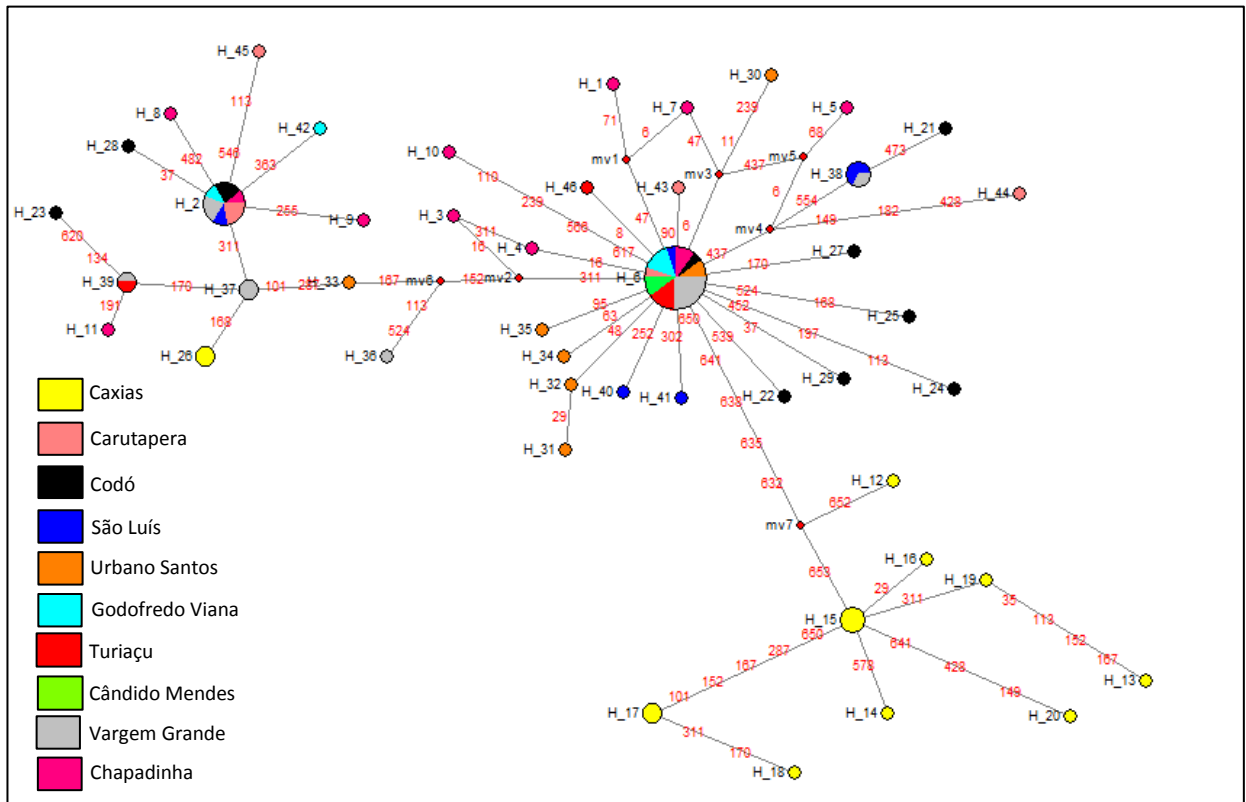
N= número amostral, NH = número de haplótipos, S= sítios polimórficos, h = diversidade haplotípicas e  $\pi$ = diversidade nucleotídica.

Dos 46 haplótipos os mais frequentes foram o haplótipo 6 (H6) observado em todas as populações exceto Caxias e haplótipo 2 (H2) encontrado em São Luís, Godofredo Viana, Chapadinha, Codó, Vargem Grande e Carutapera. Os haplótipos exclusivos foram observados em nove populações, exceto para Cândido Mendes (Tabela 5). Os sítios polimórficos e as substituições mais frequentes são mostrados na tabela 5



A análise dos haplótipos resultou em uma rede que revelou dois haplogrupos, com uma diferenciação para a população de Caxias (Figura 8).

**Figura 8.** Rede de haplótipos com base no gene mitocondrial COI para populações de *C. perspicillata* no estado do Maranhão. Os números representam a posição das mutações que separam os haplótipos e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência com que estes ocorrem nas localidades amostradas.



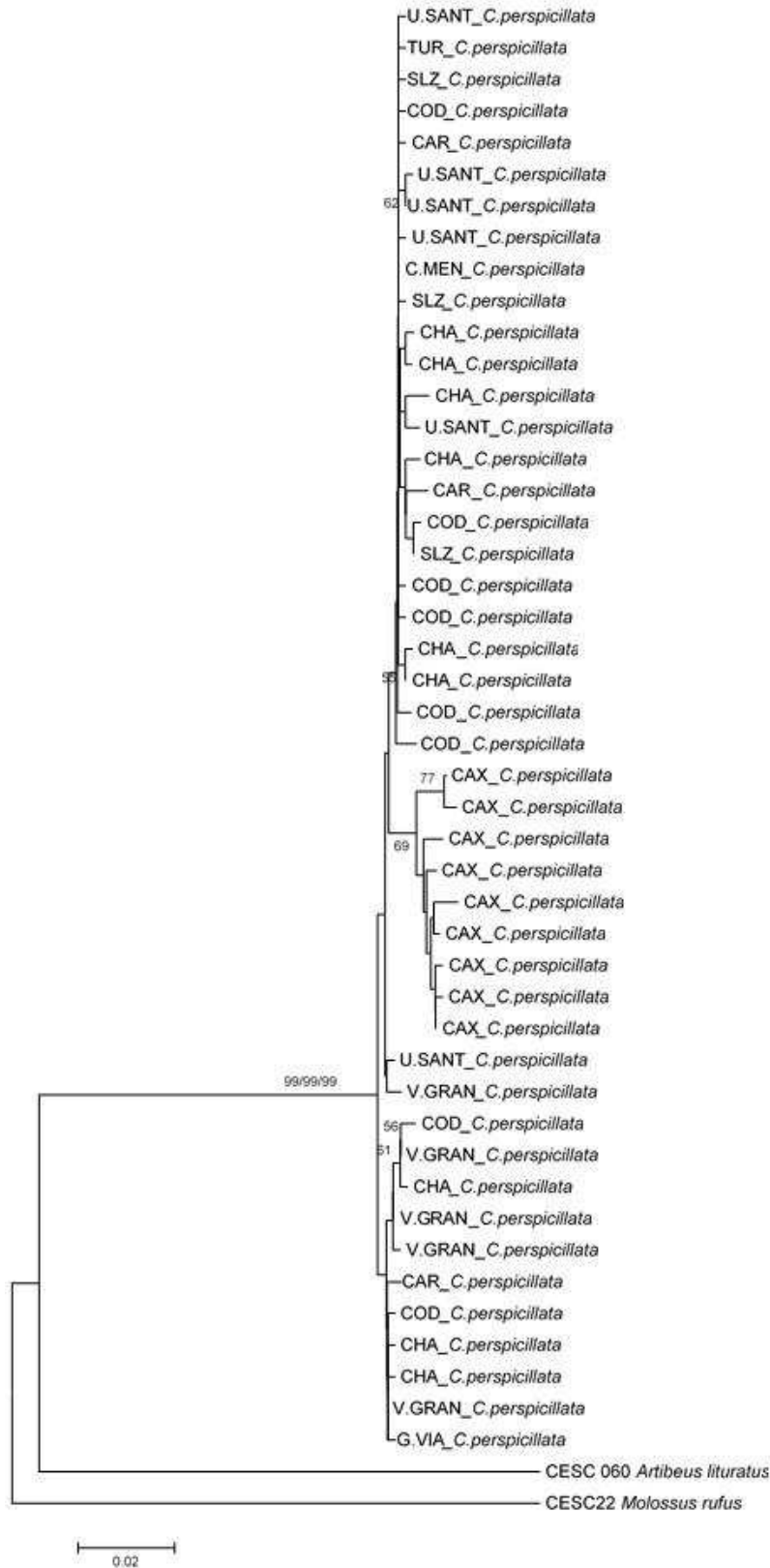
A média da matriz de divergência nucleotídica foi gerada com o algoritmo Kimura 2 parâmetro (K2P). A divergência variou de 0,0 à 1,5%. Quando analisada a média de divergência genética dentro das populações observou-se uma divergência de 0,0% na população de Cândido Mendes, 0,8% em Chapadinha e Codó. Quando comparada à média de divergência genética entre as populações foi encontrado 0,2% entre Cândido Mendes e Urbano Santos; Turiaçu e Cândido Mendes e 1,5% entre Caxias e Chapadinha; Codó e Caxias; Carutapera e Codó; Carutapera e Caxias (Tabela 6).

