

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Utilidade filogenética de genes nucleares em  
comparação com gene mitocondrial para  
Phyllostomidae (Chiroptera)**

**Amanda Dasilio**

Vitória, ES

Fevereiro,

2016.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Utilidade filogenética de genes nucleares em  
comparação com gene mitocondrial para  
Phyllostomidae (Chiroptera)**

**Amanda Dasilio**

**Orientador:** Prof. Dr. Albert David Ditchfield

Dissertação submetida ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Vitória, ES

Fevereiro, 2016.

**Amanda Dasilio**

**Utilidade filogenética de genes nucleares em  
comparação com gene mitocondrial para  
Phyllostomidae (Chiroptera)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Albert David Ditchfield – UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sarah Maria Vargas - UFES

---

Prof. Dr. Áureo Banhos dos Santos - UFES

## **AGRADECIMENTOS**

Inicio meus agradecimentos aos meus pais, Osmar e Luzia, por terem me dado todas as oportunidades que tive para fazer o que eu sonhava desde a infância. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam a melhor de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser a melhor, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!

A Albert David Ditchfield, meu orientador, por me orientar por mais dois anos, pela ajuda e compreensão nos momentos em que eu não pude ficar tão presente no Laboratório.

A meu namorado, Rafael, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Obrigada por ter me puxado a orelha, me incentivado e me mimado quando eu mais precisava!

Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado.

Ao meu irmão, Victor, e minha cunhada, Sandra, meu agradecimento especial, pois, a seu modo, sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho. Agradeço também por deixarem meu sobrinho, Lucas, para animar minhas tardes, com seu jeitinho falante e carinhoso, preenchendo meu dia jogando infinitas partidas no XBOX e vendo filmes.

A meus tios, tias, primos e primas, especialmente tia Ana, que vibram comigo, em todas as aprovações que eu tive até hoje. Obrigada pelas suas orações e energias positivas que são enviadas diariamente para mim.

Só tenho a agradecer à minha “chefa” Miriam, diretora da escola que trabalho, sempre me dando suporte para fazer minhas disciplinas do mestrado, super compreensiva com minhas licenças para assistir congressos, palestras e aulas. Tento retribuir sempre através do meu trabalho, compensando qualquer ausência ao longo desses anos.

Aos Meus colegas professores, que divido meu dia-a-dia, os prazeres e desprazeres de lecionar em uma escola pública. Vocês fazem meu dia mais feliz, e me sinto mais realizada por ter colegas que compartilham comigo da ideia de lecionar um ensino de qualidade para nossos alunos, agradeço em especial à Ludmila e El-Buainin, meus companheiros e amigos.

Agradeço aos meus alunos queridos, não posso me esquecer daqueles que me dão tantas alegrias. Às vezes não sei quem está ensinando e quem está aprendendo, pois cada dia é um novo desafio pra mim. Poder fazer a diferença, de alguma forma positiva, na vida de cada um de vocês é o que me faz acordar tão cedo e manter o bom humor.

Minhas amigas mais antigas, Babi e Carol, que conseguem me tirar de casa e me incentivar a

praticar atividades físicas, mesmo quando estou acabada, só pensando em planejar aulas e ler artigos. Mas como diz o ditado “mente sã corpo são”, temos que buscar o equilíbrio, e vocês me estimulam para que o consiga.

Aos meus amigos que vou levar da graduação para a vida, Bruno, Pedro e Sâmia, me trazem leveza, humor e confiança. Sem vocês minha vida não seria a mesma. São amigos que posso contar a qualquer hora.

Ao meu estagiário maravilhoso, Júnior, sempre solícito para me ajudar, e eu sempre retribuirei da mesma forma.

À minha amiga linda Bruna, eternamente grata pelo conhecimento moléculóides, é claro, mas também por sempre estar ao meu lado, por ouvir meus desabafos e por confiar em mim nos momentos que mais precisa.

À Paollita, minha preciosidade, uma amiga maluquinha, que conheci de uma forma inesperada, mas que conquistou meu coração, e prezo muito pela nossa amizade e pela sua felicidade. Sempre estarei aqui para ser a sua irmã mais velha.

Marcella e Alexandre, por serem esse exemplo de casal para mim, e por me renderem boas risadas. Muito obrigada pelos nossos momentos juntos e por torcerem por mim.

À Clícia, minha amiga linda e nerd, por ter sempre uma palavra amiga e de conforto, pode ter certeza que te quero ao meu lado até ficarmos velhinhas, obrigada pelo suporte, por sempre estar presente.

A todos os integrantes do Laboratório de Estudos em Quirópteros (LABEQ) da UFES, pelos bons momentos e pelo apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado que permitiu o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores componentes da banca, pela disponibilidade de tempo para avaliar esse trabalho, o que será de grande valia para melhorar a qualidade dessa dissertação.

E a todos as pessoas que estiveram envolvidas de alguma forma com esse trabalho e com a minha formação acadêmica, desde professores, funcionários da UFES e colegas de graduação/mestrado.

“Há riqueza bastante no mundo para as necessidades do homem, mas não para a sua ambição.”

Mahatma Gandhi

## Resumo

Phyllostomidae, da subordem Microchiroptera, é uma família com uma grande variedade morfológica e de hábitos alimentares, com mais gêneros do que qualquer outra família de morcegos. Porém um grande desafio tem sido a resolução de suas relações filogenéticas principalmente devido ao paralelismo evolutivo e convergência entre linhagens. Várias tentativas foram feitas para resgatar as relações dentro dessa família, a fim de reconstruir suas transições evolutivas e identificar as relações entre gêneros, desde estudos morfológicos a moleculares. Entretanto, estas pesquisas em sua maioria, tem usado principalmente o DNA mitocondrial, com pouco sucesso com marcadores nucleares. Estudos apresentando incongruências entre filogenias têm se expandido rapidamente, derivadas, principalmente, de dados morfológicos em face de análises moleculares, ou até mesmo entre as árvores baseadas em diferentes subconjuntos de sequencias moleculares. Diante deste cenário, este trabalho teve como objetivo fazer uma investigação filogenética de cinco genes (um mitocondrial e quatro nucleares) a fim de identificar marcadores nucleares que apresentassem os melhores resultados para Phyllostomidae. Isso ainda não havia sido reportado na literatura para filostomídeos. Os genes selecionados para o estudo foram: dois éxons de genes nucleares recombination activating protein 2 (RAG2) e o gene for von Willebrand factor (VWF), dois íntrons Beta-Fibrinogênio (Fgb) e o B-spectrin non-erythrocytic 1 (SPTBN1), e um gene mitocondrial cytochrome oxidase subunit 1 (COI). A metodologia de obtenção das sequências nucleotídicas consistiu em extração do DNA total da célula, amplificação da região controle do DNA mitocondrial através da Reação em Cadeia da Polimerase, purificação do produto da PCR e sequenciamento. Sequências disponíveis no GenBank também foram utilizadas. Dentre os marcadores nucleares estudados os resultados das análises indicaram que o Beta-Fibrinogênio é o marcador nuclear mais promissor, estimulando futuros trabalhos moleculares com os morcegos filostomídeos utilizando esse gene.

