



Uema
UNIVERSIDADE ESTADUAL
DO MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE BACABAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO

JOSENIRA DOS SANTOS DE SOUSA CLARENTINO

**MARCADORES MOLECULARES UTILIZADOS EM ESTUDOS NA
QUIROPTEROFAUNA (MAMMALIA: CHIROPETRA) BRASILEIRA**

Bacabal
2023

JOSENIRA DOS SANTOS DE SOUSA CLARENTINO

**MARCADORES MOLECULARES UTILIZADOS EM ESTUDOS NA
QUIROPTEROFAUNA (MAMMALIA: CHIROPTERA) BRASILEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada
ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado -
Universidade Estadual do Maranhão UEMA),
campus Bacabal, para a obtenção do grau de
Bacharel.

Orientador: Prof. Me. Raimundo Gierdson
Abreu Macedo.

Bacabal

2023

C583m Clarentino, Josenira dos Santos de Sousa.

Marcadores moleculares utilizados em estudos na quiroptero fauna (Mammalia: Chiroptera) brasileira / Josenira dos Santos de Sousa Clarentino– Bacabal-MA, 2023.

00 f: il.

Monografia (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas Bacharelado, Universidade Estadual do Maranhão-UEMA/ Campus Bacabal-MA, 2023.

Orientador: Prof^o. Me. Raimundo Gierdson Abreu Macedo

1. Genética 2. Quirópteros 3. Marcadores Moleculares.

CDU: 599.4: 591.1

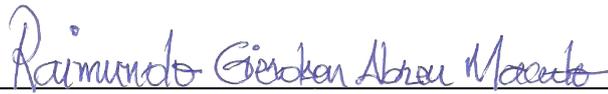
JOSENIRA DOS SANTOS DE SOUSA CLARENTINO

**MARCADORES MOLECULARES UTILIZADOS EM ESTUDOS NA
QUIROPTEROFAUNA (MAMMALIA: CHIROPTERA) BRASILEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada
ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado -
Universidade Estadual do Maranhão UEMA),
campus Bacabal, para a obtenção do grau de
Bacharel.

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA



Prof. Me. Raimundo Gierdson Abreu Macedo (Orientador)

Mestre em Biodiversidade Ambiente e Saúde

Universidade Estadual do Maranhão



Prof. Dr. Odgley Quixaba Viana

Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia

Universidade Estadual do Maranhão



Prof. Dr. Ricardo Oliveira Rocha

Doutor em Educação

Universidade Vale do Rio do Sinos

Dedico ao meu Aba, em quem descobri o verdadeiro amor, cuidado e proteção. Somente Ele, em Sua Trindade, me susteve até aqui, e fez-me capaz de compreender o processo da Vida. Aos meus pais José Correia e Deusanira Brandão, por todo amor e suporte, e por todo ensinamento adquirido no âmbito familiar.

AGRADECIMENTOS

Eternizo minha gratidão ao meu melhor amigo, intercessor e consolador Espírito Santo. Sem Ele esta fase não seria conclusa.

Gratidão aos meus pais, esposo, irmã, cunhado, amigos, professores, orientador, pastores e discipuladora por terem caminhado comigo até aqui. É com o coração grato que encerro este ciclo junto a vocês.

Sabemos que Deus age em todas as coisas para o bem daqueles o amam, dos que foram chamados de acordo com seu propósito.

Livro de Romanos 8:28 (NVI)

RESUMO

As técnicas de marcadores moleculares ganharam bastante visibilidade nos últimos anos, auxiliando diversos pesquisadores taxonomistas em uma classificação mais coerente dos seres vivos, considerando-se o grau de parentesco evolutivo. A aplicação de marcadores moleculares na pesquisa de Chiroptera, que compreende os morcegos, revela-se uma ferramenta valiosa para estudos taxonômicos, genéticos e ecológicos. A diversidade genética entre as espécies de morcegos pode ser elucidada por meio da análise de marcadores moleculares como sequências de DNA mitocondrial e nuclear, permitindo uma compreensão mais profunda das relações filogenéticas e padrões evolutivos dentro deste grupo. O principal objetivo desta pesquisa consiste em comparar os principais tipos de marcadores moleculares utilizados em estudos na quiropterofauna Brasileira. Os objetivos específicos se concentram em descrever a evolução do processo histórico dos marcadores moleculares. Identificar os principais tipos de marcadores moleculares utilizados em estudos na Quiropterofauna e caracterizar os marcadores moleculares. Para alcançar os objetivos propostos o presente estudo caracteriza-se como exploratório, de natureza qualitativo, delineado por pesquisas bibliográficas, fundado sobre pesquisas já publicadas, tendo como filtro palavras chaves: Estudos moleculares; *Chiroptera* molecular; Marcadores *Chiroptera*; Identificação molecular morcegos; morcegos moleculares Brasil; genética morcegos; molecular *bats*. Ainda, foram utilizados caracteres de truncamento para melhor resultado nas pesquisas, tais como: asteriscos (*); hífen (-) e aspas (“). A pesquisa consiste em artigos, teses dissertações entre os anos de 2012 a 2022, sendo limitado a pesquisas realizadas no Brasil. Apesar da vasta diversidade de morcegos no Brasil, os dados sobre esses mamíferos carecem de melhor visibilidade no meio científico. Com o surgimento das técnicas de marcadores moleculares em conjuntos com outras áreas de estudo, surge uma ferramenta capaz de revelar informações genéticas cruciais para a compreensão da variabilidade populacional e evolutiva, que vão muito além da taxidermia correta em termos de parentesco evolutivo.

Palavras-chave: genética; quirópteros; marcadores moleculares.

ABSTRACT

The techniques of molecular markers have gained considerable visibility in recent years, assisting various taxonomist researchers in a more coherent classification of living beings, considering the degree of evolutionary relatedness. The application of molecular markers in the research of Chiroptera, which includes bats, proves to be a valuable tool for taxonomic, genetic and ecological studies. The genetic diversity among bat species can be elucidated through the analysis of molecular markers such as mitochondrial and nuclear DNA sequences, allowing a deeper understanding of phylogenetic relationships and evolutionary patterns within this group. The main objective of this research is to compare the main types of molecular markers used in studies on Brazilian chiropterofauna. The specific objectives focus on describing the evolution of the historical process of molecular markers, identifying the main types of molecular markers used in chiropterofauna studies, and characterizing the molecular markers. To achieve the proposed objectives, the present study is characterized as exploratory, qualitative in nature, outlined by bibliographic research, based on previously published research, with keywords such as Molecular Studies, Chiroptera Molecular, Chiroptera Markers, Molecular Bat Identification, Molecular Bats Brazil, Bat Genetics, and Molecular Bats used as filters. Truncation characters, such as asterisks (*), hyphens (-), and quotation marks ("), were also used for better results in searches. The research includes articles, theses, and dissertations from the years 2012 to 2022, limited to studies conducted in Brazil. Despite the vast diversity of bats in Brazil, data on these mammals lack better visibility in the scientific community. With the emergence of molecular marker techniques in conjunction with other areas of study, a tool capable of revealing crucial genetic information for understanding population and evolutionary variability has arisen, going far beyond correct taxidermy in terms of evolutionary relatedness.

Keywords: genetic; chiroptera; molecular markers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1: Filogenia da ordem Chiroptera baseados em caracteres moleculares | 16 |
| Figura 2: Esquema representativo do processo de seleção dos estudos | 29 |
| Gráfico 1: Divisão geral dos Marcadores Genéticos | 21 |
| Gráfico 2: Quantitativo de trabalhos publicados por ano | 30 |

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Marcadores Moleculares Identificados em Estudos na Quiropterofauna Brasileira

33

LISTA DE SIGLAS

AFLP - Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos Amplificados

BDTD - Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Citb - Citocromo b

COI - Citocromo Oxidase da Subunidade I

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EcoRI/MseI - Nucleases de Restrição

ISSR - Inter Repetições de Sequências Simples

mDNA - Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial

nDNA - Ácido Desoxirribonucleico Nuclear

PB - Pares de Bases

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RAG2 - Gene Ativador de Recombinação

RAPD - Amplificação Aleatória do DNA Polimórfico

RFLP - Polimorfismos de Comprimento de Fragmento de Restrição

RNA - Ácido Ribonucleico

rRNA - RNA ribossômico

SCAR - Regiões Amplificadas Caracterizadas por Sequências

SSR - Repetições de Sequências Simples

STS - Sites Marcados em Sequência

VNTR - Minissatélites ou Repetições Tandem de Número Variáveis

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 OBJETIVOS | 12 |
| 2.1 Geral | 12 |
| 2.2 Específicos | 12 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO | 13 |
| 3.1 Características gerais da Ordem Chiroptera | 13 |
| 3.2 Estudos Moleculares | 16 |
| 3.2.1 Estudos Moleculares na Quiropterofauna | 17 |
| 3.3 Principais Marcadores Moleculares | 18 |
| 3.3.1 Modelos Baseados em Hibridização | 19 |
| 3.3.1.1 Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição | 19 |
| 3.3.1.2 Minissatélites ou Repetições Tandem de Número Variáveis (VNTR) | 20 |
| 3.3.2 Modelos Baseados por amplificação de DNA em PCR | 21 |
| 3.3.2.1 Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase | 21 |
| 3.3.2.2 Amplificação Aleatória do DNA Polimórfico (RAPD) | 21 |
| 3.3.2.3 Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos Amplificados | 22 |
| 3.3.2.4 Microssatélites Simples ou Sequências Repetidas | 23 |
| 3.4 Aplicação dos Marcadores Moleculares na ordem Chiroptera | 24 |
| 3.4.1 DNA mitocondrial | 25 |
| 3.4.1 DNA nuclear | 25 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 26 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 32 |
| REFERÊNCIAS | 33 |

1 INTRODUÇÃO

A ordem Chiroptera ocupa o segundo lugar dentre os mamíferos em termos de distribuição de indivíduos, superada apenas pelos primatas. Com aproximadamente 1450 espécies (Simmons; Cirranelo, 2022) e 17 famílias (Boldsystems, 2023) conhecidas mundialmente, exceto na Antártica, os morcegos representam em torno de 25% da diversidade de todos os mamíferos (Kuzmin *et al.*, 2012).