**Tabela 6.** Percentual médio de divergência nucleotídica gerada para o gene COI nas populações de *C. perspicillata*.

POPULAÇÕES	DIVERGÊNCIA GENÉTICA%									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. Chapadinha	<b>0,8</b>									
2. Caxias	1,5	<b>0,7</b>								
3. Codó	0,8	1,5	<b>0,8</b>							
4. Urbano Santos	0,6	1,4	0,7	<b>0,4</b>						
5. Vargem Grande	0,7	1,4	0,6	0,6	<b>0,6</b>					
6. São Luis	0,6	1,4	0,6	0,5	0,6	<b>0,5</b>				
7. Godofredo Viana	0,6	1,4	0,6	0,5	0,5	0,5	<b>0,4</b>			
8. Carutapera	0,7	1,5	0,7	0,7	0,6	0,6	0,5	<b>0,7</b>		
9. Candido Mendes	0,4	1,2	0,5	0,2	0,4	0,3	0,3	0,5	<b>0,0</b>	
10. Turiaçu	0,6	1,4	0,6	0,4	0,5	0,4	0,4	0,6	0,2	<b>0,4</b>

A construção das árvores filogenéticas pelos métodos Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP), Máxima Likelihood (ML), com o algoritmo Kimura 2 parâmetro para o método de distância genética, mostrou topologias similares para os 46 haplótipos encontrados no estado do Maranhão (Figura 9). As espécie *Molossus rufus* e *Artibeus lituratus* foram utilizadas como grupo externo (outgroup)

**Figura 9.** Árvore filogenética Neighbor-Joining (NJ) com o uso do algoritmo Kimura 2 parâmetro com base no gene mitocondrial COI, observado entre os 41 haplótipos de *C. perspicillata* do Estado do Maranhão. Os valores dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP) e (Máxima Likelihood (ML)) da esquerda para direita. CHA=Chapadinha, SLZ= São Luís,GVIA= Godofredo Viana, CAX=Caxias, CAR=Carutapera, COD=Codó, TUR=Turiaçu, USAN= Urbano Santos, VGRA = Vargem Grande, CMEN = Cândido Mendes.



Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi executada para analisar a diferenciação genética nas populações. Os resultados dos testes de AMOVA mostraram que a maior porcentagem de variação genética ocorreu dentro das populações (72,37%) e constatou-se um  $F_{ST}=0.27630$  com  $P$  significativo  $p < 0,0$  (Tabela 7).

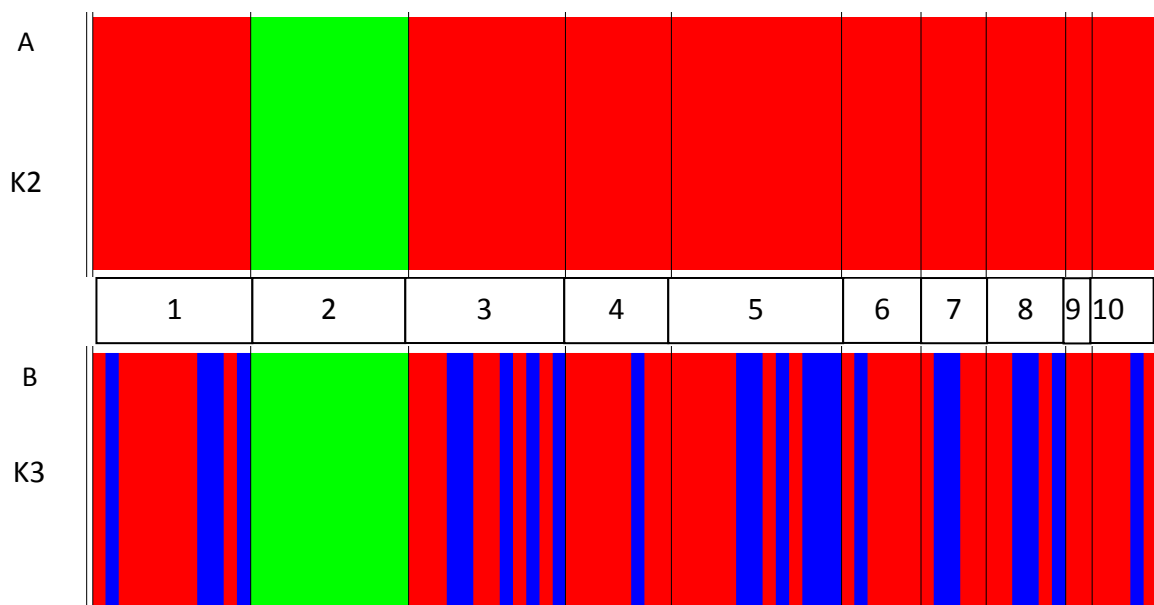
**Tabela 7.** Análise molecular de variância (AMOVA) com base no gene mitocondrial COI nas populações de *C. perspicillata* do estado do Maranhão.

Tipos de Variação	Componentes de Variação	Variação (%)	$F_{ST}$	$P^*$
Entre populações	0.75300 Va	27,63	0.27630	<0,0
Dentro das populações	1.97226 Vb	72,37		

\*Valores de P calculados com 1.023 permutações aleatórias

Na análise bayesiana quando considerado duas populações o k foi igual a dois revelando duas linhagens, com a população de Caxias sendo uma linhagem diferenciada das demais populações que formaram a outra linhagem (Figura 10 A). Quando considerado dez populações o k foi igual a três indicando a ocorrência de três linhagens, com a população de Caxias sendo uma linhagem diferenciada das demais populações que tiveram linhagens compartilhadas, exceto Cândido Mendes (Figura 10B).

**Figura 10.** Análise bayesiana para o gene COI dos espécimes de *C. perspicillata* do estado do Maranhão. 1- Chapadinha, 2 – Caxias, 3 – Codó, 4 – Urbano Santos, 5 – Vargem Grande, 6 – São Luís, 7 – Godofredo Viana, 8 – Carutapera, 9 – Cândido Mendes, 10 – Turiaçu. A largura das faixas representa o número de espécimes em cada população



### Gene rRNA 16S

Um fragmento de 543 pares de bases (pb) do gene RNA ribossomal 16S (rRNA 16S) do DNA mitocondrial foi obtido para 145 espécimes de *C. perspicillata* de dez populações de diferentes municípios do estado do Maranhão. Destes 508 pb foram conservados, 33 variáveis e 17 foram informativos para parcimônia. A análise apresentou 36 haplótipos, diversidade haplotípica (h) de 0,765 e nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,03 (Tabela 8).

Quando analisada isoladamente as populações, observou-se que os maiores valores de diversidade haplotípica ocorreu na população de Carutapera (0,956). Os menores índices de diversidade haplotípica foram constatados nas populações de Cândido Mendes (0,0) e Caxias (0,659). Os testes de neutralidade de D (TAJIMA, 1989) e *F<sub>s</sub>* (FU, 1997) não foram significativos, considerando todas as populações agrupadas ou populações isoladas, com  $P > 0,02$ , indicando que o polimorfismo está de acordo com o modelo neutro de mutações (Tabela 8).