**Palavras-chaves:** Phyllostomidae, investigação filogenética, marcadores nucleares, DNA mitocondrial.

## **Abstract**

Phyllostomidae, from the suborder Microchiroptera, is a family with great morphological variety and diverse eating habits, with more genera than any other family of bats. But a major challenge has been the resolution of its phylogenetic relationships, mainly due to rampant evolutionary convergence of parallel lines. Several attempts were made to rescue the relationships within the family in order to rebuild their evolutionary transitions and identify the relationships between genres, from morphological to molecular studies. However, these studies mostly have mainly used the mitochondrial DNA, with little success with nuclear markers. Studies showing inconsistencies between phylogenies have expanded rapidly, derived mainly from morphological data versus molecular analysis, or even the trees based on different subsets of molecular sequences. In this scenario, this study aimed to make a phylogenetic investigation of five genes (one mitochondrial and four nuclear) to identify nuclear markers that presented the best results for Phyllostomidae. It had not yet been reported in the literature for phyllostomid. The genes selected for the study were: two exons of nuclear recombination activating gene protein 2 (RAG2) and the gene for von Willebrand factor (vWF), two introns Beta-Fibrinogen (FGB) and the B-spectrin non-erythrocytic 1 (SPTBN1), and mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1 gene (IOC). The method of obtaining nucleotide sequences consisted of extraction of the total DNA of the cell, amplification of the mitochondrial DNA control region by Polymerase Chain Reaction, PCR product purification and sequencing. Sequences available in GenBank were also used. Among the nuclear markers studied, the results of our analysis indicate that Beta-Fibrinogen is the most promising nuclear marker, stimulating future molecular studies with phyllostomide bats using this gene.

**Keywords:** Phyllostomidae, investigação filogenética, nuclear markers, mitochondrial DNA.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Concentração dos reagentes e perfil das reações em cadeia da polimerase (PCR) para geração dos fragmentos dos genes COI, RAG2, VWF, BFB e SPTBN1. Nos perfis das PCRs são apresentadas a temperatura (em Celsius) seguida do tempo (em minutos e/ou segundos).....	22
<b>Tabela 2.</b> Estimativa de divergência de sequências (%) par a par entre grupos de COI de subfamílias Phyllostomidae. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.....	24
<b>Tabela 3.</b> Estimativa de divergência de sequências (%) par a par dentro das subfamílias de Phyllostomidae, utilizando o gene COI. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros. ....	24
<b>Tabela 4.</b> Estimativa de divergência de sequências (%) par a par entre grupos de RAG-2 de subfamílias Phyllostomidae. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.....	27
<b>Tabela 5.</b> Estimativa de divergência de sequências (%) par a par dentro das subfamílias de Phyllostomidae, utilizando o gene RAG-2. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.. ....	28
<b>Tabela 6.</b> Estimativa de divergência de sequências (%) par a par entre grupos de B-Fibrinogênio de subfamílias Phyllostomidae. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.....	30
<b>Tabela 7.</b> Estimativa de divergência de sequências (%) par a par dentro das subfamílias de Phyllostomidae, utilizando o gene B-Fibrinogênio. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.....	30
<b>Tabela 8.</b> Estimativa de divergência de sequências (%) par a par entre grupos de VWF de subfamílias Phyllostomidae. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros. ....	33
<b>Tabela 9.</b> Estimativa de divergência de sequências (%) par a par dentro das subfamílias de Phyllostomidae, utilizando o gene VWF. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.. ....	33

### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 10.</b> . Estimativa de divergência de sequências (%) par a par entre grupos de SPTBN1 de subfamílias Phyllostomidae. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.. .....	36
<b>Tabela 11.</b> Estimativa de divergência de sequências (%) par a par dentro das subfamílias de Phyllostomidae, utilizando o gene COI. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros... .....	36

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Filogenia molecular do citocromo c oxidase I gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco indica probabilidade posterior < 95% e preto ≥ 95%..... 25
- Figura 2.** . Filogenia molecular do citocromo c oxidase I gerada pelo método de Máxima Verossimilhança (MV)). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco para bootstrap ≤ 50%, cinza para 50 –70% e preto para ≥ 70%..... 26
- Figura 3.** Filogenia molecular do Recombination Activation Gene 2 gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco indica probabilidade posterior < 95% e preto ≥ 95%..... 28
- Figura 4.** Filogenia molecular do Recombination Activation Gene 2 gerada pelo método de Máxima Verossimilhança (MV)). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco para bootstrap ≤ 50%, cinza para 50 –70% e preto para ≥ 70%..... 29
- Figura 5.** . Filogenia molecular do Beta-Fibrinogênio gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco indica probabilidade posterior < 95% e preto ≥ 95%..... 31
- Figura 6.** Filogenia molecular do Beta-Fibrinogênio gerada pelo método de Máxima Verossimilhança (MV)). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco para bootstrap ≤ 50%, cinza para 50 –70% e preto para ≥ 70%. ..... 31
- Figura 7.** Filogenia molecular do VWF gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco indica probabilidade posterior < 95% e preto ≥ 95%..... 34
- Figura 8.** Filogenia molecular do VWF gerada pelo método de Máxima Verossimilhança (MV)). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco para bootstrap ≤ 50%, cinza para 50 –70% e preto para ≥ 70%..... 34
- Figura 9.** Filogenia molecular do SPTBN1 gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco indica probabilidade posterior < 95% e preto ≥ 95%..... 37
- Figura 10.** Filogenia molecular do SPTBN1 gerada pelo método de Máxima Verossimilhança (MV)). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco para bootstrap ≤ 50%, cinza para 50 –70% e preto para ≥ 70%..... 37