Os morcegos são os únicos mamíferos com capacidade de voo verdadeiro (Pereira, 2022). Em seu histórico evolutivo, a característica de voo permitiu aos morcegos ganhar um maior número de habitats, favorecendo a grande diversificação deste grupo (Cooper e Sears, 2013) tal como sua distribuição geográfica (Pereira, 2022). Por outro lado, esta capacidade de voo exige um alto gasto energético, e o poder de locomoção demanda que, provavelmente, os genes envolvidos no metabolismo dos morcegos tenham sofrido adaptações evolutivas levando-os a alcançar maiores habitats (Shen *et al.*, 2010; Meganathan *et al.*, 2012).

Com o avanço genético de populações, surge então, o conceito de utilização de genes individuais como marcadores, a fim de fazer alusão sobre as características de uma população, tomando como exemplo a seleção genética. A possibilidade de analisar a segregação de genes marcadores, para localizar e estimular o efeito de poligênese que controlam características de interesse para o melhoramento das espécies, fomentou ainda mais o estudo de marcadores (Regitano, 2001).

Marcadores genéticos são características exclusiva da herança mendeliana, chegando a uma conclusão que, o genótipo parte do fenótipo, possibilitando que a separação do gene marcador seja acompanhada, representando assim, uma marca genética em constante reprodução. Para Regitano (2001), a análise de uma segregação requer a existência de pelo menos duas formas alélicas, ou seja, a existência de polimorfismo no loco marcador.

Estudos moleculares, de maneira geral, caracterizam a variabilidade genética de um organismo, espécie ou população, constituindo-se assim um instrumento importante na investigação por ecólogos e sistematas, de aspectos relativos a afinidades e limites entre espécies, na estimativa de níveis de migração e dispersão das populações entre outros (Hoffmann e Willi, 2008; Clare; Lim; Fenton e Hebert, 2011). Estes, têm sido de suma importância para a investigação de estrutura das populações, esclarecendo questões como fluxo gênico em populações naturais, dispersão e filogenia.

Com base nas informações obtidas dos marcadores moleculares, diversos estudos são conduzidos a saber, mapeamento de ligação do genoma, teste de identidade de cultivares,

determinação da relação de parentesco e da variação genética, análise de populações e de pedigree, localização de loco para doenças e epidemiologia. Há ainda, o genoma nuclear, sendo o Gene Ativador de Recombinação (RAG-2) o mais utilizado. Atua em conjunto com o RAG1, nos quais são subunidades da enzima recombinase, sucedendo o reconhecimento e quebra das sequências sinais de recombinação (Salomon, 2016; Baker; Patton; Parter e Van Den Bussche, 2000).

O conhecimento de características genéticas, citogenéticas, moleculares, ecológicas e de comportamento dos quirópteros têm ajudado a substanciar hipóteses de relacionamento evolutivo, formuladas com base em considerações filogenéticas (Baker, *et al.*, 1989; Freeman, 2000; Silva, 2016). Entretanto, a diversidade genética de uma espécie evolui no tempo em função das modificações do ambiente, sempre sendo alimentada pelo surgimento de novas mutações e da recombinação previamente existentes (Albagli, 1998; Diniz, 2002).

Diante do exposto, mostra-se importante um estudo que compare os principais tipos de marcadores moleculares utilizados em estudos na quiropterofauna brasileira, relacionando cada tipo de marcador molecular com o seu objetivo de utilização.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar os principais tipos de marcadores moleculares utilizados em estudos na Quiropterofauna.

2.2 Específicos

- Descrever a evolução do processo histórico dos marcadores moleculares;
- Padronizar os marcadores moleculares utilizados em estudos na quiropterofauna Brasileira;
- Caracterizar os marcadores moleculares.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características gerais da Ordem Chiroptera

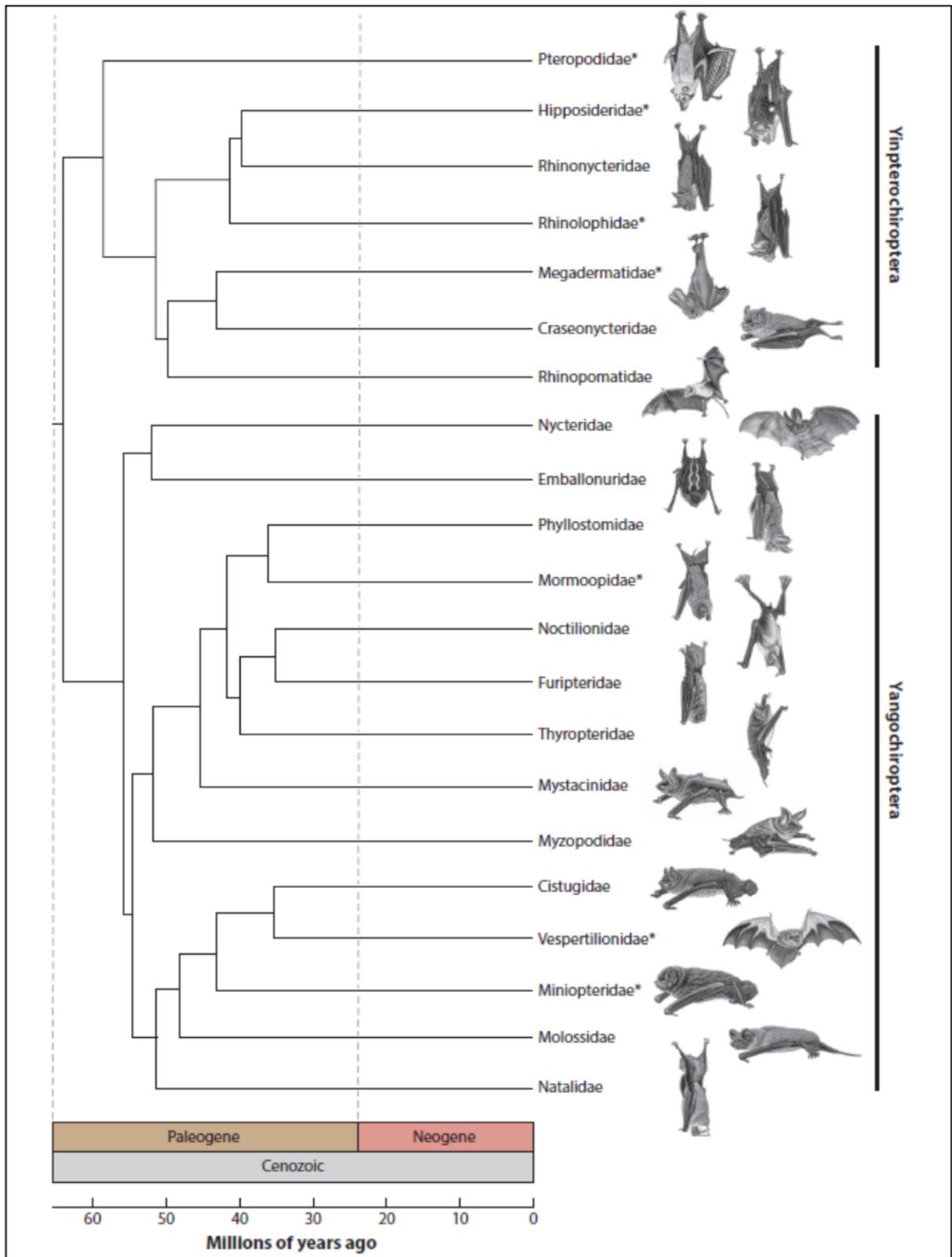
Os morcegos pertencem à ordem Chiroptera (Blumenbach, 1779) palavra derivada do grego “cheir” (mão) “pteron” (asa), revelando que suas asas são mãos extremamente modificadas (Reis *et al.*, 2017). Neste sentido, fazem deles os únicos mamíferos com capacidade de voo verdadeiro (Pereira, 2022). Em seu histórico evolutivo, a característica de voo permitiu aos morcegos ganhar um maior número de habitats, favorecendo a grande diversificação deste grupo (Cooper; Soares, 2013) tal como sua distribuição geográfica (Pereira, 2022).

A ecolocalização é um sistema de orientação por meio da captação de ecos refletidos pelos sons que produzem, permitindo-os coletarem informações sobre seu entorno (Griffin; Galambos, 1941) ou mesmo quando refletido por objetos (Reis; Peracchi; Pedro e Lima, 2011). Por outro lado, tal característica não se faz presente em toda a ordem Chiroptera.

A ordem Chiroptera é atualmente organizada em duas subordens (**Figura 1**): Yinpterochiroptera, agrupando a família Pteropodidae e outras 6 famílias antes agrupadas em microchiroptera (Anderson, Ruxton, 2020), e Yangochiroptera, agrupando 14 famílias restantes de microquirópteros (Simmons; Cirranelo, 2022). Espécies pertencentes a Yinpterochiroptera ocorrem apenas no Velho Mundo, possuindo ampla distribuição pela África, Ásia, Europa e Oceania, enquanto as pertencentes à Yangochiroptera ocorrem nas Américas (Novo Mundo), sendo também amplamente distribuídas pelos outros continentes (Simmons; Cirranelo, 2022).

Vale ressaltar que, nos morcegos o aspecto de ecolocalizar é característico dos Yangochiroptera, que produzem sons de alta frequência por meio da sua laringe (Fenton, 2013) enquanto na família Pteropodidae apenas as espécies do gênero *Rousettus* são capazes de ecolocalizar, no entanto, para tal utilizam da língua para emissão de sons (Altringham, 1996; Fenton, 2013).

Figura 1. Filogenia da ordem Chiroptera baseados em caracteres moleculares.



Fonte: Teeling *et al.*, (2018)

Para Andrade (2014), a habilidade de voar, juntamente com a ecolocalização e hábitos noturnos possibilitam esses animais a explorarem uma grande variedade de nichos ecológicos, levando ao desenvolvimento de muitas especializações morfológicas e hábitos alimentares. Assim, não havendo a necessidade de luz para orientação, os morcegos se expandiram não somente em nichos noturnos, como também na diminuição à competição com outros grupos (Jones; Teeling, 2006; Kunz; Fenton, 2006). A ocupação em diferentes nichos torna estes animais essenciais para a manutenção das relações tróficas (cadeia alimentar) nos ecossistemas (Simmons, 2005), como exemplos os morcegos insetívoros, fomentando cerca de 70% da ordem, buscam seu alimento em voo – em áreas abertas ou próximos de superfícies aquáticas, e realizam a captura de suas presas diretamente do substrato (Schnitzler; Kalko, 2001; Pereira, 2022).