**Tabela 8.** Diversidade genética de *C. perspicillata* do estado do Maranhão com base no gene mitocondrial rRNA 16S

Populações	N	NH	S	h	$\pi$	D de TaJima	FS de Fu
Cândido Mendes	4	1	0	0,0	0,0	-	-
Caxias	28	8	10	0,659	0,003	-1,150	-2,104
Carutapera	10	8	8	0,956	0,004	0,585	-0,834
Chapadinha	17	8	15	0,816	0,005	-1,413	-1,693
Codó	20	5	6	0,695	0,002	-0,618	-1,556
Godofredo Viana	5	3	5	0,700	0,004	0,0	0,0
São Luís	10	6	12	0,867	0,006	-0,801	-1,036
Turiaçu	10	6	7	0,844	0,003	-0,850	-0,628
Urbano Santos	21	9	10	0,824	0,003	-0,920	-1,487
Vargem Grande	20	10	10	0,837	0,004	-0,761	-0,490
<b>Populações agrupadas</b>	<b>145</b>	<b>36</b>	<b>16</b>	<b>0,765</b>	<b>0,003</b>	<b>-2,042</b>	<b>-3,800</b>

N= número amostral, NH = número de haplótipos, S= sítios polimórficos, h = diversidade haplotípicas e  $\pi$ = diversidade nucleotídica.

Dos 36 haplótipos os mais frequentes foram haplótipo1 (H1) compartilhados entre todas as populações, seguido do haplótipo 6 (H6) em Turiaçu, Caxias, Chapadinha, Codó, Urbano Santos, Carutapera, Vargem Grande, Godofredo Viana e São Luís; haplótipo 2 (H2)



em Caxias, Urbano Santos e Turiaçu; haplótipo 8 (H8) em Caxias e Chapadinha e haplótipo 28 (H28) em Urbano Santos e Vargem Grande, os demais haplótipos foram únicos para as populações (Tabela 9).

**Tabela 9.** Haplótipos de *C.perspicillata* com suas respectivas frequências e localidades de coleta com base no gene mitocondrial rRNA 16S.

NH	Sítios Polimórficos	Freq.	População
	1112222333455 5550470248003733 1791839433193147		
H1	CTGCTCTTTTGGTCTG	63	V.GRA,SLZ, CAX, U.SAN, COD, CHA, CRT, C.MEN, G.VIA e TUR
H2	....C..C.....	6	CAX, U.SAN e TUR
H3	....C.....A....	1	CAX
H4	.....C.C..A....	3	CAX
H5	.....C.C.....	1	CAX
H6	.....C.C.....	31	V.GRA,SLZ, CAX, U.SAN, COD, CHA, CRT, G.VIA e TUR
H7	.....TC.C.....	1	CAX
H8	.....C.C.....	2	CAX e CHA
H9	.....C.C...T..	1	COD
H10	.....C.....	1	COD, CRT, U.SAN e V.GRA
H11	.A.T.....T	1	COD
H12	.....A....	2	TUR
H13	.....C.....	1	TUR
H14	.....C.C.....	1	TUR
H15	.....TC.C.A....	1	CAR
H16	.A.....T..	1	CAR
H17	.....C.C.A....	1	CAR
H18	TA.....T	1	CAR
H19	T.....C.....	1	G.VIA
H20	.....C...C...	2	CHA
H21	....C..C.....	1	CHA
H22	.....C.C.....	1	CHA
H23	TAA.....	1	CHA
H24	T.....	1	CHA
H25	T.A.....	1	U.SAN
H26	.....T	1	U.SAN
H27	....C..C.....C.	1	U.SAN
H28	.....C.C...C...	3	U.SAN e V.GRA
H29	.A.....	1	U.SAN
H30	...T.....C.	1	V.GRA
H31	.....	1	V.GRA
H32	.....C.C....CA	1	V.GRA
H33	.....CA	1	V.GRA
H34	T...C..C.....	1	SLZ
H35	TAA...C.CC.A....	1	SLZ
H36	.A.....	1	SLZ

**NH** = número de haplótipos; **Freq** = frequência; **CAX** = Caxias; **V.GRA** = Vargem Grande, **SLZ** = São Luís; **U.SAN** = Urbano Santos; **COD** = Codó; **CHA** = Chapadinha; **CAR** = Carutapera; **G.VIA** = Godofredo Viana; **TUR** = Turiaçu; **C.MEN** = Cândido Mendes.

A média da matriz de divergência nucleotídica foi gerada com o algoritmo Kimura 2 parâmetro (K2P). A divergência variou de 0 à 0,5%. Quando analisada a média de divergência genética dentro das populações observou-se uma divergência de 0,6% e 0,5% em Chapadinha e Carutapera respectivamente. Quando comparada à média de divergência genética entre as populações o menor valor encontrado foi de 0,2% e o maior de 0,5% entre várias populações (Tabela 10).

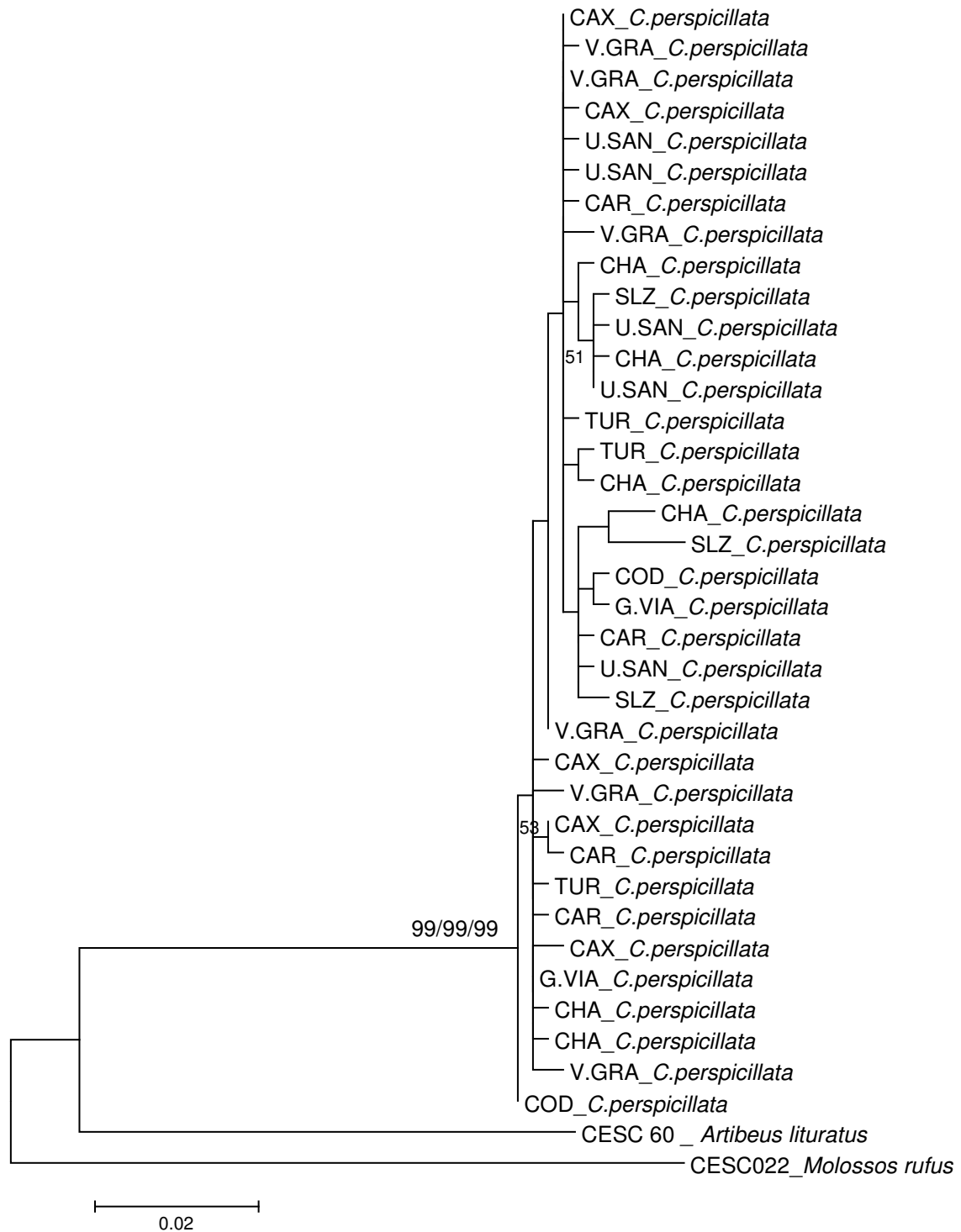
**Tabela 10.** Percentual médio de divergência nucleotídica gerada para o gene rRNA 16S nas populações de *C.perspicillat*