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 11.** Filogenia molecular concatenada das sequências de genoma mitocondrial (COI) e nucleares ( RAG2, Beta-Fibrinogênio, VWF e SPTBN1) gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco indica probabilidade posterior < 95% e preto ≥ 95%..... 39
- Figura 12.** Filogenia molecular proposta por Hoffmann *et al.*, 2008..... 44
- Figura 13.** Filogenia molecular de morcegos Phyllostomidae inferida a partir de uma concatenação das sequências de genomas mitocondriais completos de e nuclear marcadores VWF e RAG2 por Botero-Castro *et al*, 2013. .... 45

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	14
1.1 Marcadores Moleculares.....	14
1.2 Objeto de Estudo. ....	16
<b>2 Materiais e Métodos</b> .....	19
2.1 Amostras.....	19
2.2. Obtenção das sequências Nucleotídicas. ....	20
2.3 Análises Filogenéticas.....	22
<b>3 Resultados</b> .....	24
3.1 Análises Filogenéticas.....	24
3.1.1 Citocrommo C oxidase I.....	24
3.1.2 Recombination Activation Gene 2.....	27
3.1.3 Beta-Fibrinogênio.....	30
3.1.4 VWF.....	32
3.1.5 SPTBN1.....	35
3.1.6 Análise concatenada.....	39
<b>4. Discussão</b> .....	40
<b>5. Referências bibliográficas</b> .....	47
<b>Apêndice</b> .....	57

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MARCADORES MOLECULARES

Na era pré-molecular, estimativas de parentesco e filogenia eram feitas utilizando-se comparações de dados fenotípicos de morfologia, fisiologia, comportamento ou outras características possíveis de observação (AVISE, 2000). Classicamente, estudos de taxonomia eram baseados exclusivamente na análise de caracteres morfológicos, porém se constatou que essa metodologia possui limitações, uma vez que a convergência de função de certos caracteres pode levar a uma uniformidade aparente. Isso dificulta a distinção de indivíduos, principalmente quando se trata do reconhecimento de táxons crípticos (HEBERT *et al.*, 2003).

Os campos de ecologia e evolução molecular tiveram seu início na segunda metade do século XX. Inicialmente eram analisados dados de imunologia e proteínas, e desde então, gradualmente, marcadores moleculares tem sido empregados em estudos de comportamento do organismo, história natural e relações filogenéticas. Entre os vários apelos práticos do uso de marcadores moleculares, pode-se destacar o fato de oferecerem acesso à base fundamental da mudança evolutiva: o polimorfismo de DNA (AVISE, 2000).

Por uma série de propriedades, Avise (1987) defende que marcadores moleculares mitocondriais são os mais interessantes em inferências filogenéticas. Essas características consistem em: marcador amplamente distribuído em diversos organismos (permitindo comparações entre diferentes grupos); estrutura genética simples, ou seja, sem DNA repetitivo, elementos transponíveis e/ou íntrons; fácil de

isolar e estudar; herança sem recombinação; evolução rápida.

Sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) são frequentemente utilizadas para estimar as filogenias de táxons que divergiram recentemente, pelo fato de que o mtDNA evolui rapidamente, mas tem partes funcionais mais conservadas que permitem comparações entre táxons bem distintos. Mesmo assim, a sua utilidade é limitada porque os genes mitocondriais são herdados como um único grupo de ligação (haplótipo) e fornecem apenas uma estimativa independente da árvore de espécie. Esta representação pode ser enganosa, não recuperando a totalidade das histórias das populações através das quais os alelos foram transmitidos, pois sua herdabilidade é uniparental, de origem materna, não tendo padrões genealógicos que sejam representativos para toda a história das populações. O resultado encontrado pode ser uma árvore do gene que pode não ser congruente com a árvore de espécies de um grupo (MOORE, 1995).

Há um crescente consenso de que uma única sequência para inferência filogenética pode ser enganosa, assim sendo, inferências sistemáticas moleculares podem ser consideradas com forte embasamento a partir de sequências independentes que demonstrem um mesmo resultado (MIYAMOTO E CRACRAFT, 1991).

Um conjunto de genes nucleares pode ser selecionado, de tal forma que cada árvore de gene fornece uma estimativa independente da árvore de espécies. É claro, os entrenós experimentados por qualquer dos genes mitocondriais ou nucleares são idênticos, mas o tamanho efetivo de um gene mitocondrial de uma população é menor do que a de um gene nuclear-autossômico, portanto, a árvore de gene mitocondrial tem uma melhor chance de acompanhar a árvore de espécies do que qualquer árvore de gene nuclear único. A expectativa da filogenia molecular não é apenas que as árvores de genes reflitam com precisão a história filogenética das espécies investigadas, mas

que os métodos sejam econômicos e eficientes. É importante, por conseguinte, determinar as eficiências relativas de árvores mitocondriais, árvores de gene nuclear, e conjuntos de várias árvores de genes nucleares em recuperar a árvore de espécies. (MOORE, 1995)

Devemos levar em consideração também que apesar de todos os caracteres em um organismo compartilharem uma história evolutiva em comum que pode ser estimada utilizando métodos filogenéticos, suas diferenças nos mecanismos evolutivos de cada característica do indivíduo sofre uma pressão seletiva distinta, levando a conflitos nas análises filogenéticas. Assim, as análises, mesmo tendo um grande conjunto de dados, com frequência apresentam conflito filogenético em seus táxons. (WADDELL *et al*, 1999; JEFFROY *et al.*, 2006; RODRÍGUEZ-EZPELETA *et al.*, 2007. D'AVALOSI *et al*, 2012).

## 1.2 OBJETO DE ESTUDO

Phyllostomidae, da subordem Microchiroptera, é uma família com grande variedade morfológica e de hábitos alimentares, contendo mais gêneros do que qualquer outra família de morcegos, com 161 espécies distribuídas em 55 gêneros. Várias tentativas foram feitas para resolver as relações filogenéticas dentro dessa família, a fim de reconstruir suas transições evolutivas e identificar as relações entre gêneros (WETTERER *et al*, 2000; DATZMANN; VON HELVERSEN;; MAYER, 2010; CLARE, 2007; MARTINS *et al.*, 2009; CLARE, 2011; BOTERO-CASTRO *et al*, 2013) e os resultados encontrados foram cladogramas não informativos e filogenias que não corroboraram.