Os morcegos são classificados de acordo com os seus principais hábitos alimentares, como insetívoros: consomem em sua maioria insetos; Frugívoros: Geralmente consomem a polpa de frutas e ingerem as sementes, sendo estas eliminadas e dispersadas pelas fezes; Nectarívoros: Consomem néctar como principal fonte de energia, e completam suas dietas com pólen, frutos e insetos; Piscívoros: Consomem peixes, e completam sua dieta com insetos; Onívoros: Consomem uma ampla variedade de itens alimentares como frutos, insetos e pequenos vertebrados; Sanguívoros: Mundialmente, só existem apenas três espécies de morcegos hematófagos (alimentam-se de sangue) – *Diphylla ecaudata* e *Diaemus yongii* consomem principalmente sangue de aves, e *Desmodus rotundus* prefere sangue de mamíferos, incluindo também na sua dieta sangue de aves e répteis (Reis *et al.*, 2017; Murcia; Provete; Fischer, 2023). Ainda que seja um número pequeno de espécies hematófagas, maior parte do preconceito é oriundo da falta de conhecimento e a inautêntica generalização a respeito da dieta desses morcegos (Pereira, 2022).

Ainda que sejam frequentemente rotulados, de forma negativa, a doenças e mitos (covid e a lenda do vampiro), estes pequenos mamíferos desempenham e contribuem fortemente para a diversidade ecossistêmica nas mais importantes funções ecológicas (Pereira, 2022). Atuam no controle biológico de insetos (espécies insetívoras), limitando a diversificação de pragas agrícolas, bem como dispersores de sementes (espécies frugívoras) e, ainda como polinizadores (espécies nectarívoras). Desta forma, desempenham um papel relevante na recuperação de habitats fragmentados devido à capacidade de explorar diversos recursos, avaliando assim, o sucesso da restauração fragmentada, por meio da circulação das sementes em áreas mais conservadas para áreas a serem recuperadas (Reis *et al.*, 2007; Boyles *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2011; Fonseca; Mascarenhas; Olímpio, 2021).

Dentre as aproximadamente 1.450 espécies conhecidas mundialmente, 340 ocorrem nos neotrópicos, constituída por aproximadamente 17 famílias, representando assim, a segunda maior ordem dentre os mamíferos (Simmons; Cirranelo, 2022; Boldsystems, 2023). No Brasil, esta ordem conta com 9 famílias, 68 gêneros e 181 espécies, sendo o bioma Cerrado responsável por 66,3% de todas as espécies registradas no Brasil, com 118 espécies, dentre elas 3 são endêmicas e, as 9 famílias de morcegos ocorrem neste bioma. Outras 9 espécies são endêmicas da Mata Atlântica e da Caatinga (Batcon.Org; Sbeq.Net, 2022; Murcia; Provete; Fischer, 2023; Reis *et al.*, 2017).

3.2 Estudos Moleculares

A biologia molecular é uma ferramenta cada vez mais presente na sistemática filogenética, tendo propiciado uma mudança metodológica incontestável nessa área. O surgimento de tecnologias que permitem sequenciar porções crescentes do genoma dos organismos em curtos intervalos de tempo foi um dos fatores que impulsionou de vez a incorporação desta metodologia em estudos de filogenia, tornando-a muitas vezes fundamental para a compreensão dos padrões de relacionamento em alguns grupos de organismos (Pavan, 2014).

Atualmente, uma ferramenta primordial vem sendo utilizada em estudos moleculares, a taxonomia integrativa. De acordo com Dias; Rossi e Barbosa, (2019), a Taxonomia Integrativa foi formalmente introduzida em 2005 e pode ser citada como a delimitação de espécies que utiliza dados baseados em múltiplas fontes de evidência, tais como a biologia molecular, filogeografia, morfologia, compatibilidade reprodutiva etc. Com isto, espera-se que as espécies exibam peculiaridades em pelo menos um desses aspectos, e investigando vários desses, torna-se mais fácil identificar a existência de tais peculiaridades (Dayrat, 2003).

Ainda que a Taxonomia Integrativa tenha ganhado lugar nas pesquisas, estudos realizados com morcegos que partilhem similaridades de evidências ainda são poucos (Goodman e Ranivo 2009). Os poucos exemplos incluem estudos combinado no máximo duas fontes de evidências para identificação de espécies pertencentes a complexos crípticos, que podem ser análises morfológicas, genética, bioacústicas de modelagens de nichos ecológicos e distribuição geográfica (Novaes, 2017).

Estudos filogenéticos com morcegos é uma ferramenta essencial para obtenção de dados moleculares, objetivando o avanço de tais pesquisas. Esse crescente banco de dados consta principalmente com informações moleculares, que sugerem fortemente que muitos grupos

tradicionalmente reconhecidos na taxonomia não são monofiléticos ou constituídos por uma só espécie (Simmons, 2005).

3.2.1 Estudos Moleculares na Quiropterofauna

De acordo com Barros *et al.*, (2021), as descrições das espécies têm sido feitas predominantemente com base em características morfológicas e métricas, que muitas vezes, podem representar plesiomorfias (primitivo), refletindo apenas a adaptação do animal a um determinado modo de vida. Dependendo do método aplicado para o estudo filogenético, seja ele citogenético, molecular ou morfológico, a monofilia (táxon) do grupo em questão é avaliada (Salomon, 2016). Tais métodos aplica-se em estudos filogenéticos em morcegos, devido a sua variedade existentes em relação aos demais mamíferos.

A evolução cariotípica em Chiroptera demonstram que alguns grupos possuem cariótipos bastante conservadores (conservadorismo cromossômico), outros cariótipos com poucos rearranjos e outros cariótipos altamente rearranjados (mega evolução cariotípica), (Araújo, 2011). Sendo a família Emballonuridae apontada como uma das linhagens mais fundamentais para pesquisas morfológicas e moleculares. Araújo (2011), forneceu dados cruciais fomentando a importância desta família nos estudos cromossômicos: “Até o presente momento os dados citogenéticos existentes em Emballonuridae são provenientes de outros países da América do Sul e Ásia. Existe uma variação do número diplóide de cromossomos ($2n=22-48$) e no número fundamental ($NF=36-64$)”.

A Família Mormoopidae, por exemplo, foi investigada através de dados morfológicos, genéticos e combinados com as evidências moleculares apontando incongruências com a diversidade tradicionalmente descrita pela morfologia (Clare; Lim; Fenton e Hebet, 2011; Clare *et al.*, 2013; De Thoisy *et al.*, 2014). Lewis-Oritt; Porter e Baker (2001) foram os primeiros a inferir as relações entre as espécies de Mormoopidae através de dados moleculares, publicando a filogenia de 37 espécimes obtida por meio das análises de genes Citocromo b (Citb) e RAG2 (Pavan, 2014).

Estudos citogenéticos em morcegos da Amazônia brasileira são escassos, sendo a maioria deles concentrados em espécies da família Phyllostomidae (Rodrigues *et al.*, 2000, 2003; Noronha *et al.*, 2010). Para Gregorin e Cirranelo (2016) a família Molossidae é outro exemplo de análise filogenética em espécies com métodos morfológicos e mostraram a monofilia para Molossidae e Molossinae. A origem monofilética da ordem Chiroptera está clara, porém, quando analisadas famílias em específico, como o caso de Vespertilionidae, incertezas quanto a sua origem são detectadas (Salomon, 2016). Neste caso, os genes RAG2

(nuclear) e *Citb* (mitocondrial) são mais analisados em estudos na ordem Chiroptera, sendo estes depositados no GenBank a fim de estudar-se a filogenia desta ordem.

3.3 Principais Marcadores Moleculares

Segundo Valadez e Kahal (2000) um marcador refere-se a qualquer proteína, Ácido Ribonucleico (RNA) ou molécula de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) de tamanho ou peso molecular conhecido, que serve para monitorar ou calibrar sua separação usando eletroforese ou cromatografia, é um marcador genético como qualquer gene cuja expressão permite um efeito fenotípico que pode ser facilmente detectado (por exemplo, um gene que causa resistência a um antibiótico).

Por meio da metodologia utilizada para identificar os marcadores, pode-se classificá-los em dois grupos: o primeiro, os marcadores são obtidos por hibridização e o segundo, os marcadores são obtidos por amplificação do DNA (Oliveira, 2021). Entre os identificados por hibridização (enzimas de restrição) estão os principais marcadores de Polimorfismos de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP) e os marcadores minissatélites. Para os marcadores por amplificação estão os mais utilizados Polimorfismo Amplificado Aleatório de DNA (RAPD), Regiões Amplificadas Caracterizadas por Sequências (SCAR), Sites Marcados em Sequência (STS), Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP) e Repetições de Sequências Simples (SSR) ou microssatélites (Chies, et al., 2014). Outra tecnologia utilizada para análise do polimorfismo molecular, é uma metodologia híbrida entre os dois procedimentos básicos, pois inclui uma etapa dirigida por enzimas de restrição, seguida pela síntese por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos fragmentos de DNA obtidos pela digestão enzimática (Chies, 2014).

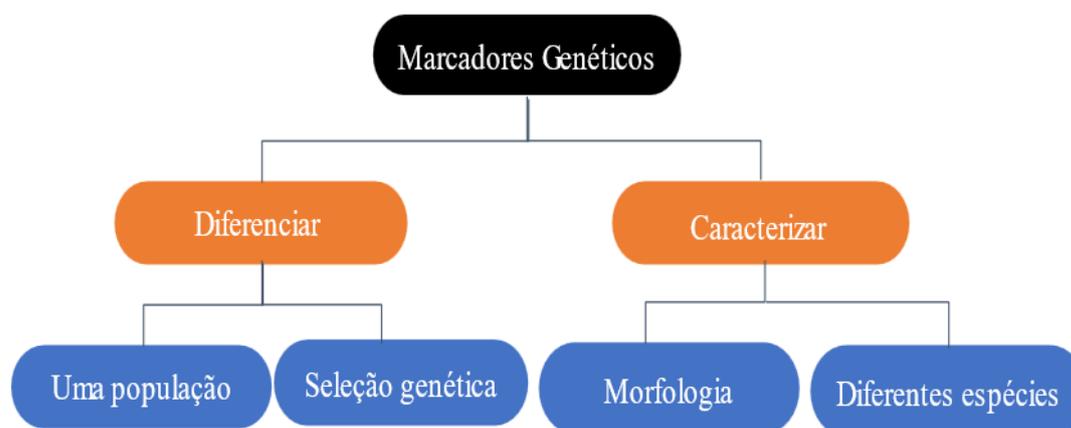
A criação e uso de marcadores moleculares para a detecção e exploração dos polimorfismos do DNA é um dos avanços mais significativos no campo da genética molecular, onde esses polimorfismos de DNA se originam de um resultado de uma variação (mutação) e são geralmente referidos pelo tipo de mutação que os criou. A utilização de marcadores moleculares no DNA gera muitas informações distribuídas aleatoriamente ao longo do genoma (Oliveira, *et al.*, 2021).