POPULAÇÕES	% DIVERGÊNCIA GENÉTICA									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. Caxias	0,3									
2. Codó	0,2	0,0								
3. Turiaçu	0,3	0,3	0,4							
4. Carutapera	0,4	0,3	0,4	0,5						
5. Candido Mendes	0,3	0,2	0,3	0,4	0,2					
6. Godofredo Viana	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,4				
7. Chapadinha	0,4	0,3	0,5	0,5	0,4	0,4	0,6			
8. Urbano Santos	0,3	0,2	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4		
9. Vargem Grande	0,4	0,2	0,4	0,4	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	
10. São Luís	0,3	0,3	0,4	0,5	0,3	0,3	0,5	0,4	0,4	0,4

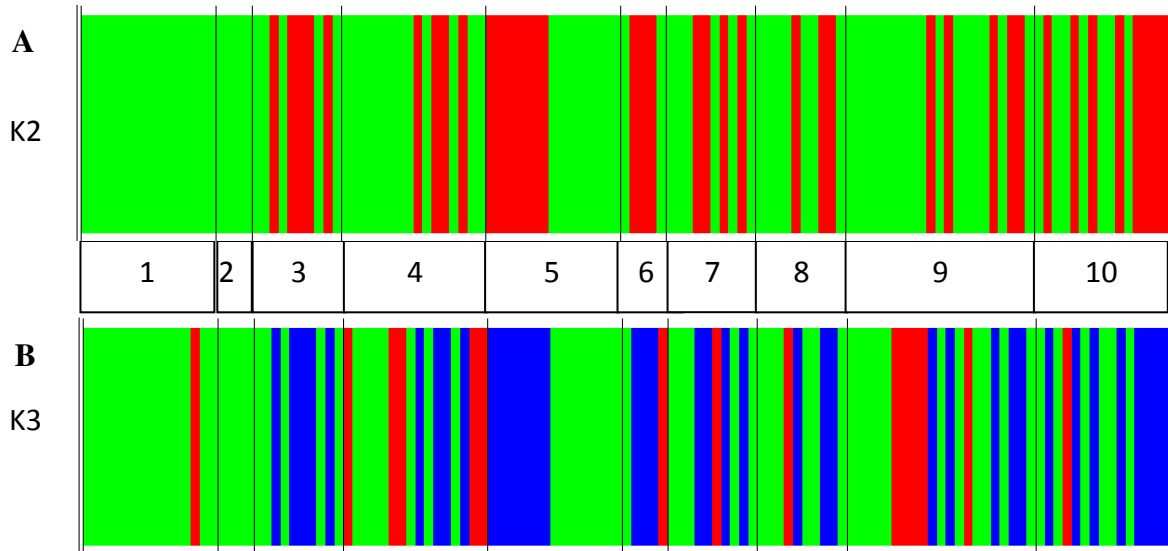
Foram construídas árvores filogenéticas pelos métodos Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP), Máxima Likelihood (ML), com o algoritmo Kimura 2 parâmetro para o método de distância genética mostrou topologias similares para os 36 haplótipos (Figura 11). A espécie *Molossus rufus* e *Artibeus lituratus* foram utilizadas como grupo externo (outgroup)

Na análise bayesiana quando considerado duas populações o k foi igual a dois revelando duas linhagens, com a população de Caxias sendo uma linhagem diferenciada e compartilhada em algumas populações (Figura 12 A). Quando considerado dez populações o k foi igual a três indicando a ocorrência de três linhagens, com a população de Caxias sendo uma linhagem diferenciada, mas compartilhada em algumas populações (Figura 12B).

**Figura 11.** Árvore filogenética Máxima Likelihood com o uso do algoritmo Kimura2parâmetro, com base no gene mitocondrial rRNA 16S de *C. perspicillata*. Os valores dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* (Máxima Likelihood (ML), Neighbor-Joining (NJ) e Máxima Parcimônia (MP)). CHA=Chapadinha, GVIA= Godofredo Viana, CAX=Caxias, CAR=Carutapera, COD=Codó, TUR=Turiaçu, USAN= Urbano Santos, VGRA = Vargem Grande.



**Figura 12.** Análise bayesiana para o gene 16S dos espécimes de *C. perspicillata* do estado do Maranhão. 1 - Caxias, 2 - Cândido Mendes, 3 - Carutapera, 4 - Chapadinha, 5 - Codó, 6 - Godofredo Viana, 7 - São Luís, 8 - Turiaçu, 9 - Urbano Santos, 10 - Vargem Grande. A largura das faixas representa o número de espécimes em cada população



## 5. DISCUSSÃO

### Identificação e Análises Morfométricas e Craniométricas

Na identificação dos espécimes utilizando os dados morfológicos externo descritos na literatura, tais como: tamanho da orelha, disposição das papilas e coloração (SIMMONS, 2005) não houve diferença significativa, bem como nas análises morfométricas em que não mostraram diferença quanto ao tamanho, caracterizando assim a existência de uma única espécie *C. perspicillata*, entretanto nas análises da morfologia craniodentaria mostrou diferenças significativas na disposição interna dos dentes do maxilar superior. Alguns autores como Simmons (2005) e Reis et al (2013) consideram esta característica como capaz de distinguir as espécies *C. perspicillata* e *C. brevicauda*. Reis et al (2013) salienta que em *C. brevicauda* o segundo incisivo é facilmente visualizado, enquanto que em *C. perspicillata* o segundo incisivo é dificilmente visualizado na fileira de dentes superiores. Esta característica no que se refere a fácil e difícil visualização do segundo incisivo foi verificado em várias dos espécimes analisados neste trabalho.

Segundo Simmons (2005), Reis et al. (2011) os espécimes de *C. perspicillata* e *C. brevicauda* distinguem-se também pelo tamanho, onde *C. perspicillata* é maior que *C. brevicauda*. Entretanto segundo Koopman (1994) grandes espécimes de *C. brevicauda*

possuem medidas de pequenos *C. perspicillata* havendo assim ampla sobreposição no tamanho do antebraço entre esses indivíduos. Neste estudo as medidas não alcançaram magnitude suficiente para distinguir essas espécies.

Baker et al. (2002) considera este grupo de *Carollia* como um complexo de espécies, chamando complexo de *C. brevicauda*, em seu estudo ele encontrou uma outra espécie de *Carollia* quando estudava *C. brevicauda*, este ressalta ainda que *C. perspicillata* é um grupo parafiletico com *C. brevicauda* e que mesmo assim, as diferenças entre indivíduos dessa espécie são comumente classificados como sendo *C. perspicillata*.

Os dados aqui apresentados confirmam a dificuldade taxonômica para identificação das espécies de *Carollia* e corroboram com Solari e Baker (2006); Flores Salcedo (2010) onde relatam que taxonomicamente as fronteiras morfológicas das espécies de *Carollia* não foram claramente determinadas, sendo de acordo com esse caractere considerado um complexo de espécies ainda a ser resolvida. Freeman (2000) considera *Carollia* o táxon mais ancestral e menos especializado entre os filostomídeos.

Os dados craniométricos são amplamente utilizados para classificação e mensuração na diferenciação das espécies, estudo realizado por Silva (2016) faz uma classificação na evolução da família Phyllostomidae a partir das medidas crânio facial, o mesmo considerou que a existência de interação entre o hábito alimentar e as medidas de comprimento e largura da maxilar superior estão estritamente relacionadas especialmente para animais frugívoros corroborando com os dados aqui encontrados, uma vez que as medidas do maxilar superior (C-M2/3I) foi uma das variáveis discriminantes utilizadas para mensuração canônica.