Estudos apresentando incongruências entre filogenias têm sido publicados com crescente frequência, principalmente, em confronto de dados morfológicos em face de



análises moleculares, ou até mesmo entre as árvores baseadas em diferentes subconjuntos de sequências gênicas. Há tempos que estudos das relações evolutivas de membros da família dos morcegos do Novo Mundo, Phyllostomidae, apresentam conflitos de resultados quando inferidos ora por métodos moleculares, e ora por métodos morfológicos (D'AVALOSI *et al*, 2012).

Apesar de serem bem estudados, os morcegos filostomídeos também são passíveis de incongruências, e superá-las requer melhores modelos e cada vez mais dados do grupo (WETTERER *et al*, 2000; BAKER *et al.*, 2003, D'AVALOSI *et al*, 2012)

Análises posteriores de grandes conjuntos de dados moleculares confirmaram conflito significativo, corroborando os aspectos da filogenia de Baker *et al.* (2003) em detrimento de análises morfológicas (DATZMANN; VON HELVERSEN; MAYER, 2010).

Muitos estudos com morcegos tem sido realizados utilizando DNA mitocondrial (mtDNA), principalmente em se tratando de estudos filogeográficos e de sistemática molecular (DITCHFIELD, 199 ; DITCHFIELD, 2000; HOFFMANN E BAKER, 2001; MARTINS *et al.*, 2007; REDONDO *et al.*, 2008; PAVAN *et al.*, 2011; VELAZCO E PATTERSON, 2013). Dentre os marcadores moleculares mitocondriais mais utilizados estão o citocromo *b* (Cit-*b*) e o citocromo *c* oxidase I (COI).

Infelizmente, esses genes, oferecem a visão de um único marcador ligado ao genoma de uma organela, e existe um consenso de que para se amostrar a história de um organismo, provavelmente seria interessante abranger tanto genes nucleares quanto de organelas, pelo motivo já citado de que as árvores gênicas podem ser diferentes de árvores de organismos. Bases de dados informatizadas como o GenBank tem sequências diversas de vários genes e estão crescendo num ritmo rápido, fornecendo uma rica fonte de genes suscetíveis de conterem informações filogenéticas sobre muitos níveis de divergência. Infelizmente, pouca atenção tem sido dada para a

estimativa e a avaliação da utilidade filogenética de genes nucleares na resolução das relações filogenéticas em famílias.

Pesquisas recentes têm mostrado que a abordagem molecular é uma poderosa ferramenta no reconhecimento de clados que podem ter escapado do reconhecimento pela taxonomia tradicional devido a sua convergência morfológica nessa família. Podemos citar o exemplo do gênero *Carollia*, de difícil diferenciação morfológica entre as espécies (PINE, 1972; MCLELLAN, 1984; SOLARI E BAKER, 2006; BARRATT *et al.*, 1997; HÄUSSLER *et al.*, 2000).

Entretanto, muitos estudos tem tido dificuldades ao tentar resolver filogenias através de marcadores moleculares. Em pesquisa feita por Datzmann, von Helversen e Mayer (2010), foram encontrados grupos parafiléticos nos gêneros da subfamília Glossophaginae, não conseguindo resolver as relações evolutivas dos nectanívoros, permanecendo assim inconclusiva

Clare (2011) obteve resultados de clados não informativos em sua investigação dentro de alguns gêneros de Phyllostomidae. Em recente pesquisa da família Phyllostomidae (BOTERO-CASTRO *et al.*, 2013) foram analisadas 10 espécies e suas relações, com diferentes métodos operacionais, e os resultados das filogenias encontradas não corroboraram. Claramente os resultados encontrados através de marcadores moleculares até o momento são inconclusivos para Phyllostomidae, por isso há a necessidade de buscar novos marcadores moleculares, o que se propõe no presente estudo, sendo, tal desígnio, inédito na literatura para Phyllostomidae.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAS

As amostras de tecido hepático ou muscular que foram utilizadas encontram-se no banco de tecidos do Laboratório de Estudos de Quirópteros (LABEQ). Foram contemplados táxons correspondentes a oito subfamílias de Phyllostomidae: Glossophaginae, Desmondotinae, Phyllostominae, Carrollinae, Micronycterinae, Macrotinae, Lonchophyllinae e Sternodermatinae.

Sequências disponíveis no GenBank também foram utilizadas. As sequências utilizadas neste estudo estão listadas nas tabelas 1 até 10 do apêndice. Os genes selecionados para o estudo dos grupos foram: dois éxons de genes nucleares recombination activating protein 2 (RAG2) e o gene for von Willebrand factor (VWF), dois íntrons Beta-Fibrinogênio (Fgb) e o B-spectrin non-erythrocytic 1 (SPTBN1), e um gene mitocondrial cytochrome oxidase subunit 1 (COI) objetivando analisar diferentes taxas evolutivas gênicas para comparação dos resultados.

Do gene COI foram geradas sequências de 32 indivíduos, depositadas no LABEQ. E 18 sequências foram obtidas do GenBank, de estudos já publicados. Assim foram analisadas sequências de 51 indivíduos.

Sequências do gene nuclear RAG2 foram obtidas de 26 indivíduos provenientes do LABEQ. Treze sequências de indivíduos foram obtidas do GenBank. Assim foram analisadas sequências de 39 indivíduos.

Sequências do gene nuclear VWF foram obtidas de 16 indivíduos provenientes do LABEQ. Vinte sequências de indivíduos foram obtidas do GenBank. Assim foram analisadas sequências de 36 indivíduos.

Do gene Beta-Fibrinogênio foram geradas sequências de 30 indivíduos, depositadas no LABEQ. E 4 sequências foram obtidas do GenBank, de estudos já publicados. Assim foram analisadas sequências de 34 indivíduos.

Sequências do gene nuclear SPTBN1 foram obtidas de 21 indivíduos provenientes do LABEQ. Quatro sequências de indivíduos foram obtidas do GenBank. Assim foram analisadas sequências de 25 indivíduos.

## **2.2 OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS**

As extrações de DNA foram realizadas a partir de amostras de tecidos hepáticos ou musculares mantidos em álcool absoluto a -20°C. O protocolo de extração de DNA total (SDS/NaCl/Proteinase K) seguiu a técnica descrita por Bruford *et al.* (1992). As condições do DNA obtido foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com o corante Blue Green® (LGC Biotecnologia) e visualizado sob luz ultravioleta.