De acordo com Oliveira *et al* (2021), os primeiros marcadores genéticos utilizados foram os marcadores morfológicos, e são utilizados até hoje, principalmente no melhoramento genético convencional, onde são selecionadas as características desejáveis para cruzamentos de genitores promissores. Os próximos marcadores genéticos que surgiram foram os bioquímicos, tais como terpenos e as isoenzimas, onde as primeiras moléculas utilizadas como marcadores

bioquímicos foram os metabólitos secundários bem como antocianinas e compostos fenólicos, usados para distinguir entre variedades de plantas. E por fim, surgem os marcadores moleculares, que são frequentemente utilizados em estudos na biologia molecular atualmente (Grover; Sharma, 2016).

De modo geral, pesquisas realizadas com marcadores moleculares caracterizam e diferenciam a variabilidade genética de um organismo, espécie ou população (Gráfico 1), fomentando a investigação por ecólogos e sistematas, bem como estudos de aspecto relativos a afinidades e limites entre espécies, níveis de migração e dispersão das populações (Hoffmann e Willi, 2008; Clare; Lim; Fenton e Hebet, 2011).

Gráfico 1. Divisão geral dos Marcadores Genéticos.



Fonte: Autora, (2023)

3.3.1 Modelos Baseados em Hibridização

3.3.1.1 Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição

Define-se RFLPs como a variação no comprimento dos fragmentos de DNA produzidos por uma endonuclease de restrição específica a partir de DNA genômico de dois ou mais indivíduos de uma espécie (Valadez; KAHL, 2000). Os fragmentos gerados de DNA são separados em gel de agarose e transferidos para membranas de nylon ou nitrocelulose, onde são hibridizados com sondas de DNA, detectando sequências genômicas homólogas a elas (Lanza *et al.*, 2000).

Por meio da autorradiografia, as sondas são detectadas e previamente marcadas por elementos radioativos, mas, atualmente, essa sonda (sequências de DNA marcadas com nucleotídeos radioativos ou quimioluminescentes) está sendo pouco utilizada, sendo

predominantes as sondas fluorescentes ou as que participam de reações colorimétricas. Esses marcadores podem ser causados por mudanças de substituição de nucleotídeos no sítio de reconhecimento de enzima, rearranjo de DNA, inserção ou deleção (Oliveira *et al.*, 2021).

Conforme Lorenzoni, (2019), as análises realizadas por meio dos RFLPs de DNA mitocondrial (mtDNA) e ribossômico (rDNA) têm sido utilizados para a genética de populações, levantamento biogeográfico e filogenéticos. Suas principais vantagens são a expressão codominante, alta reprodutibilidade, cobertura ampla do genoma, possibilidade de utilização de sondas heterólogas. Entretanto, é uma técnica que requer um maior trabalho laboratorial, pois necessita de uma grande quantidade de DNA com alto grau de pureza. Além de necessitar de um conhecimento prévio da sequência para obter sondas específicas e possui ainda um custo elevado quando comparada a outros marcadores, como marcadores de sequência e microssatélites (Oliveira *et al.*, 2021).

Embora os RFLPs necessitem de laboratórios bem equipados e mão de obra especializada, estes marcadores apresentam herança codominante, sendo possível a identificação de genótipos homozigotos e heterozigotos (Lanza *et al.*, 2000), contribuindo fortemente nos estudos de variabilidade genética, identificação de espécies e organização populacional.

3.3.1.2 Minissatélites ou Repetições Tandem de Número Variáveis (VNTR)

O DNA genômico apresenta regiões de cópias e outras com níveis variáveis de repetições. Essas repetições podem ser longas (satélites), curtas (minissatélites) ou muito curtas (microssatélites). Os minissatélites ou locos VNTR (Rieger; Campos e Santos, 2006). Tais locus são regiões dispersas no genoma que contém um número variável de sequências de nucleotídeos repetidas e enfileiradas lado a lado (Tandem) que possuem um núcleo comum de 10 a 15 pares de bases (Hanssen *et al.*, 1999; Jeffrey *et al.*, 1985)

As principais vantagens desse tipo de marcador são a alta reprodutibilidade das marcas e a geração de muitas bandas informativas por reação (no caso de sondas para vários locos). As desvantagens são relacionadas à dominância dos marcadores (no caso de sondas para vários locos) e ao fato de a técnica ser mais trabalhosa, demorada e cara, à semelhança dos marcadores RFLP (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Contudo, esses marcadores podem ser utilizados por meio da técnica de PCR (Faleiro; Andrade e Junior, 2011). Por outro lado, marcadores com locos específicos podem gerar altos níveis de polimorfismo, além de serem, codominantes e multialélicos com ampla aplicabilidade em estudos de diversidade genética, análises filogenéticas e fingerprinting de variedades (Oliveira *et al.*, 2008).

3.3.2 Modelos Baseados por amplificação de DNA em PCR

3.3.2.1 Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase

Em 1985, o bioquímico Kary B. Mullis revolucionou a biologia molecular ao criar a técnica da PCR, o que lhe rendeu o Prêmio Nobel de Química, em 1993. Esta metodologia baseia-se na síntese *in vitro* de moléculas de DNA, utilizando neste procedimento uma enzima DNA polimerase termoestável. Atualmente, os marcadores moleculares são utilizados com os mais diversos enfoques, incluindo estudos de variabilidade genética, programas de melhoramento, estudos evolutivos, entre outros. Os diversos tipos de marcadores moleculares disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada, pela habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e reprodutibilidade (Chies *et al.*, 2014).

A polimerase dependente de DNA é uma enzima que, sob certas condições e na presença de uma pequena cadeia de DNA, que atua como um primer, é capaz de produzir milhões de cópias de certos fragmentos de DNA. Esses fragmentos são subsequentemente separados por peso molecular e conformação por técnicas eletroforéticas, obtendo um padrão de banda específico que nos permite diferenciar indivíduos (Rallo *et al.* 2002). Conforme Lanza *et al.*, 2000, primers são sequências curtas de DNA, que pareiam com o DNA-molde e servem de iniciadores a síntese *in vitro* de uma nova fita de DNA.

3.3.2.2 Amplificação Aleatória do DNA Polimórfico (RAPD)

Descrita pela primeira vez na década de 90 por Williams *et al.* (1990) e McClelland (1990) como uma derivação do processo da técnica de PCR envolvendo uma amplificação simultânea de vários locos anônimos do genoma, utilizando um único primer, com capacidade de se ligar a regiões específicas do genoma (Valadez; Hahl, 2000). Para que um fragmento de DNA seja amplificado, duas regiões complementares ao primer devem estar separadas por até 2.000 pb (pares de base) e em orientações opostas (Lanza *et al.*, 2000).

Desde então, inúmeras pesquisas adotaram a utilização do RAPD como marcador para análises genéticas, como na detecção da variabilidade genética em populações naturais (Gois I.B *et al.*, 2014). Trindade e Chaves (2005) e Freire *et al* (2007) foram os primeiros a comprovarem a eficácia deste marcador em seu estudo da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* e *Schizolobium parahyba*.

Os polimorfismos produzidos por meio desta técnica, são chamados de marcadores RAPD podendo resultar de qualquer alteração na sequência ou no local de ligação do iniciador que o impede de ingressar na cadeia, ou também pode ser os produtos de alterações que

modificam o tamanho ou impedem a amplificação bem-sucedida do DNA-modelo (Aguilar, 2020).

Contudo, esta é uma técnica de fácil execução e aplicável a qualquer tipo de organismo (Lanza *et al.*, 2000), uma vez que não é necessário de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção de primers utilizados (Faleiro, 2017). No entanto, existem problemas inerentes à reprodutibilidade dos padrões de amplificação, além do baixo conteúdo de informação genética por loco, uma vez que são marcadores dominantes (Lanza *et al.*, 2000) não diferenciando os locos heterozigotos e homozigotos, detectando somente um alelo por locos.

3.3.2.3 Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos Amplificados

Os AFLPs amplificados são resultantes do uso combinado de enzimas de restrição e da PCR (Mueller e Wolfenbarger, 1999; Bikandi *et al.*, 2004 *apud* Rieger; Campos e Santos, 2006). Constitui-se em duas enzimas de restrição, sendo nucleases de restrição (**EcoRI/MseI**) as mais usadas (Lanza *et al.*, 2000).

Segundo Oliveira *et al* (2021), a utilização desta técnica ocorre em quatro importantes passos: Primeiro, clivagem do DNA genômico; segundo a junção dos adaptadores com os fragmentos gerados na hora da clivagem do DNA; Terceira, amplificação dos fragmentos selecionados via PCR; quarta ocorre a divisão dos fragmentos selecionados em gel de alta resolução. Rieger; Campos e Santos (2006) afirma que após a digestão do DNA genômico são obtidos vários fragmentos de diversos tamanho e durante a amplificação por PCR são adicionados adaptadores para enzimas de restrição, cujos fragmentos podem ser amplificados e analisados em um único gel.

Por outro lado, Aguilar (2020) propõe que é necessário adicionar adaptadores para que fiquem nas bordas dos fragmentos recém-formados e, assim, forneça, uma sequência conhecida para poder amplificar por PCR, sendo também, necessário o uso de ligases para facilitar a ligação entre bordas dos fragmentos e as sequências curtas conhecidas. Ainda afirma que, para discriminar entre todos os fragmentos de restrição que são formados, os primers são projetados de forma a incorporar o adaptador de sequência conhecido mais um, dois ou três pares de base - deixando de fora qualquer um dos possíveis: A, G, C ou T.

Apesar da alta reprodutibilidade, esta tecnologia é protegida por patentes, condições que restringem o seu uso (Rieger; Campos e Santos, 2006) e, é uma técnica trabalhosa que necessita de DNAs genômicos de alta qualidade e de um maior número de reagentes, por ser realizada em várias etapas (incluindo a digestão do DNA com enzimas de restrição) (Lanza *et al.*, 2000).

Contudo, é possível analisar simultaneamente várias regiões do genoma, permitindo acessar diferenças genéticas entre indivíduos, populações e espécies (Lorenzoni, 2019). Sendo possível realizar análises de diversidade genética e grau de parentesco (Rieger, 2006), pois para a utilização desta técnica não necessita de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção dos primers utilizados (Faleiro, 2007).