Alguns estudos de morfologia craniana em espécie de *Carollia* sugerem que a variação de tamanho é a principal fonte de diferenciação morfológica (FLORES e SALCEDO, 2010; L'ÓPEZ-AGUIRRE, 2015) não há uma delimitação para cada espécie desse gênero quanto aos padrões de variação de forma. Um dos fatores que podem contribuir para a diversificação do tamanho dos espécimes pode ser a distância geográfica, como ocorre também em indivíduos da mesma espécie, fato observado neste estudo.

Para Taddei e Uieda (2001) a variação no tamanho de morcegos em biomas distintos é um evento observado em diversas espécies com amplas faixas de distribuição, fato que parece acontecer também nos espécimes de *C. perspicillata*, uma vez que no gráfico de dispersão canônico os espécimes do Cerrado ficaram separados dos espécimes da Amazônia legal Maranhense corroborando com o trabalho de Jarr'in e Menendez-Guerrero (2011) que relatou que a variação de forma do crânio foi relacionado com as flutuações ambientais, e que a relação foi espécie-específicos e com Pavan et al., (2011) onde estudos evolutivos revelam a

influência da orogenia andina (Colômbia) e da floresta tropical na formação dos processos de diversificação do gênero *Carollia*.

No trabalho de López-Aguirre (2015), em estudo comparativo do crânio e da mandíbula de *Carollia* foi observado que *Carollia castanea* era a espécie mais diferente entre as outras espécies de *Carollia* enquanto que para *C. perspicillata* e *C. brevicauda* houve um padrão bem similar, estes dados corroboram com os encontrados nas análises craniométricas aqui apresentadas, tendo em vista que tanto nas análises univariadas, análise fatorial, análise discriminante e análise canônica não conseguiram separar essas duas espécies, consequentemente, o observado foi um status específico com pelo menos duas linhagens diferentes para os biomas maranhenses Cerrado e Amazônia Legal.

### **Identificação molecular e Análises genética**

Em corroboração com vários estudos da literatura, a identificação morfológica das espécies de *Carollia* de ocorrência nos biomas Cerrado e Amazônia maranhense traz diferenças muito sutis no que se refere a diferenciação das espécies, neste contexto foi considerado um único status específico, mas duas linhagens que se diferenciam de acordo com o bioma estudado. No entanto marcadores moleculares vêm sendo utilizados em diversos estudos como uma ferramenta auxiliar na identificação das espécies de morcegos (FERREIRA et al., 2005; CLARE et al., 2007; MARTINS et al., 2007; MARTINS et al., 2009; CLARE et al., 2011; PAVAN et al., 2013; BAKER et al., 2016; WALKER et al., 2016) neste sentido realizou-se neste trabalho a identificação molecular através dos genes rRNA16S e COI.

Todas as sequências do gene rRNA 16S foram submetidas ao Blast onde foi observado que todas as sequências pertencem a espécie *C. perspicillata*. Para o gene COI, região do DNA *barcoding*, as sequências foram submetidas à plataforma Boldsystems, onde foi revelado uma similaridade acima de 99% com a espécie *C. perspicillata*, a similaridade variou apenas de 99,51% a 100%, evidenciando um único status taxonômico. Esta similaridade foi suficientemente abaixo de 2%, margem de diferenciação de espécies sugerida por Hebert et al., (2004). A identificação das espécies em nível molecular tem se difundido comprovando a eficácia deste marcador, outros estudos com morcegos utilizando o gene COI conseguiram identificá-los ao nível de espécie (CLARE et al., 2011; BAKER et al., 2016; WALKER et al., 2016). De acordo com os dados moleculares os espécimes deste estudo pertencem a um status específico.

O gene rRNA 16S mostrou ser uma ferramenta muito útil, pois sendo um gene espécie-específico é bastante valioso para caracterizar espécies possibilitando estudos comparativos e a determinação dos relacionamentos entre os táxons, como realizado nesse estudo. Baker et al. (2003) conseguiu inferir quanto as relações filogenéticas de morcegos da família Phyllostomidae utilizando entre outros marcadores o gene rRNA 16S corroborando assim com os dados deste estudo, uma vez que o gene em questão foi uma ferramenta eficaz possibilitando caracterizar a espécie *C. perspicillata*.

Marchesin (2006) trabalhando com os genes RAG, rRNA 12S e 16S demonstrou que a espécie *C. perspicillata* foi uma das que mais teve variação genética e que aparentemente as variações não estão relacionadas com a procedência dos espécimes, assim como neste estudo onde a diversidade haplotípica para o gene rRNA 16S foi de 0,765, diversidade esta considerada alta em um limiar que é de até 1, independentemente da localidade de origem. Os resultados da análise das populações agrupadas de *C. perspicillata* com base nos fragmentos gênicos analisados mostrou diversidade haplotípica alta e a diversidade nucleotídica baixa para os espécimes maranhenses, com a ocorrência de vários haplótipos únicos em uma população, corroborando com Dinelli et al. (2013) que analisou a morcegos da espécie *Sturnira lilium* com amostras de vários estados brasileiros.

Clare et al., (2011) em seu estudo, registou apenas uma linhagem para *C. perspicillata*, entretanto, dados da literatura apontam a ocorrência de até quatro linhagens distintas. Nos resultados aqui apresentados, foram encontrados para os genes COI e RNA 16S até três linhagens de *C. perspicillata*. Na rede de haplótipo pode-se observar a formação de haplogrupos, vários compartilhamento de haplótipos e a presença de haplótipos únicos. Segundo Kidd e Ritchie (2006) os haplótipos mais frequentes são mais antigos e geralmente encontram-se no interior da rede e os de menor frequência são os mais recentes e ocupam as extremidades. Analisando a rede formada pode se perceber que há haplótipos presentes em quase todas as populações, então concordando com Kidd e Ritchie (2006) estes serão os mais antigos.

A divergência genética dentro da população para o gene rRNA 16S e COI alcançou 0,6% e 0,8% respectivamente, entre as populações a variação alcançou 0,5% para rRNA 16S e 1,5% para COI, variações estas abaixo de 2% revelando assim tratar-se de um mesmo status taxonômicos corroborando com Bradley e Baker (2001) que afirmam que taxas de divergência genética inferior a 2% indicam variação intraespecífica para quirópteros e mamíferos. Marchesin (2006) em seu estudo cita que *C. perspicillata* foi a espécie que apresentou a maior variação intraespecífica para os genes ribossomais e nuclear, enquanto que

Clare (2007) na identificação dos morcegos tropicais utilizando o COI encontrou valores de divergência interespecífica apenas de 1,2% entre *Carollia perspicillata* e *Carollia brevicauda*. Neste estudo a variação foi de 1,5% se tratando de um mesmo status taxonômico.

O uso de marcadores moleculares mostrou-se adequado e satisfatório para investigação da diversidade genética de *C. perspicillata* nas populações maranhenses. Os resultados encontrados no presente estudo descrevem parcialmente o padrão de distribuição e diferenciação das populações estudadas confirmando a problemática taxonômica existente para o grupo. Esses dados foram reforçados pelos resultados populacionais obtidos tanto pelas diferenças taxonômicas quanto para os marcadores aqui utilizados, onde observou-se pelo índice de fixação (*Fst*) e pelos valores de *p* que não há estruturação para as populações analisadas. De acordo com Wright (1965), valores entre 0 e 0,05 indicam baixo nível de diferenciação genética, valores entre 0,05 e 0,25 indicam diferenciação genética moderada, e acima de 0,25 indicam elevada diferenciação. Os resultados aqui revelados estimam valores de *Fst* elevado (0.27630) com *p* significativo.

Estudos dessa natureza são necessários, uma vez que nem sempre as mudanças ocorridas a nível molecular aparecem na morfologia, o que torna fundamental a associação de estudos genéticos, morfológicos e ecológicos. Os dados de diversidade genética encontrados na presente análise em populações de *C. perspicillata* no estado do Maranhão por meio dos genes COI e rRNA 16S, aliado aos dados morfológicos e craniométricos fornecem informações importantes quanto à diferenciação genética em populações desta espécie e evidenciam a ocorrência de diferentes linhagens nas populações maranhenses.