As amplificações foram feitas através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi feita para cinco marcadores moleculares: um mitocondrial e quatro nucleares. Os genes mitocondriais do citocromo c oxidase I (COI) foram amplificados utilizando o par de primers LCO 1490 e HCO 2198 (FOLMER *et al.*, 1994). Para amplificar o gene nuclear RAG2, “recombination activating gene 2”, foi utilizado o par de primers RAG2F1 e RAG2R2 (BAKER *et al.*, 2000). Para amplificar o gene nuclear bfb, “beta fibrinogen”, BF1 E BF2 (PORTER *et al.* 2007). O gene nuclear VWF, “gene for von Willebrand factor”, foi utilizado o par de primers VWFR 49 e VWFR 50 (BOTERO-CASTRO, 2013). O gene nuclear SPTBN1, “B-spectrin non-erythrocytic 1”, foi utilizado o par de primers

SPTBN11R e SPTBN11F (MATTHEE *et al.*, 2004). Os perfis adotados para as reações de PCR são apresentados na Tabela 1.

Após a amplificação, o tamanho dos produtos de PCR foi estimado utilizando gel de agarose 2% e marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen, Inc.). Em seguida, os produtos de PCR foram purificados com enzimas do kit Exo-Sap-IT (USB-Corporation) a fim de se eliminarem potenciais inibidores do sequenciamento. O equipamento ABI 3500<sup>®</sup> foi utilizado para sequenciar os segmentos de DNA utilizados e as reações de sequenciamento foram realizadas com o kit para sequenciamento BigDYE<sup>®</sup>, seguindo protocolo sugerido pelo fabricante. A reação de sequenciamento foi unidirecional, utilizando-se os iniciadores LCO 1490, RAG2F1, BF1, VWFR49, SPTBN11R, e realizada no Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade (NGACB) da UFES.

O programa MEGA v.5.05 (TAMURA *et al.*, 2011) foi utilizado para o alinhamento das sequências de DNA através do algoritmo *Clustal W* seguido de correções manuais, quando necessárias. Para cada fragmento obtido foi conduzida uma pesquisa comparativa de similaridade no GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) com o objetivo de verificar a ocorrência de contaminação e a fidelidade dos iniciadores em amplificar as regiões alvos.

**Tabela 1.** Concentração dos reagentes e perfil das reações em cadeia da polimerase (PCR) para geração dos fragmentos dos genes COI, RAG2, VWF, BFB e SPTBN1. Nos perfis das PCRs são apresentadas a temperatura (em Celsius) seguida do tempo (em minutos e/ou segundos).

<b>Marcador</b>	<b>COI</b>	<b>RAG2</b>	<b>VWF</b>	<b>BFB</b>	<b>SPTBN1</b>
<b>Mix PCR</b>					
Tampão	1x	1x	1x	1x	1X
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	2,0 mM	2,0 mM	2,5 mM	2,5 mM
dNTPs	200 uM	200 uM	200 uM	200 uM	200 uM
Iniciadores	0,4 uM	0,4 uM	0,4 uM	0,4 uM	0,2 uM
Easy Taq	0,7 u	0,75 u	0,75 u	0,7 u	0,75 uL
Volume total	15 uL	15 uL	15 uL	15 uL	15 uL
<b>Perfil PCR</b>					
Denaturação inicial	94°C - 1'	95°C - 2'	95°C - 3'	94°C - 1'	94°C - 30"
Número de ciclos	35	35	39	35	35
Denaturação	94°C - 1'	95°C - 30"	95°C - 30"	94°C - 1'	94°C - 30"
Anelamento	53°C - 1'30"	60°C - 30"	55°C - 40"	55°C - 1'30"	55°C - 30"
Extensão	72°C - 1'	72°C - 2'	72°C - 2'30"	72°C - 1'	72°C - 60"
Extensão final	72°C - 10'	72°C - 10'	72°C - 7'	72°C - 10'	72°C - 10'

### 2.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Antes de aplicar os métodos filogenéticos foi verificado o grau de saturação das bases nucleotídicas dentro das sequências de DNA pelo programa DAMBE (XIA E XIE, 2001).

Foram realizadas análises filogenéticas através dos métodos de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB). O melhor modelo evolutivo foi obtido pelo programa jModeltest 2.1.4 (DARRIBA *et al.*, 2012).

A análise de MV foi gerada pela plataforma *online* PhyML (GUINDON E GASCUEL, 2003), testada por 1000 replicações de bootstrap. A análise Bayesiana foi realizada no programa Mr. Bayes 3.1 (HUELSENBECK *et al.*, 2001; RONQUIST E

HUELSENBECK, 2003), com um total de 3 milhões de gerações para as cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC). A definição da melhor topologia pelo método MCMC baseia-se no algoritmo Metropolis-Hastings para a busca. De acordo com este método, o programa estima a verossimilhança de uma árvore dado um valor inicial de theta. Na próxima etapa, o programa faz um rearranjo na topologia da árvore e calcula de novo o valor de verossimilhança para esta nova topologia. Tal topologia pode então ser aceita ou rejeitada com base na comparação do seu valor de verossimilhança com relação à topologia anterior, e assim sucessivamente, num processo que cria uma cadeia de Markov. Valores amostrados a partir desta cadeia geram uma curva de valores de verossimilhança, permitindo acessar o melhor valor do parâmetro estimado dada a sua matriz de sequências, bem como a variância dessa estimativa (KUHNER *et al.*, 1998). A amostragem das cadeias foi realizada a cada 100 gerações e o tempo para o estabelecimento da fase estacionária (*burn in time*), corresponderam aos 25% das amostras obtidas. As filogenias foram editadas utilizando o programa FigTree 1.3.1 (RAUMBAUT, 2007).

Sequências de indivíduos utilizados como grupo externo foram obtidas do GenBank. Para o COI, o grupo externo consistiu em um indivíduo de *Natalus tumidirostris* e *Noctilio leporinus*. Para o Rag-2, *Noctilio albiventris* e *Noctilio leporinus*. Já para o VWF, *Noctilio leporinus* e *Myotis daubentonii*.

Distâncias genéticas entre e dentro dos grupos encontrados nas filogenias foram calculadas no programa MEGA v.5.05 (Tamura *et al.*, 2011), utilizando-se o método Kimura 2- Parâmetros (K2P).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

##### 3.1.1 Citocromo c oxidase I

Foram obtidos 657 pb, de 51 indivíduos. As distâncias genéticas foram calculadas entre e dentro das sete subfamílias, utilizando como grupo externo *Natalus tumidirostris* e *Noctilio leporinus*.