3.3.2.4 Microsatélites Simples ou Sequências Repetidas

Os SSR são regiões de pequenas sequências (de dois a 10 pares de bases) repetidas, dispostas em série, que se supõe distribuídas aleatoriamente por todo o DNA, são variáveis dispersas pelos genomas de fungos, plantas e animais, que podem ou não estar associados a genes, são loci altamente mutáveis que podem estar presentes em muitos locais do genoma (Aguilar, 2020). Essas regiões são frequentemente variáveis e conseqüentemente úteis para medir o polimorfismo entre espécies ou variedades estreitamente relacionadas, uma vez que a repetição por si só não codifica para formar proteína e, as sequências repetitivas de DNA podem-se recombinar e expandir com mais frequência do que outros tipos de sequências (Valadez e KAHL, 2000).

Por meio da PCR, essas regiões são amplificadas, utilizando primers específicos (de 20 a 30 bases), complementares a sequências únicas que flanqueiam o microsatélite, assim, cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (Ferreira; Grattapaglia, 1998). Estas sequências de DNA que flanqueiam as regiões contendo repetições curtas, são conservadas dentro de uma espécie, permitindo a seleção de primers de PCR que podem ser utilizados para amplificar os SSRs. Desta forma, o polimorfismo no tamanho dos fragmentos obtidos, dá-se ao número diferente de repetições das sequências simples (Lanza *et al.*, 2000).

Embora os microsatélites permitam analisar apenas um locus por experimento, eles são bastante informativos, pois permitem que as variantes alélicas sejam diferenciadas dos locus analisados e, portanto, identificam grupos de ligação entre diferentes mapas genéticos (Aguilar, 2020). Algumas espécies de mamíferos são exemplos de espécies que tem mapas genéticos em construção, como alguns primatas (De Pontbriand *et al.*, 2002; Rieger, 2006). No entanto, para o seu desenvolvimento é necessário conhecer a sequência e, portanto, são menos numerosos do que outros marcadores dominantes (Aguilar, 2020).

Marcadores do tipo microsatélites são considerados marcadores codominantes, enquanto marcadores do tipo RAPD e Inter Repetições de Sequências Simples (ISSR) são tratados como marcadores dominantes. Duas características fazem com que a análise estatística

de marcadores dominantes seja menos informativa em comparação aos codominantes: a sua natureza bialélica e dominante (Chies *et al.*, 2014). ISSR são fragmentos de DNA meio da PCR utilizando um único primers construído a partir de sequências de microssatélites, obtém-se este marcador via extração e amplificação da PCR do DNA (Faleiro, 2007).

3.4 Aplicação dos Marcadores Moleculares na ordem Chiroptera

A inclusão de dados moleculares na reconstrução de padrões macro evolutivos tem causado mudanças significativas a respeito do conhecimento acerca de Chiroptera, tanto na sua relação com as demais ordens de mamíferos (Emonds *et al.*, 2007; Meredith *et al.*, 2011), quanto à maneira com que as diferentes famílias dentro do grupo estão relacionadas (Erick *et al.*, 2005; Teeling *et al.*, 2005). Por outro lado, as mudanças causadas pelos estudos de marcadores moleculares em morcegos, não se limita somente aos padrões macro evolutivos, uma vez que cada marcador exerce uma função a depender do estudo em questão, tornando os gêneros amplos em diversidade e passíveis de alterações a despeito das análises de inúmeros genes.

Diante do exposto, cita-se a Família Mormoopidae que serviu como fonte de estudos morfológicos, genéticos e combinados com as evidências moleculares apontando incongruências com a diversidade tradicionalmente descrita pela morfologia (Pavan, 2014). Ainda, Pavan (2014) afirma que Lewis-Oritt *et al* (2001), foram os pioneiros a inferir as relações entre espécies de Mormoopidae através de dados moleculares, publicando a filogenia de 37 espécimes obtida através da análise dos genes *Citb* e *RAG2*, descrevendo altos valores de divergência genética intraespecífica. Portanto, espera-se que um padrão fitogeográfico, para morcegos, seja semelhante ao das aves e diferente dos pequenos mamíferos não voadores, que apresentem baixa estruturação e baixa divergência de sequências (Ditchfield, 2000).

Estudos populacionais com marcadores moleculares em morcegos é atípico e, geralmente, são focados na utilização do mtDNA (Andrade, 2014), sendo comum também a utilização de genes nucleares, denominados nDNA (genes da região nuclear do DNA), que apesar de apresentar diferenças nas taxas de mutações, trazem diferentes informações sobre a história evolutiva dos organismos (Salomon, 2016).

3.4.1 DNA mitocondrial

O mtDNA animal é constituído de uma molécula pequena de fita dupla circular que codifica aproximadamente 5% de toda maquinaria necessária para funcionamento da

mitocôndria (Nahum, 2001 *apud* Luz, 2014). Seu tamanho é de aproximadamente 16000 pares de bases (pb), com raras exceções, possuindo apenas 37 genes (os quais codifica os 5%), sendo considerado um genoma compacto com poucas sequências espaçadoras e repetitivas. Seu conteúdo gênico e a ordem em que esses genes encontram-se organizadas no genoma, costumam ser conservados, tornando-se capaz de ligar indivíduos à sua linhagem materna, uma vez que possui herança exclusiva mitocondrial, além de ser considerado um marcador genético preciso por apresentar mais de cinco mil cópias numa única célula (Martins; Amorim e Caldeira, 2021).

Dentre os mtDNA, os genes Citocromo Oxidase da Subunidade I (COI), *Citb* e RNA ribossômico (rRNA) 16S, são os mais utilizados em estudos na Quiropteroфаuna brasileira, ainda que os rRNA 16s seja pouco menos usado em comparação aos demais genes mitocondriais, podendo atuar em conjunto na diferenciação de espécies. O DNA barcode (código de barras do DNA) consiste em um segmento do mtDNA equivalente a 680 pb do gene COI (Luz, 2014), tornando-se uma das iniciativas de maior sucesso na identificação molecular e discriminação de espécies (Hebert *et al.*, 2003). Em 2004 este fragmento de gene foi proposto para servir como o código de barras universal para todas as espécies animais através da criação do “Consortium for the Barcode of life” - CBOL: www.barcoding.si.edu (Moraes, 2016). A função mais essencial do DNA Barcode é a identificação correta de um indivíduo dentro de uma espécie ou indicar que a amostra não pertence a nenhuma espécie descrita (Moritz; Cícero, 2004)

3.4.2 DNA nuclear

Segundo Salomon (2016), dentro do genoma nuclear, o RAG2 em conjunto com o RAG1, os quais são subunidades de enzima recombinase, é o mais utilizado para efetuar o reconhecimento e quebra das sequências-sinais de recombinação. Além disso, RAG2 evoluiu em uma taxa mais lenta em relação a regiões do gene *citb*, podendo ser de grande importância para estudos filogenéticos (Freygang, 2006)

Outro exemplo de nDNA são os marcadores SSR, encontra-se localizado ao longo das regiões do DNA nuclear, formando uma das classes de marcadores moleculares mais polimórficos conhecidos (Luz, 2014). Possui uma alta taxa de mutação, devido a isto, tornaram um excelente marcador para estudos populacionais (Barker, 2002).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do projeto foi realizado uma revisão bibliográfica. Para Lakatos e Marconi (2017), a revisão bibliográfica é indispensável para a delimitação do problema em um projeto de pesquisa e para obter uma ideia precisa sobre o estado atual dos conhecimentos sobre um tema, sobre suas lacunas e sobre a contribuição da investigação para o desenvolvimento do conhecimento. Desta forma, foi realizado a análise, caracterização, avaliação e a integração dos principais tipos de marcadores moleculares utilizados em estudos na quiropterofauna brasileira, da literatura publicada sobre marcadores moleculares Chiroptera.

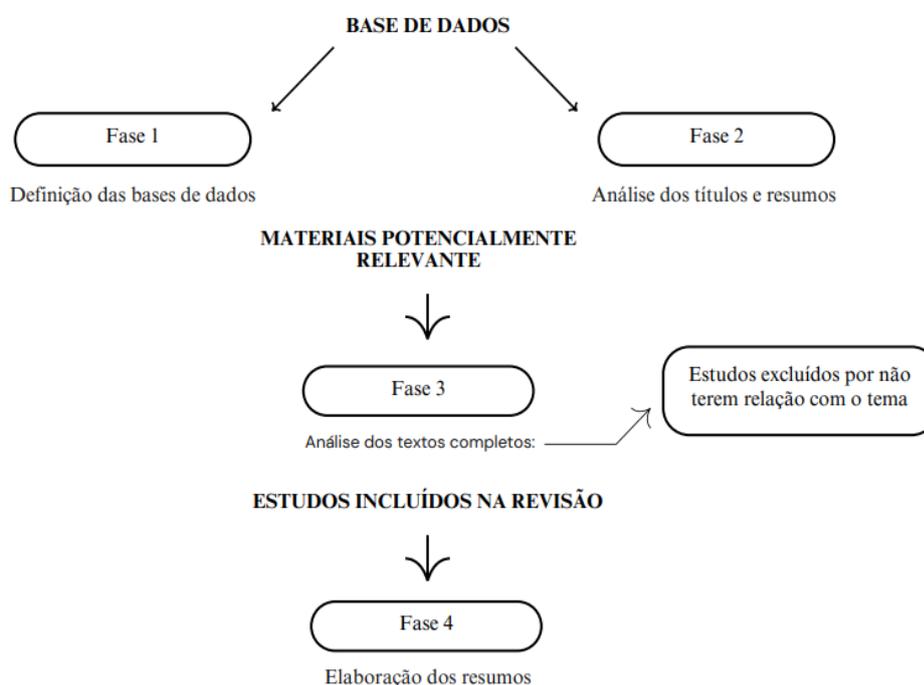
As principais fontes a serem consultadas para a elaboração da revisão bibliográfica foram artigos em periódicos científicos, livros, teses, dissertações, descritos por Medeiros e Tomasi (2008). Foram utilizados os principais sites de buscas de artigos científicos como base de dados: Scielo; Portal de periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Abra Global Trusted (DOAJ); Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações (BDTD); Google Acadêmico; Science Direct; ATTENA – Repositório Digital da UFPE; Atena Editora e ResearchGate. Utilizando as seguintes palavras-chaves: Estudos moleculares; Chiroptera molecular; Marcadores Chiroptera; Identificação molecular morcegos; morcegos moleculares brasil; genética morcegos; molecular bats. Ainda, foram utilizados caracteres de truncamento para melhor resultado nas pesquisas, tais como: asteriscos (*); hífen (-) e aspas (“). A pesquisa consiste em artigos, teses dissertações entre os anos de 2012 a 2022, sendo limitado à pesquisas realizadas no Brasil.