## 6. CONCLUSÃO

- ✓ As análises morfométricas e moleculares indicaram apenas um status taxonômico: *C. perspicillata*;
- ✓ Na análise canônica foi verificado que as populações do Cerrado e da Amazônia legal maranhense possuem diferenças quanto ao tamanho, havendo uma distinção entre as populações analisadas;
- ✓ Os dados morfológicos, ambientais e a análise molecular apontaram para até três linhagens de *C. perspicillata* no estado maranhense.



## REFERENCIAS

- ARIAS, M. C.; FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais evolutivos de meliponíneos. InG. A. R. Melo ; I. Alves-dos-Santos, Apoidea Neotropical: **Editora UNESC**, Criciúma, 2003.
- AVISE, J. C. Molecular markers, natural history and evolution. **New York: Chapman e Hall**. 1994.
- AYRES, A.; AYRES JR. M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat 5.0**: Aplicação estatística nas Áreas das Ciências Biomédica, 5 ed. Sociedade Civil de Mamirauá, 364 p. Belém, 2007.
- AYRES, C.E.J.; MELO-SANTOS, M.A.V.; PROTA, J.R.M.; SOLÉ-CAVA, A.M.; REGIS, L.; FURTADO, A.F. Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro- and macro geographic levels in Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**. 20: 350- 356. 2004.
- BAKER, R J.; SOLARI, S.; HOFFMANN, F. G. A new Central American species from the *Carollia brevicauda* complex occasional papers. **Museum of texas tech University** 217:1-12, 2002.
- BAKER, R. J.; HOOFER, S. R.; PORTER, C. A.; VAN DENBUSSCHE, R. A.Diversification among New World leafnosed bats: an evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. **Occasional Papers, Museum of Texas Tech University**, 230: 1–32, 2003.
- BAKER,R J.; SOLARI, S.; CIRRANELLO, A.; SIMMONS, N. B. Higher level classification of phyllostomid bats with a summary of DNA Synapomorphies. **Acta Chiropterologica**, 18(1): 1–38, 2016
- BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**16 (1): 37-48, 1999.
- BIANCONI, G. V.; MIKICH, S. B.; PEDRO, W. A. Diversidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em fragmentos florestais do município de Fênix, noroeste do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. n.21, v.4. Curitiba: 2004.
- BRADLEY R.D.; BAKER R.J. A test of the genetic species concept: cytochrome b sequences and mammals. **J Mammal** 82: 960–973, 2001.
- BREDT, A. F. A.; ARAÚJO, F. A.; CARDOSO, M.; SILVA, M. M. S.; HAYASHI, M. M. HARMANI, N. M. S.; MASSUNAGA, P. N. T.; BURER, S. P. PORTO, V. A. R. UIEDA, W. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. **Brasília: mistério da Saúde**. Fundação Nacional de Saúde. 177p. 1996. Obs

- BREDT, A.; UIEDA, W. Bats from urban and rural environments of the Distrito Federal, mid-western Brazil. **Chiroptera Neotropical**. v.2, n.2. Brasília: p.54-57,1996.
- BREDT, A.; UIEDA,W.; PEDRO, W.A.. Plantas e Morcegos, na recuperação de áreas degradadas e na paisagem urbana. Brasília. **Rede de sementes do Cerrado**. 275p,2012.
- BURLAND, T. M.; WILMER, J. M. Seeing in the dark: molecular approaches to the study of the bat populations. **Biological Reviews**, 2001.
- BUSSCHE, R. A. V. D.; HOOFER, S R., Phylogenetic relationships among recent Chiropteran families and the importance of choosing appropriate out-group taxa. **Journal of Mammalogy**, 85(2):321–330, 2004
- CHAVES, P. M. R.; FRANCO, P. A. D.; PEREIRA, V. C. R. Diversidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em gruta de formação calcária localizada na Fazenda Cantinho, *Guimarães e Ferreira Revista Brasileira de Espeleologia – RBEsp*, v. 2, n. 4, 2014 20 município de Formosa – Goiás (GO). **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 1, n. 1, p. 8-28, 2012.
- CLARE, E. L.; LIM, B. K.; ENGSTROM, M. D.; EGER, J. L.; HEBERT, P. D. N. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. **Molecular Ecology Notes** (2007) 7, 184–190.
- CLARE, E. L.; LIM, B.K.; FENTON, M. B.; HEBERT, P. D. N. Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. **PLoS ONE** 6(7), 2011.
- CLOUTIER, D.; THOMAS, D. W., *Carollia perspicillata*. **Mammalian Species**. The American Society of mammalogists. No 417, 1992.
- COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Trends in Genetics**v. 19, n. 7, p. 370-75, 2003.
- CORANDER, J.; MARTTINEN, P.; SIRÉN J, TANG, J. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 539. 2008.
- DINELLI, L.L. Três espécies crípticas em *Sturnira lilium* (Chiroptera:Phyllostomidae): evidências baseadas no genoma mitocondrial.66p. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal do Espírito Santo como requisito Vitória/ES, 2013.
- EMMONS, L.H.; FEER, F. Neotropical Rainforest Mammals. 2 ed. **University of Chicago Press**, Chicago, USA. 380pp, 1997.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin: a software for population data analysis. Version 3.1. Geneva: **University of Geneva**. 2007.
- FABIÁN, M.E.; RUI, A.M. & WAECHTER, J.L. Plantas utilizadas como alimentos por morcegos (Chiroptera, Phyllostomidae), no Brasil. In: Reis N.R., Peracchi A.L., Santos G.A.D. **Ecologia de morcegos**. Londrina. Technical Books, 148p, 2008.

FREEMAN, P. W. Macroevolution in Microchiroptera: Recoupling morphology and ecology with phylogeny. *Mammalogy Papers: University of Nebraska State Museum, Evolutionary Ecology Research*, 2: 317–335, 2000.

FEIJÓ, A. R. A & ALTHOFF, S. New species of *Histiotus* (Chiroptera: Vespertilionidae) from northeastern Brazil, *Zootaxa*.4048(3):412-427, 2015.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. 200. *Evolution*.39: 783-791, 1985.

FENTON, M. B.; RATCLIFFE, J M. Bats. *Current Biology*. Vol 20 No 24, 2010.

FERREIRA, J. M.; MARTINS, F.M.; DITCHFIELD, A.; MORGANTE, J. S. The use of PCR-RFLP as an identification tool for two closely related species of bats of genus *Platyrrhinus*. *Genetics and Molecular Biology*, 2005.

FERRI, M.G. Ecologia dos cerrados. In: FERRI, M.G. In: **Simpósio sobre o cerrado**, 4. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, p.15-33, 1977.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, v.3, n.5, p.294-299. 1994.

GALINDO-GONZÁLEZ, J. Dispersión de semillas por murciélagos: su importancia em la conservación y regeneración del bosque tropical. *Acta Zoologica Mexicana, Nueva Serie*. v.73. Ciudad del Mexico, p.57-74, 1998.

GARDNER, A. L. Feeding habits. In: BAKER, R. J.; JONES JR., J. K.; CARTER, D. C. (Eds.). *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae. Special Publications Museum Texas Tech University*. v.13, Lubbock, 364 p, 1977.

**Governo do Estado do Maranhão**. Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no estado do Maranhão. 2011.

HAIR-JR, F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. E. Análise multivariada de dados. 6 ed. *Artemed*, 688p. 2009.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium*. Serie A. v. 41, p. 95-98. 1999.

HEBERT, P.D.N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. Proceeding of the Royal Society of London. Series B, *Biological Sciences*, v. 270, p. 569-599, 2003.

HOGAN, D. J.; CARMO, R. L.; CUNHA, J. M. P.; BAENINGER, R. (org.). Migração e ambiente no Centro-Oeste. Campinas, **NEPO/UNICAMP: PRONEX**, 324p, 2002.