**Tabela 2.** Estimativa de divergência de sequências (%) par a par entre grupos de COI de subfamílias Phyllostomidae. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.

	Stenodermatinae	Phyllostominae	Desmondotinae	Lonchophyllinae	Glossophaginae	Carolliinae
Stenodermatinae						
Phyllostominae	21,98%					
Desmondotinae	24,33%	24,79%				
Lonchophyllinae	22,29%	22,62%	25,32%			
Glossophaginae	23,58%	23,73%	26,58%	23,57%		
Carolliinae	20,96%	21,67%	25,01%	20,48%	20,42%	
Micronycterinae	22,88%	22,82%	23,63%	23,19%	23,77%	21,62%

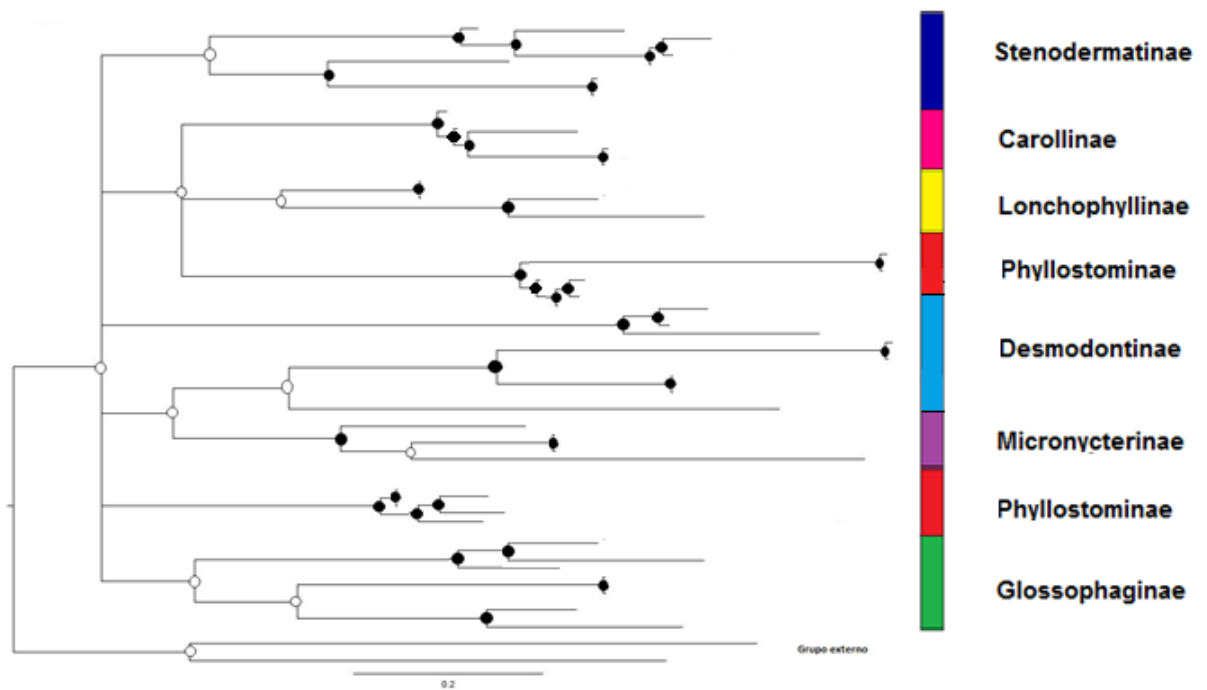
**Tabela 3 .** Estimativa de divergência de sequências (%) par a par dentro das subfamílias de Phyllostomidae, utilizando o gene COI. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.

Subfamílias	Distâncias
Stenodermatinae	14,66%
Phyllostominae	20,94%
Desmondotinae	17,42%
Lonchophyllinae	21,10%
Glossophaginae	16,37%
Carolliinae	2,06%
Micronycterinae	18,08%

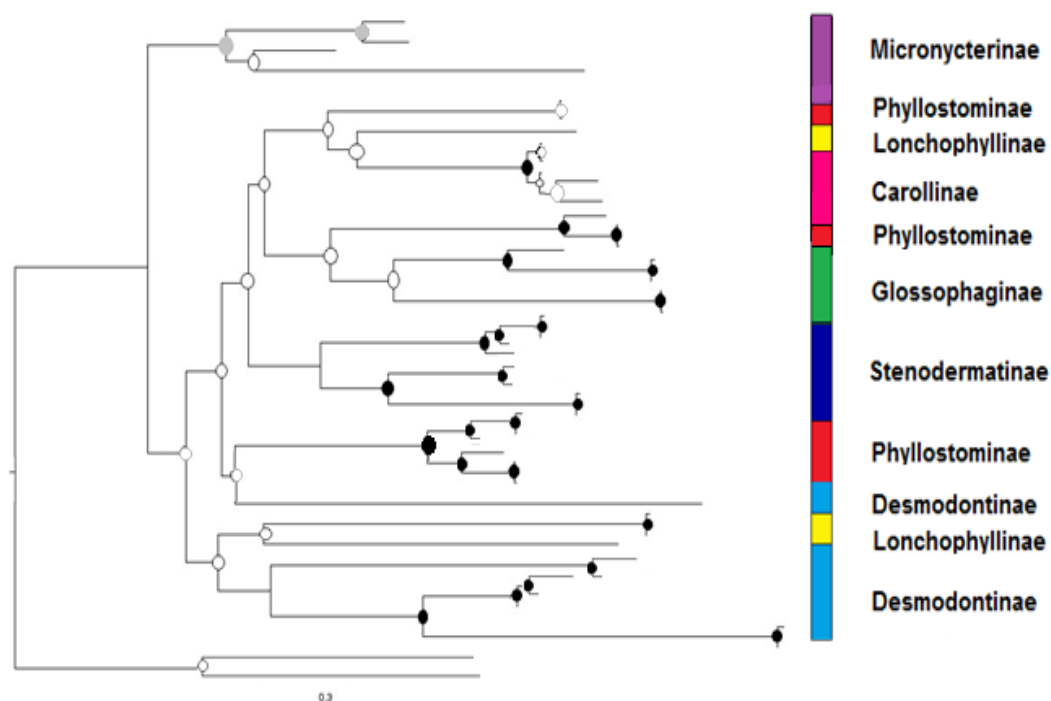


Foram obtidos 657 pb de COI, de 48 indivíduos (29 neste trabalho e 18 do GenBank). O primeiro par de bases das sequências iniciou na posição 32 do gene.