Após a identificação dos marcadores moleculares, foi realizada a etapa de triagem – separados por anos, autores e país. Também foi feito um fichamento de cada artigo/tese contendo os temas, autores, ano, local e os tipos de marcadores moleculares encontrados nos estudos feitos em quirópteros.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca inicial identificou 56 publicações a partir das palavras-chave, títulos e abstract. Após uma segunda leitura dos materiais selecionados, houve a exclusão de duplicatas, por não estarem de acordo com o período proposto do estudo ou não apresentarem dados completos relacionado ao tema proposto pelo trabalho, permanecendo no estudo apenas 24 títulos, por manifestarem os critérios para a abordagem qualitativa como mostra a Figura 2.

Figura 1. Esquema representativo do processo de seleção dos estudos.

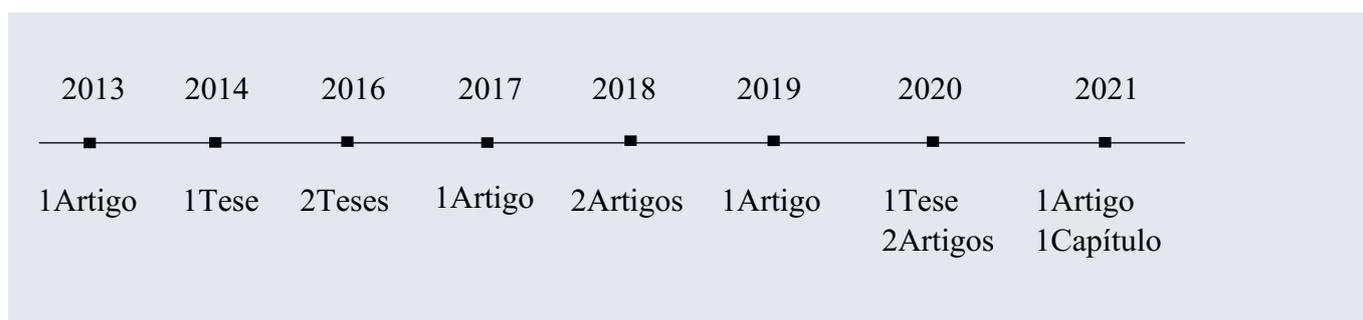


Fonte: Autora, (2023)

Dos 24 materiais literários encontrados inicialmente, restaram 13 que foram selecionados e constituem essa revisão. Dentre as principais fontes consultadas, incluíram-se artigos em periódicos científicos, teses, dissertações e capítulo de livros, utilizando diversas bases de dados como Scielo, Portal de periódicos CAPES, entre outras. As palavras-chave utilizadas foram cuidadosamente selecionadas para otimizar a busca, e os resultados foram filtrados considerando o período de interesse e a delimitação geográfica, focando nas pesquisas realizadas no Brasil.

Contudo, a revisão das literaturas realizada apresentou uma análise abrangente dos marcadores moleculares utilizados em estudos sobre a quiropterofauna brasileira, abordando os anos de 2012 a 2022 representados pelo **Gráfico 2**. O objetivo principal foi compreender a diversidade de marcadores empregados, bem como identificar tendências e lacunas na pesquisa genética desses mamíferos alados.

Gráfico 2. Quantitativo de trabalhos publicados por ano.



Fonte: Autora, (2023)

A análise dos dados revelou uma variedade significativa de marcadores moleculares empregados nos estudos em quiropterofauna brasileira. Dentre os mais recorrentes, destacam-se marcadores de mtDNA, como os genes COI, Citb e rRNA 16S. Esses marcadores têm sido frequentemente utilizados para identificação molecular e discriminação de espécies, inclusive por meio da técnica de DNA Barcode.

Além do mtDNA, foram identificados estudos que exploram marcadores nucleares, como o RAG2, isso indica uma tendência crescente em explorar o genoma nuclear para estudos filogenéticos em quiropterofauna. A escolha de marcadores mais lentos na taxa de evolução, como o RAG2 em comparação com regiões do gene citocromo b, sugere a busca por marcadores que ofereçam uma resolução filogenética mais robusta, especialmente em escalas evolutivas mais profundas.

A presença de marcadores SSR também foi observada, o que enfatiza a importância desses marcadores altamente polimórficos em estudos populacionais. A alta taxa de mutação dos microssatélites os torna ferramentas valiosas para investigar a estrutura populacional, a diversidade genética e os padrões de dispersão em populações de morcegos.

Devido as dificuldades na identificação das espécies com estudos analíticos de caracteres morfológicos, passou-se a utilizar, em conjunto, o método molecular. Marcadores moleculares utilizados na identificação de espécies é cada vez mais empregado, por sua

capacidade de detectar padrões de subdivisão filogenética e espécies crípticas, muitas vezes não mensuradas em análises apenas por meio da morfologia (Barros *et al.*, 2021).

Em face do exposto, o presente estudo obteve resultados positivos na identificação dos marcadores moleculares utilizados em estudos na quiropterofauna brasileira. Sendo o mais comum o gene mitocondrial COI, utilizada para identificar espécies e sua similaridade genética entre espécies da mesma ordem (Chiroptera). Este gene mitocondrial tem sido estudado por várias famílias de morcegos (Noctilionidae, Phyllostomidae, Vespertilionidae e Molossidae) e é uma ferramenta eficaz para a identificação de espécies (Clare, *et al.*, 2007; Clare *et al.*, 2011; Gager, *et al.*, 2016).

Dos treze artigos estudados, apenas três não foram utilizados o COI. Ademais, os artigos analisados obtiveram divisões dos marcadores moleculares em mtDNA e nDNA, utilizados para fins de comparação filogenética, filogeográfica e similaridade genética entre as espécies.

De modo geral, todos utilizaram como metodologia de amostragem e coleta a fixação dos espécimes em álcool 100% e transferido para álcool 70%. Os genes moleculares, utilizados como marcadores, COI, rRNA 16S e 18S foram amplificados em PCR, analisadas em bancos de dados com a finalidade de identificar similaridades morfológicas entre espécies. Como por exemplo, os genes COI e rRNA 16S confirmou a ocorrência da *Sturnira tildae* (Phyllostomidae) no bioma amazônico maranhense do município de Candido Mendes – estado do Maranhão (Lima *et al.*, 2021). Uma outra análise do marcador COI, no município de Caxias também no estado do Maranhão, confirmou a similaridade para a identificação da espécie *Noctilio albiventris* (Noctilionidae) como primeira evidência no bioma cerrado e o segundo registro no estado do Maranhão (Olímpio *et al.*, 2018), confirmou também o diagnóstico molecular e morfológico da espécie *Cynomops planirostris* (Molossidae) (Mendes *et al.*, 2020). Este mesmo marcador afirmou, por meio do Bold Systems, a identificação da ocorrência de *Trinycteris nicefori* (Phyllostomidae) nos municípios de Godofredo Viana e Cândido Mendes – Maranhão (Lima *et al.*, 2018).

Bem como os diferentes marcadores repetitivos 18S rDNA e teloméricas indicaram que a amplificação e distribuição diferencial contribuíram na formação da arquitetura cromossômica para fins de organização filogenética do subgênero *Artibeus*, mais especificamente nas espécies *Artibeus planirostris* e *Artibeus lituratus*, ambas pertencentes a família Phyllostomidae, da Amazônia central (Norte do Brasil) (Souza *et al.*, 2017).

Em concordância com Andrade (2014), ao estudar duas populações de *Lonchorhina aurita* (Phyllostomidae) nos municípios de Toritama e Triunfo no estado de Pernambuco,

observou por meio dos marcadores ISSR 1 e ISSR 2 dois clados monofiléticos para ambas as populações. Por outro lado, o gene COI identificou que a população de Triunfo formou um clado monofilético com um único haplótipo, enquanto a população de Toritama apresentou-se como parafilético com dois clados. Seguindo as análises de dados dos marcadores mitocondriais e nucleares, os valores de *f_{st}* indicaram que as fêmeas de *Lonchorhina aurita* migram com maior frequência em relação aos machos.

Os resultados de Ferreira *et al* (2013) vão de encontro aos achados de Silva (2020) pois ambos apresentam padrões de divergência genética entre populações de *Artibeus obscurus* e *Tonatia saurophila* e *Tonatia bidens* (Phyllostomidae) através da utilização do fragmento do gene mitocondrial *cityb*. No entanto, as distâncias genéticas para o *cityb* entre populações de *Tonatia bidens* revelam que espécies da região do Paraguai e de São Paulo (Brasil) são mais aproximadamente relacionadas do que qualquer um desses indivíduos do nordeste brasileiro.

No entanto, Salomon (2016) obteve sucesso ao utilizar o gene *citb* em análises filogenéticas, bayesiana e de máxima parcimônia nas espécies dos gêneros *Eumops*, *Cynomops*, *Molossus* e *Tadarida* (molossidae) na região de Guarapuava – Paraná. Ainda, somente nas análises das sequências, utilizando o *GenBank*, confirmou a identificação da espécie *Molossus molossus* com 94% de similaridade para o gene RAG2 e 100% para o *citb*, e a espécie *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae) por meio do gene RAG2 com 97% de similaridade. Por outro lado, não obteve resultados positivos de similaridade desta mesma espécie para as sequências de citocromo b. Em contrapartida, Basantes *et al* (2020) utilizou ambos os marcadores para a avaliação do status taxonômico da subespécie de *Tonatia saurophila* (Phyllostomidae) recuperando o gênero *Tonatia* como monofilético e irmão de um clado que incluía outros representantes da mesma família.

Desta forma, os marcadores moleculares têm contribuído significativamente para a compreensão dos padrões macroevolutivos em quiropterofauna, redefinindo relações entre famílias e evidenciando incongruências entre dados morfológicos e moleculares. Bem como a Família Vespertilionidae foi citada como exemplo, destacando a importância dos marcadores moleculares na revisão taxonômica desses animais, dessa forma ilustram como a aplicação desses genes como marcadores têm impacto direto na taxonomia e na compreensão da diversidade biológica.