HUBER, J. Matas e madeiras amazônicas. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*. v.6. n.91. Belém: p.91-225, 1910.

**IBGE.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Malha municipal do Estado do Maranhão. Resolução No 05 de 10 de outubro de 2002.

JANKE, A. et al. The Marsupial Mitochondrial Genome and the Evolution of Placental Mammals. **Genetics**, v.137, p.243-256. 1994.

JARRÍN P, FLORES C, SALCEDO J. Morphological variation in the short-tailed fruit bat (*Carollia*) in Ecuador, with comments on the practical and philosophical aspects of boundaries among species. **Integrative Zoology**5:226–240, 2010.

JARRÍN P.; MENENDEZ-GUERRERO PA. Environmental components and boundaries of morphological variation in the short-tailed fruit bat (*Carollia* spp.) in Ecuador. **ActaChiropterologica**.13:319–340, 2011.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. Belo Horizonte, Megadiversidade, v.1, n. 1, jul. 2005, p. 148-155, 2005.

KOOPMAN, K F. Chiroptera: Systematics. Handbook of Zoology. **Mammalia**, 1994.

KUNZ, T. H.; LUMSDEN, L. F. Ecology of cavity and foliage roosting bats. In: Bat Ecology. THOMAS, H. KUNZ e M. BROCK FENTON (Eds.). **The University of Chicago Press**, Chicago, 2003.

KUNZ, T.H. & FENTON, M.B. Bat ecology. **The University of Chicago Press, Chicago**, 2003.

LÓPEZ-AGUIRRE, C.; PÉREZ-TORRES, J.; WILSON, L. A. B. Cranial and mandibular shape variation in the genus *Carollia* (Mammalia: Chiroptera) from Colombia: biogeographic patterns and morphological modularity. **PeerJ**, 2015.

LOIOLA, M. I. B.; ROQUE, A. A.; OLIVEIRA, A. C. P. Caatinga: Vegetação do semiárido brasileiro. **Ecologi@**, 2012

MARCHESIN, S. R.C. Divergência genética e relacionamento filogenético em espécies de morcegos das famílias Molossidae e Phyllostomidae baseado em análises de PCR-RFLP. **Tese**. São José do Rio Preto – SP, 2006

MARES, M.A.; WILLIG, M.R.; STREILEIN, K.E; LACHER, T.E. 1981. The mammals of northeastern Brazil: a preliminary assessments. **Annals of the Carnegie Museum of natural History**. 50(4): 81-110.

MARQUES, D. K. S. Caracterização genética do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da bacia Tocantins – Araguaia, Estado do Mato Grosso. 2003. 66f. **Tese** (Doutorado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, São Carlos, 2003.

MARTINS, F. M.; DITCHFIELD, A. D.; MEYER, D.; MORGANTE, J. S. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). **J Zool Syst Evol Res** 45(4), 372–378, 2007.

- MARTINS, F.M.; TEMPLETON, A.R.; PAVAN, A.C.O.; KOHLBACH, B.C.; MORGANTE, J. S. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): Marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. **BMC Evolutionary Biology**, 2009.
- MIKICH, S.B. A dieta dos morcegos frugívoros (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) de um pequeno remanescente de Floresta Estacional Semidecidual do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 19(1): 239-249, 2002.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 1999. <http://www.mma.gov.br>
- MUNIZ, F. H. Efeito do manejo florestal sobre a composição florística e fitossociologia da floresta na Amazônia maranhense. In: Marlúcia Bonifácio Martins e Tadeu Gomes de Oliveira (Org.). Amazônia Maranhense: **Diversidade e Conservação**. Belém: MPEG, p.118-140. 2011b.
- MURAKAMI, M.; YAMASHITA, Y.; FUJITANI, H. The complete sequence of Mitochondrial Genome from a Gynogenetic Triploid “Ginbuna” (*Carassius auratus langsdorfi*). **Zoological Science of Japan**. 15: p. 335-337. 1998.
- NAEGELE, M. P.; DA COSTA, P. I.; ROSA, J. A. DA .Polymorphism of the ITS-2 region of the Ribosomal DNA of the Triatominae *Rhodnius domesticus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali*. **Medical and Veterinary Entomology** v. 20, n. 4, p. 353–357, 2006.
- NOGUEIRA, M. R., et al., Checklist of Brazilian bats, with comments of original records. **Check list**, 2014.
- NOWAK, R.M. Walker’s Mammals of the World. *Vol. 1*. **Johns Hopkins University Press**, London, USA., 5th ed. 642pp, 1991.
- NOWAK, R.M. Walker's bats of the World. **Johns Hopkins University Press**. 287p, 1994.
- OLIVEIRA, J. A.; CRISPIM, B. A.; MARTINS, N. M.; SILVA, A. O.; DOURADO, P. L. R.; ROCHA, M. P.; GRISOLIA, A. B. Mitochondrial gene sequences for identification of animal species. **Rev. Colombiana cienc. Anim.** 5(2):396-407, 2013
- PAGLIA A. P., et al., Mittermeier Ra and Patton JI. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / **Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2ª Edição / 2nd Edition**. Occasional Papers in Conservation Biology, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. 76p, 2012.
- PALUMBI, S.; MARTIN, A.; ROMANO, S.; MCMILLAN; W. O.; STICE, L.; GRBOWSKI, G. The simple fool’s guide to PCR, v. 2.0. **University of Hawaii**, Honolulu, 1991.
- PAVAN, A. C.; MARTINS, F. M.; MORGANTE, J. S. Evolutionary history of bulldog bats (genus *Noctilio*): recent diversification and the role of the Caribbean in Neotropical biogeography. **Biological Journal of the Linnean Society**, 108, 210–224, 2013.

- PAVAN, A.C.; MARTINS F.; SANTOS, F.R. Patterns of diversification in two species of short-tailed bats (*Carollia* Gray, 1838): the effects of historical fragmentation of Brazilian rainforests. **Biological Journal of the Linnean Society**. 102:527–539, 2011.
- PERACCHI AL, LIMA IP, REIS NR, NOGUEIRA MR ANDORTÊNCIO-FILHO H. Ordem Chiroptera. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA and Lima IP. **Mamíferos do Brasil**, Londrina, p.162-200, 2011.
- PEREIRA, C. B.; ALVIM, M. C. M. Manual para estudos craniométricos e cranioscópicos. **Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico**. Universidade Federal de Santa Maria, 2006.
- PEREZ-NETO P. R. Introdução a análises morfométricas. **A Ecologia Brasiliensis**, 2: 57-89p. 1995.
- REIS, N. R; PERACCHI, A. L; FREGONEZI, et al. Morcegos do Brasil: Guia de Campo. Rio de Janeiro: **Technical Books**, 2013.
- REIS, N.R., PERACCHI, A.L., PEDRO, W.A. & LIMA, I.P. **Mamíferos do Brasil**. 2 ed. Londrina, 2011.
- RICARDO, M.C.C.; UIEDA, W.; FONSECA, R.C.B. & ROSSI, M.N. Frugivory and the effects of ingestion by bats on the seed germination of three pioneering plants. **Acta Oecologica**. 55: 51-57. 2014.
- ROZAS, J.; SANCHEZ-DELBARRIO, J.C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DNA Polymorphism 220 analyses by coalescent and order methods. **Bioinformatics**. 19: 2496-2497, 2003.
- SANGER, F.; NICHLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 74, p. 5463-5468, 1977.
- SAWYER, D. População, meio ambiente e desenvolvimento sustentável no cerrado. In: HOGAN, D. J.; CARMO, R. L.; CUNHA, J. M. P.; BAENINGER, R. (org.). Migração e ambiente no Centro-Oeste. Campinas, **NEPO/UNICAMP: PRONEX**, p. 279-299, 2002.
- SCHNEIDER, C. H. Análise da variabilidade genética do peixe ornamental *Carnegiella strigata* (Characiformes, Gasteropelecidae) de três rios de água preta da Amazônia central. 2007. 72f. **Tese** (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais)- Universidade Federal do Manaus, Amazonas. 2007.
- SCHNEIDER, M. Mastofauna: Os mamíferos e suas associações com as fitofisionomias do cerrado. Uma abordagem de ecologia da paisagem para avaliação da perda de habitats. In: Alho, C.J.R. (Org). Fauna silvestre da região do rio Manso, **MT. Edições IBAMA e ELETRONORTE**, p. 217-267, 2000.