Os conjuntos de dados não apresentaram saturação de substituições de base significativa pelo índice de saturação do método de Xia e Xie (2001). O programa jModeltest selecionou os modelos evolutivos mais apropriados para os conjunto de dados. O mesmo modelo foi selecionado para as duas análises filogenéticas realizadas (IB e MV), com  $\gamma = 0,9130$  e taxa de transição transversão = 6,1344 (HKY+G).



**Figura 1.** Filogenia molecular do citocromo *c* oxidase I gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco indica probabilidade posterior < 95% e preto  $\geq$  95%.



**Figura 2.** Filogenia molecular do citocromo *c* oxidase I gerada pelo método de Máxima Verossimilhança (MV). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco para bootstrap  $\leq 50\%$ , cinza para 50–70% e preto para  $\geq 70\%$ .

Os conjuntos de dados não apresentaram saturação de substituições de base significativa pelo índice de saturação do método de Xia e Xie (2001). O programa jModeltest selecionou os modelos evolutivos mais apropriados para os conjunto de dados. O mesmo modelo foi selecionado para as duas análises filogenéticas realizadas (GTR+I+G) com  $\gamma=0.9130$  e com proporção de sítios invariantes ( $p\text{-inv} = 0,5710$ ).

As distâncias interclados variaram de 24,8% a 20,4% (Tabela 2) e as distâncias dentro das subfamílias variaram de 21,10% a 2,06% (Tabela 3), sendo a primeira referente à subfamília Lonchophyllinae e a segunda, tendo a menor distância, na subfamília Carollinae.

A Figura 1 apresenta a filogenia pelo método de Inferência Bayesiana (IB) e a figura 2 apresenta a filogenia pelo método de Máxima Verossimilhança. As cores na filogenia seguem as dos grupos formados pelas subfamílias. Na análise Bayesiana

foram resgatadas as relações com excelentes suportes, no qual somente Phyllostominae não apresentou monofilia. Enquanto que na filogenia de MV os melhores suportes são equivalentes às relações entre os gêneros das subfamílias, com baixo suporte nas posições de grandes clados. As subfamílias Phyllostominae, Lonchophyllinae e Desmodontinae apresentaram-se parafiléticas, todavia com suportes.

### 3.1.2 Recombination Activation Gene 2

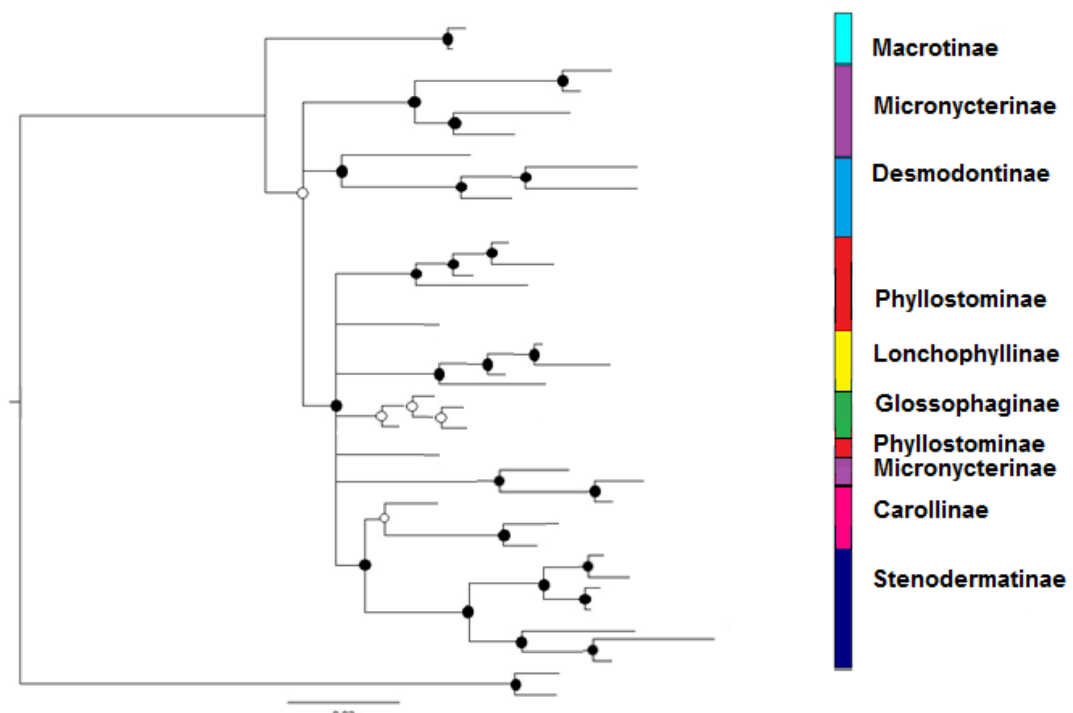
Foram obtidos 1363 pb, de 39 indivíduos. As distâncias genéticas foram calculadas entre e dentro das oito subfamílias, utilizando como grupo externo *Noctilio albiventris* e *Noctilio leporinus*.

**Tabela 4.** Estimativa de divergência de sequências (%) par a par entre grupos de RAG-2 de subfamílias Phyllostomidae. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.