Em síntese, foi possível visualizar o emprego de marcadores moleculares em estudos genéticos de morcegos no Brasil, destacando a diversidade de abordagens e marcadores empregados. A compreensão dessas informações é crucial para orientar futuras pesquisas,

preenchendo lacunas e promovendo avanços no conhecimento sobre a genética desses mamíferos alados, como representados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Marcadores Moleculares Identificados em Estudos na Quiroptero fauna Brasileira.

| MARCADORES MOLECULARES - CHIROPTERA | | | | | |
|--|------------------------------|--------------|-----------------------|--|--|
| QTD | REF | mtDNA | nDNA | Espécies analisadas | Locais |
| 1 | SILVA (2020) | COI/Citb | - | <i>Tonatia bidens</i> ; <i>Tonatia saurophila</i> | Mato Grosso e Paraíba |
| 2 | RAMOS (2016) | COI/Citb | - | <i>Noctilio albiventris</i> ; <i>Noctilio leporinus</i> | CFPIC: Bahia; Pernambuco; R. do Norte |
| 3 | Basantes <i>et al</i> (2020) | Citb | RAG2 | <i>Tonatia saurophila</i> | Nordeste da Bacia Amazonica/Brasil |
| 4 | Souza <i>et al</i> (2017) | - | rDNA 18S/LI NE1 | <i>Artibeus planirostris</i> ; <i>Ariteus lituratus</i> | INPA/Brasil |
| 5 | Olímpio <i>et al</i> (2018) | COI | - | <i>Noctilio albiventris</i> | Caxias/MA |
| 6 | Mendes <i>et al</i> (2020) | COI | - | <i>Cynomops planirostris</i> | Caxias/MA |
| 7 | Lima <i>et al</i> (2018) | COI | - | <i>Trynictoris nicefori</i> | Godofredo Viana/MA Candido Mendes/MA |
| 8 | Mendes <i>et al</i> (2020) | COI | - | <i>Cynomops planirostris</i> | Bioma Cerrado/MA |
| 9 | Lima <i>et al</i> (2021) | COI | rRNA 16s | <i>Sturnira tildae</i> | Candido Mendes/MA |
| 10 | Ferreira <i>et al</i> (2013) | Citb | - | <i>Artibeus obscurus</i> | Região Sul da Mata Atlântica e Amazonia |
| 11 | ANDRADE (2014) | COI/Citb | ISSR | <i>Lonchorhina aurita</i> <i>Desmodus rotundus</i> | Toritana e Triunfo/PE |
| 12 | SALOMON (2016) | Citb | RAG2 | <i>Molossus molossus</i> | Guarapuava/PR |
| 13 | LIMA <i>et al</i> (2018) | COI | - | <i>Trynictoris nicefori</i> | Caxias/MA |

Fonte: Aurora, (2023)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da análise dos estudos sobre marcadores moleculares na quiropterofauna brasileira entre 2012 e 2022, identificamos uma diversidade de abordagens genéticas empregadas para decifrar os padrões genéticos, evolutivos e populacionais dos morcegos. Estudos apontam uma predominância do DNA mitocondrial, destacando a eficácia do gene COI como uma ferramenta fundamental para a identificação rápida e diferenciada de espécies. A crescente inclusão de marcadores nucleares, como RAG2, sinaliza uma busca por resoluções filogenéticas mais robustas, especialmente em escalas evolutivas mais profundas. A relevância dos microssatélites SSR em estudos populacionais foi enfatizada, proporcionando uma compreensão mais profunda da estrutura genética e da diversidade populacional dos morcegos brasileiros. Além disso, os desafios e limitações associados a certas técnicas de marcadores moleculares, como RAPD e AFLP, foram identificados, destacando a importância contínua do refinamento e padronização dessas abordagens. As contribuições dos estudos moleculares na taxonomia e nos padrões macroevolutivos foram evidentes, redefinindo relações filogenéticas e esclarecendo a diversidade dentro de famílias específicas, como Mormoopidae. Além disso, a discussão sobre a interseção entre dados moleculares e morfológicos destaca uma abordagem integrada para compreender completamente a complexidade da quiropterofauna.

Portanto esta pesquisa, consolida as conquistas recentes em genética de morcegos no Brasil, assim como também aponta para direções promissoras, na integração de dados moleculares, oferecendo uma compreensão mais profunda da biologia e ecologia dos morcegos.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, A. Y., et al. **Uso de marcadores moleculares para determinar a variabilidade genética no papa (*Solanum tuberosum*)**. Huanta – Perú: Hal Archives Ouvertes, vol.2, 2020.
- ALBAGLI, S. **Da biodiversidade à biotecnologia: a nova fronteira da informação**. Brasília: Ciência da Informação. v.27, n.1, p.7-10, 1998.
- ALTRINGHAM, J. D. **Bats: Biology and Behaviour**. Oxford: Oxford University Press, 1996.
- ANDERSON, S. C. e RUXTON, G. D. **A Evolução do Voo em Morcegos: uma nova hipótese**. 4ª ed. Online Library: Revista de Mamíferos, v.50, p.426-439, 2020.
- BAKER, R. J.; HOOD, C. S. e HONEYCUTT, R. L. **Phylogenetic relationships and classification of the higher categories of the New World bat family Phyllostomidae**. Syst. Zool., v.38, p.228-238, 1989.
- BAKER, R. J.; PATTON, J. C.; PORTER, C. A.; VAN DEN BUSSCHE, R. A. **Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences**. Occas. Pap. Mus. Of Texas Tech University, n. 202, 2000.
- BARROS, M. A. S., **Bats (Mammalia, Chiroptera) from the Nísia Floresta National Forest, with new records for the state of Rio Grande do Norte, northeastern Brazil**. São Paulo, Biota Neotropica, p.08, 2021.
- BASANTES, M.; et al. **Sistemática e Taxonomia de *Tonatia saurophila* Koopman e Williams, 1951 (Chiroptera, Phyllostomidae)**. ZooKeys, 2020.
- BOYLES, J.G.; CRYAN, P. M.; MCCRACKEN, G. F. e KUNZ, T.H. **Economic importance of bats in agriculture**. Science, 2011.
- CHIES, T., et al. **O estudo da biodiversidade e evolução vegetal através de marcadores de DNA e citogenética: exemplos em Iridaceae e Poaceae**. Ed. Especial. Santa Maria: Ciência e Natura, vol.36, p.279-293, 2014.
- Chiroptera: Taxonomia. **BoldSystems**, 2023. Acessado em 22 de novembro de 2022. Disponível em: https://v3.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=12259
- CLARE, E. L. e JARRIN, P. V. **Sistemática de *Sturnira* (Chiroptera: Phyllostomidae) no Equador, com Comentários sobre Limites de Espécies**. Zootaxa, v.3630, 2013.
- CLARE, E. L.; LIM, B. K., FENTON, B. e HEBERT, P. D. **Morcegos Neotropicais: Estimando a Diversidade de Espécies com Códigos de Barras de DNA**. Plos One, 2011. Acessado em 13 de janeiro de 2023. Disponível em <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0022648>
- COOPER, L. N. e SEARS, K.E. **How to Grow a Bat Wing**. Bat evolution, ecology, and conservation, Springer, New York, p.3- 20, 2013.
- DA SILVA, P. C. **Integração dos Estudos Cromossômicos e DNA Barcoding em *Rhamphichthys* (Pisces: Gymnotiformes)**. Belém – PA: UFPA, p.83, 2016.
- DAYRAT, B. **The Roots of Phylogeny: How Did Haeckel Build His Trees**. Systematic Biology, 2003.

- DE ANDRADE, I. Z. **Caracterização citogenética molecular e estudo da variabilidade genética por marcadores ISSR e COI na espécie *Lonchorhina aurita* (Chiroptera: Phyllostomidae)**. Recife: UFPE/CCB, 2014.
- DE ARAÚJO, R. E. F. **Análise Ccitogenetica em Morcegos da Família Emballonuridae (Chiroptera) da Amazonia Brasileira através de Citogenética Clássica e Molecular**. Belém: UFPA, p-73, 2011.
- DE THOISY, B. D.; et al. **Cryptic Diversity in Common Mustached Bats *Pteronotus cf. parnellii* (Mormoopidae) in French Guiana na Brazilian Amapa**. Acta Chiroptera, 2014.
- DIAS, R. J. P.; ROSSI, M. F. e BARBOSA, B. C. **Avanços da Zooloia no Século XXI**. 1ª ed. Juiz de Fora – MG: Edição dos autores, 2019.
- DINIZ, E.M. **Os resultados da RIO +10**. Revista do Departamento de Geografia, v.15, p.31–35, 2002.
- FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M e JUNIOR, F. B. R. **Biotecnologia Estado da arte e Aplicações na Agropecuária**. Planaltina – DF: Embrapa, cap.02, p-31, 2011.
- FALEIRO, Fábio Gelape. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2007.
- FENTON, M. B. **Evolution of Echolocation: Bat Evolution, Ecology, and Conservation**, Springer, New York, p.70, 2013.
- FERREIRA, M. E. e GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: Embrapa - Cenargen, p.220, 1998.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3ª ed. Brasília: Embrapa, p-08, 1998.
- FERREIRA, W. A. S.; et al. **Phylogeography of the Dark Fruit-Eating Bat *Artibeus obscurus* in the Brazilian Amazon**. Oxford University Press: Journal of Heredity, 2013.
- FONSECA, R. S.; MASCARENHAS, M. J. O.; OLÍMPIO, A. P. M. **Polinização e Dispersão de Sementes por Morcegos e a sua Importância na Manutenção dos Ecossistemas**. Paraná, Editora Atena, cap.04, p-30, 2021.
- FREEMAN, P. W. **A multivariate study of the family Molossidae (Mammalia, Chiroptera): Morphology, Ecology, Evolution**. Fieldiana Zool., v. 7, p.1-1973, 1981.
- FREIRE, J. M. et al. **Estrutura Genética de Populações de *Schizolobium Parahyba* (Vell.) Blake (guapuruvu) por meio de Marcadores RAPD**. Scientia Florestalis, n.74, p-35, 2007.
- GOODMAN, S. M. e RANIVO, J. **The geographical origin of the type specimens of *Triaenops rufus* and *T.humbloti* (Chiroptera: Hipposideridae) reputed to be from Madagascar and the description of a replacement species name**. Mammalia: De Gruyter, vol.73, 2009.
- GREGORIN, R. e CIRRANELLO, A. **Phylogeny of Molossidae Gervais (Mammalia: Chiroptera) inferred by morphological data**. Cladistics, v. 32, n. 1, p. 2–35, 2016.