- SILVA, T. F. Diversificação craniofacial em morcegos filostomídeos: um estudo de associação genótipofenótipo através do gene RUNX2. **Dissertação**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2016
- SIMMONS NB Mammal species of the world: A Taxonomic and geographic reference. Baltimore, **The Johns Hopkins University**. Press, 3<sup>a</sup>ed, v1, 312-529, 2005.
- SOLARI S, BAKER RJ. Mitochondrial DNA sequence, karyotypic and morphological variation in the *Carollia castanea* species complex (Chiroptera: Phyllostomidae) with description of a new species. **Occasional Papers**. The Museum of Texas Tech University 254: 1–16, 2006.
- SOLARI, S.; V. MARTINEZ-ARIAS. Cambios recientes em la sistemática y taxonomía de murciélagos Neotropicales (Mammalia: Chiroptera). **Therya**, 5: 167–196, 2014.
- STÜPP DE SOUZA, D. A. Análise morfométrica de *Molossus molossus* (Chiroptera, Molossidae) no extremo sul do Brasil. **Monografia**, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2008.
- TADDEI, V. A.; and UIEDA, W. Distribution and morphometrics of *Natalus stramineus* from South America (Chiroptera, Natalidae). **Iheringia, Série Zoologia** 91:123-132, 2001.
- TAMURA, K; STECHER, G; PETERSON, D; FILIPSKI, A; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.:30, p. 2725-2729. 2013.
- VALOIS, A.C.C. Benefícios e estratégias de utilização sustentável da Amazônia. - Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 75 p, 2003.
- WALKER, F.M.; WILLIAMSON, C. H. D.; SANCHEZ, D. E.; SOBEK, C. J.; CHAMBERS, C. L. Species from feces: order-wide identification of Chiroptera from Guano and Other non-invasive Genetic Samples. **PLoS ONE** 11(9), 2016.
- WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Eds.). Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference. 3.ed. v.1. **Baltimore: Johns Hopkins University Press**, 2181p, 2005.
- XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. J. 234 **Hered.** 92: 371-37, 2001.

## ANEXO



## ANEXO I

### Extração de DNA

#### Protocolo de extração de DNA kit PROMEGA

O protocolo foi adaptado para microtubos de 1,5 ml contendo as seguintes etapas:

- ✓ Retirou-se um fragmento de 20mg tecido e colocou em um microtubo de 1,5 ml;
- ✓ Preparou-se uma solução composta de EDTA (60 µl) e Nuclei Lysis Solution (250 µl), foi feita em quantidade proporcional as amostras;
- ✓ Misturou-se a solução manualmente;
- ✓ Levou-se a solução ao freezer por 5 minutos (proporcional à quantidade dos reagentes), tomando-se o cuidado para não congelar;
- ✓ Para cada µl de cada amostra, usou-se 300 µl da solução preparada para cada um dos tubos;
- ✓ Colocou-se 15 µl de proteinase K e deixou-se as amostras em banho Maria a 65° C até degradar todo o tecido (mais ou menos três horas, dependendo do tipo de tecido);
- ✓ Adicionou-se 10 µl de RNase e levou-se os tubos à estufa a 37° C por 30 minutos;
- ✓ Após retirar as amostras da estufa adicionou-se 150 µl do reagente Protein Precipitation.
- ✓ Agitou-se delicadamente os tubos;
- ✓ Agitou-se no vórtex para garantir a homogeneização dos reagentes;
- ✓ Colocou-se no freezer por cinco minutos, tomando o cuidado para não congelar;
- ✓ Centrifugou-se por 10 min. a 15.000 rpm;
- ✓ Adicionou-se 600 µl de isopropanol (para precipitar o DNA) em um novo tubo.
- ✓ Retirou-se o tubo da centrífuga e retirou-se o sobrenadante; colocando-o junto com isopropanol;
- ✓ Agitou-se (homogeneizou-se) gentilmente os tubos;
- ✓ Centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm;
- ✓ Descartou-se o isopropanol e colocou-se o tubo em papel absorvente;
- ✓ Em seguida adicionou-se 500 µl de álcool 70% aos tubos e agitou-se gentilmente para visualizar-se o pellet de DNA;
- ✓ Centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm;
- ✓ Descartou-se o álcool;
- ✓ Submeteu-se as amostras a um spin;
- ✓ Retirou-se o excesso de álcool com a ponteira branca, tomando cuidado para não remover o pellet;

- ✓ Colocou-se o tubo aberto na estufa por 10 minutos;
- ✓ Colocou-se 50  $\mu\text{l}$  de solução DNA rehydratation ou TE;
- ✓ O DNA foi visualizado por meio de um sistema de eletroforese em gel de agarose a 1% em uma proporção de 3  $\mu\text{l}$  do tampão (azul de bromofenol e xilenocianol). A concentração do DNA extraído também foi analisado através de quantificação no espectrofômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

### **Amplificação Gênica (PCR)**

Para o isolamento e amplificação de fragmentos gênicos do DNA mitocondrial empregou-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) conforme protocolo a baixo

- 4 $\mu\text{L}$  de DNTPs (1,25 M) (nucleotídeos);
- 2,5  $\mu\text{L}$  de solução tampão (10X);
- 0,5  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM);
- 1  $\mu\text{L}$  de DNA (250 ng/  $\mu\text{L}$ );
- 0,25  $\mu\text{L}$  de cada primer (200 ng/  $\mu\text{L}$ );
- 0,2  $\mu\text{L}$  da enzima Taq polimerase (5U/  $\mu\text{L}$ );
- Água ultra pura para completar o volume final de 25  $\mu\text{L}$ .

### **Sequenciamento de DNA e precipitação**

Os produtos de PCRs purificados, com o KIT EXOSAP IT conforme fabricante, foram submetidos à reação de sequência pelo método de Sanger et al. (1977) com os seguintes reagentes e parâmetros:

- 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ ;
- 1,5  $\mu\text{L}$  de Buffer;
- 2  $\mu\text{L}$  de Primer (0,8 pmol/ $\mu\text{L}$ );
- 1,5  $\mu\text{L}$  de DNA;
- 1  $\mu\text{L}$  de Big Dye;

Uma temperatura inicial de 96° C por 1 minuto, 35 ciclos com 96° C por 15 segundos, 50° C por 15 segundos e 60° C por 4 minutos.

Os produtos da reação de sequência foram precipitados seguindo as etapas abaixo:

- Submeteu-se a placa a um spin (centrífuga de placa);

- Adicionou-se 2,5 µL de EDTA (125 mM);
- Vedou-se a placa e submeteu-se a um spin;
- Adicionou-se 30 µL de Etanol 100%;
- Vedou-se a placa e misturou-se invertendo 4-5x;
- Envolveu-se a placa em papel alumínio e deixou-se em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos (centrífuga refrigerada 4° C);
- Centrifugou-se a 4.000 rpm por 30 minutos;
- Inverteu-se bruscamente a placa para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente;
- Centrifugou-se a placa invertida por 15s a 1.150 rpm;
- Adicionou-se 30 µL de Etanol a 70%;
- Vedou-se a placa;
- Centrifugou-se a 3.440 rpm por 15 s (centrífuga refrigerada 4° C);
- Inverteu-se bruscamente para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente;
- Centrifugou-se a placa invertida por 1 minuto a 1.150 rpm;
- Deixou-se a placa na estufa a 37° C por aproximadamente 10 minutos para evaporar o excesso de álcool;
- Colocou-se Formamida (10µL) e levou-se a placa a 94° C por cerca de 3 minutos e colocou-se a placa no sequenciador automático de DNA (ABI 3500/Life Technologies) onde ocorreu a eletroforese.