- GRIFFIN, D. R. e GALAMBOS, R. **The sensory basis of obstacle avoidance by flying bats.** Journal of Experimental Zoology, v.86, n.3, p.481-506, 1941.
- GROVER, A. e SHARMA, P. C. **Desenvolvimento e uso de marcadores moleculares: passado e presente.** Estados Unidos: Critical Reviews in Biotechnology, 36:2, 290-302, 2014.
- HANSEN, M. M.; TAGGART, J. B. e MELDRUP, D. **Development of New VNTR Markers for Pike and Assessment of Variability and Tetranucleotide repeat microsatelit loci.** Journal of Fish Biology, v.55, 1999.
- HOFFMANN, A. A. e WILLI Y. **Detectando Respostas Genéticas às Mudanças Ambientais.** National Library of Medicini: PubMed, 2008.
- JEFREY, A. J.; WILSON, V. e THEIN, S. L. **Regiões Hipervariáveis de Minissatélites no DNA Humano.** Revista Nature, v.314, 1985.
- JONES, G. e TEELING, E. **The Evolution of Echolocation in Bats.** Trends in Ecology & Evolution, v.21, n.3, p.149-156, 2006.
- KUNZ, T. H. e FENTON, M. B. **Bat Ecology.** University of Chicago Press, 2006.
- KUZMIN, I. V., et al. **Molecular Inferences Suggest Multiple host shifts of Rabirns Viruses from Bats to Mesocarnivores in Arizona during 2001-2009.** Plos Pathogens, 2012.
- LANZA, A. M.; GUIMARÃES, C. T.; SHUSTER, I. **Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético.** Viçosa-MG: Embrapa Biotecnologia, 2000.
- LEWIS-ORITT, N.; PORTER, C. A. e BAKER, R. J. **Molecular Sistematics of the Family Mormoopidae (Chiroptera) Based on Cytchrome b and RAG-2.** Molecular Phylogenetics and Evolution, v.214, 2001.
- LIMA, A. C. S., et al. **Novos registros do morcego orelhudo de Niceforo, Trynycteris nicefori (Sanborn. 1949) (Chiroptera, Phyllostomidae) para o estado do Maranhão, Brasil.** Brasil: ZooKeys, p.127-134, 2018.
- LIMA, A. C. S.; et al. **Ocorrência de *Sturnira tildae* De La Torre, 1959 (Chiroptera: Phyllostomidae) no estado do Maranhão, Brazil.** São Paulo: Pap. Avulsos Zool, vol.61, 2021.
- LORENZONI, R. M. **Os Marcadores Moleculares: Tipos e Aplicações.** Viçosa - MG: LaboGene Agrogenética, 2019. Acessado em 17 de fevereiro de 2023. Disponível em <https://www.laborgene.com.br/marcadores-moleculares/>
- LUZ, L. A. **Estrutura genética de populações da piranha vermelha, *Pygocentrus nattereri* (Characiformes: serrasalminae) com base no DNA mitocondrial e nuclear.** São Luís – MA: CCA/UEMA, 2014.
- MARCONI, M. A. e LAKATOS, E. M. **Fundamentos de Metodologia Científica.** 8ª ed. São Paulo: Atlas, 2017.
- MARTINS, L.; AMORIM, M. R. C. e CALDEIRA, A. J. R. **Origem e Importância Filogenética do DNA Mitocondrial.** Revista Multidisciplinar em Saúde: v.2, n.3, 2021.

MCCLELLAND, M. e WELSH, J. **Impressão Digital de Genomas usando PCR com Primers Arbitrários**. Pesquisa de Ácidos Nucleico: PubMed, 1990.

MEGANATHAN, P. R., et al. **Complete Mitochondrial Genome Sequences of Three Bats Species and Whole Genome Mitochondrial Analyses Reveal Patterns of Codon Bias na Lend Support to a Basal Split in Chiroptera**. *Gene*, v.492, 2012.

MENDES, S. B.; et al. **First record of *Cynomops planirostris* (Peters, 1865) (Chiroptera, Molossidae) from Maranhão state, Brazil, based on morphological and molecular data**. Vol.80. Caxias-Ma: Revista Brasileira de Biologia, 2020.

MORAES, P. S. S. **DNA barcode, da ictiofauna da bacia do rio mearim, Maranhão, Brasil**. Caxias – MA: CESC/UEMA, 2016.

MURCIA, A. C. A.; PROVETE, D. B.; FISCHER E. **Morcegos da Serra da Bodoquena**. Campo Grande – MS, Editora UFMS, p-52, 2023.

NORONHA, R. C. R.; et al. **Meiotic Analysis of XX/XY and neo-XX/XY sex Chromosomes in Chromosomes 15-XY rearrangement in Stenodematinae**. *Chromosome Research*, 2010.

NOVAES, R.L. M. **Estruturação populacional de *Myotis riparius* (Chiroptera, Vespertilionidae): uma abordagem integrativa a partir de dados genéticos, morfológicos e ecológicos**. Rio de Janeiro: UFRJ, p-91, 2017.

OLÍMPIO, A. P.; et al. **Expansão da área de distribuição conhecida do Morcego Lesser Bulldog, *Noctilio albiventris* Desmarest, 1818 (Chiroptera, Noctilionidae) no Cerrado Brasileiro**. *Check List*, 2018.

OLIVEIRA, A. J. **A cultura do *Carthamus tinctorius* L.: Principais usos e variabilidade genética**. São Paulo: Research, Society and Development, vol.10, 2021.

OLIVEIRA, A. J., et al. **Principais Marcadores Moleculares**. Mato Grosso: Research, Society and Development, 2021.

OLIVEIRA, E. J.; DANTAS, J. L. L.; CASTELLEN, M. S e MACHADO, M. D. **Identificação de Microssatélites para o Mamoeiro por meio da Exploração do Banco de dados de DNA**. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.30, 2008.

PAVAN, A. C. D. **Sistemática e história evolutiva do gênero de morcegos neotropical *Pteronotus* (Chiroptera: Mormoopidae)**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2014.

PEREIRA, J. S. B. **Seleção e Uso de Cavernas por Morcegos e suas Implicações para a Classificação de Relevância destes Ambientes**. Recife: UFPE/DZ, 2022.

Quem são os Morcegos? **Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros**, 2022. Acessado em 22 de novembro de 2022. Disponível em: <https://www.sbeq.net/morcegos>

RALLO, P., BELAJ, A., ROSA, D. L. e TRUJILLO, R. Y. I. **Marcadores Moleculares**. España, Cordoba, 2002. Acessado em 17 de fevereiro de 2023. Disponível em <https://extremadura21.com/2014/11/03/extremadura-dispone-de-119-almazaras-de-aceite-y-mas-de-150-bodegas-de-vino/almazara/>

- RAMOS, T. O. B. I. **Taxonomia molecular em morcegos (CHIROPTERA: MAMMALIA)** em três unidades de conservação da Caatinga. Recife: UFPE/CB, 2016.
- REGITANO, L. C. A. **Introdução à análise de marcadores moleculares**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.25-39, 2001.
- REIS, N. R.; PERRACHI, A. L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I. P. (Eds.). **Morcegos do Brasil**. Londrina: Nelio R. dos Reis, p. 145 -147, 2007.
- REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; ATISTA, C. B; LIMA, I. P., PEREIRA, A. D. **História Natural dos morcegos brasileiros, chave de identificação de espécies**. Rio de Janeiro, Tchinal Book Editora, 416p, 2017.
- REIS, N.L.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A. e LIMA, I.P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Editors, p.439, 2011.
- RIEGER, T. T.; CAMPOS, S. R. C. e SANTOS, J. F. **A Biologia Molecular como Ferramenta no Estudo da Biodiversidade**. Recife – PE: Floresta e Ambiente, 2006.
- RODRIGUES, L. R. R.; et al. **Chromosome Comparison Between Two Species of *Phyllostomus* (Chiroptera: Phyllostomidae) from Eastern Amazonia, with some Phylogenetic insights**. Genetics and Molecular Biology, v.23, 2000.
- SALOMON, G. R. **Análise Filogenética de Espécies Brasileiras Pertencentes as Famílias Vespertilionidae e Molossidae (Chiroptera)**. Guarapuava: UECO/PR, 2016.
- SCHNITZLER, H. U. e KALKO, E. K. **Echolocation by insect-eating bats**. Bioscience. v.51, n.7, 2001.
- SHEN, Y. Y., et al. **Adaptive Evolution of Energy Metabolism Genes and The Origin of Flight in Bats**. PNAS, v.107, n.19, 2010.
- SILVA, J. C. F. S. **Caracterização Genética de *Tonatia bidens* (Chiroptera: Phyllostomidae)**. Recife: UFPE, 2020.
- SIMMONS, N. B. e CIRRANELLO, A. L. **Bat Species of the World: A taxonomic and geographic database**. New York: American Museum of Natural History, 2022.
- SIMMONS, N. **Order Chiroptera in: Wilson DE, reeder DM. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference**. 3ª ed. Baltimore: Johns Hopkins University Pre4ss, 2005.
- SOUZA, E. M. S.; et al. **Variação da Heterocromatina e Distribuição do LINE-1 em *Artibeus* (Chiroptera, Phyllostomidae) da Amazônia Central, Brasil**. CompCytogen, 2017.
- TEELING, E. C., et al. **Bat Biology, Genomes, and the Bat1K Project: To Generate Chromosome-Level genomes for all living bat species**. Annual Review of Animal Biosciences, v.6, p.23-46, 2018.
- TOMASI, C. e MEDEIROS, J. B. **Comunicação científica: normas técnicas para redação científica**. 1ª ed. São Paulo: Atlas S.A, p.260, 2008.

TRINDADE, M. G. e CHAVES, L. J. **Genetic structure of natural *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) populations in northeastern Goiás, Brazil, accessed by morphological traits and RAPD markers.** Genetics and Molecular Biology, v.28, n.3, p-410, 2005.

VALADEZ, M. E. e KAHL, G. **Huellas de ADN em Genomas de Plantas.** México: Teoría e Protocolos de Laboratórios, p-147, 2000.

WILLIAMS, J. G. K. et al. **Polimorfismos de DNA Amplificados por Primers Arbitrários são uteis como Marcadores Genéticos.** Pesquisa de Ácidos Nucleicos: Scientific Research, 1990.