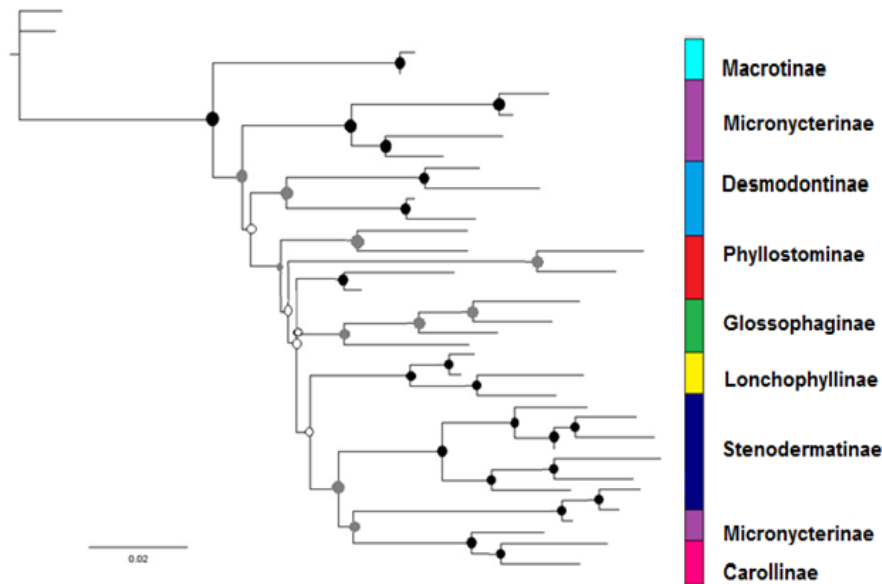
	Stenodermatinae	Phyllostominae	Micronicterinae	Macrotinae	Lonchophyllinae	Glossophaginae	Desmodontinae	Caroliinae	
Stenodermatinae									
Phyllostominae	4,43%								
Micronicterinae	4,93%	4,62%							
Macrotinae	4,63%	4,15%	4,45%						
Lonchophyllinae	4,45%	3,73%	4,44%	4,12%					
Glossophaginae	4,06%	3,92%	4,41%	4,31%	3,24%				
Desmodontinae	4,76%	4,25%	4,59%	3,86%	4,11%	4,32%			
Caroliinae	4,02%	4,10%	4,64%	4,41%	3,95%	3,61%	4,01%		
Grupo externo	7,88%	7,11%	7,58%	6,44%	7,23%	7,48%	7,37%	7,48%	

**Tabela 5.** Estimativa de divergência de sequências (%) par a par dentro das subfamílias de Phyllostomidae, utilizando o gene RAG-2. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.

Subfamília	Distâncias
Stenodermatinae	1,89%
Phyllostominae	3,85%
Micronycterinae	3,45%
Macrotinae	0,17%
Lonchophyllinae	1,59%
Glossophaginae	2,95%
Desmodontinae	2,81%
Caroliinae	1,00%



**Figura 3.** Filogenia molecular do Recombination Activation Gene 2 gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco indica probabilidade posterior < 95% e preto  $\geq$  95%.



**Figura 4.** Filogenia molecular do Recombination Activation Gene 2 gerada pelo método de Máxima Verossimilhança (MV). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco para bootstrap  $\leq 50\%$ , cinza para 50–70% e preto para  $\geq 70\%$ .

Os conjuntos de dados não apresentaram saturação de substituições de base significativa pelo índice de saturação do método de Xia e Xie (2001). O programa jModeltest selecionou os modelos evolutivos mais apropriados para os conjunto de dados. O modelo evolutivo selecionado pelo critério Akaike e Bayesiano foi o K80+G, com  $kappa=7.9736$  e  $gamma=0.2560$  ( $ti/tv = 3.9868$ ) e GTR+I+G ( $p\text{-inv} = 0.4710$ ) e  $gamma=1.0310$ , respectivamente.

As distâncias interclados variaram de 3,61% a 7,88% (Tabela 4) e as distâncias dentro das subfamílias variaram de 3,85% a 0,17% (Tabela 5), sendo a primeira referente à subfamília Phyllostominae e a segunda, tendo a menor distância, na subfamília Macrotinae, no geral os valores apresentados são uniformes e baixos, quando comparados com o gene mitocondrial COI.

A Figura 3 apresenta a filogenia pelo método de Inferência Bayesiana (IB) e a figura 4 apresenta a filogenia pelo método de Máxima Verossimilhança. As cores na

filogenia seguem as dos grupos formados pelas subfamílias. Na Inferência IB ( Figura 3), duas subfamílias apresentaram parafilia, Micronycterinae e Phyllostominae, algumas relações permaneceram não resolvidas, com baixos suportes e resolução duvidosa. Na figura 4, a filogenia propostapelo método MV resgatou a monofilia da maioria, exceto de Micronycterinae, com suportes acima de 50% no geral.

### 3.1.3 Beta-Fibrinogênio

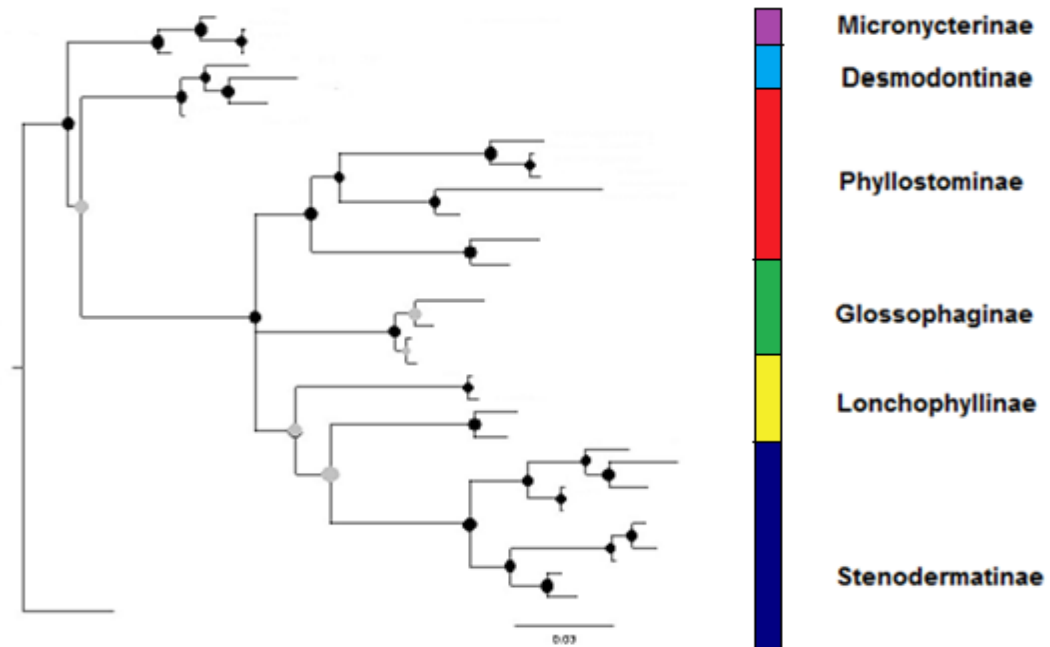
Foram obtidos 736 pb, de 34 indivíduos. As distâncias genéticas foram calculadas entre e dentro de seis subfamílias, utilizando como grupo externo *Natalus stramineus*.

**Tabela 6.** Estimativa de divergência de sequências (%) par a par entre grupos de B-Fibrinogênio de subfamílias Phyllostomidae. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.

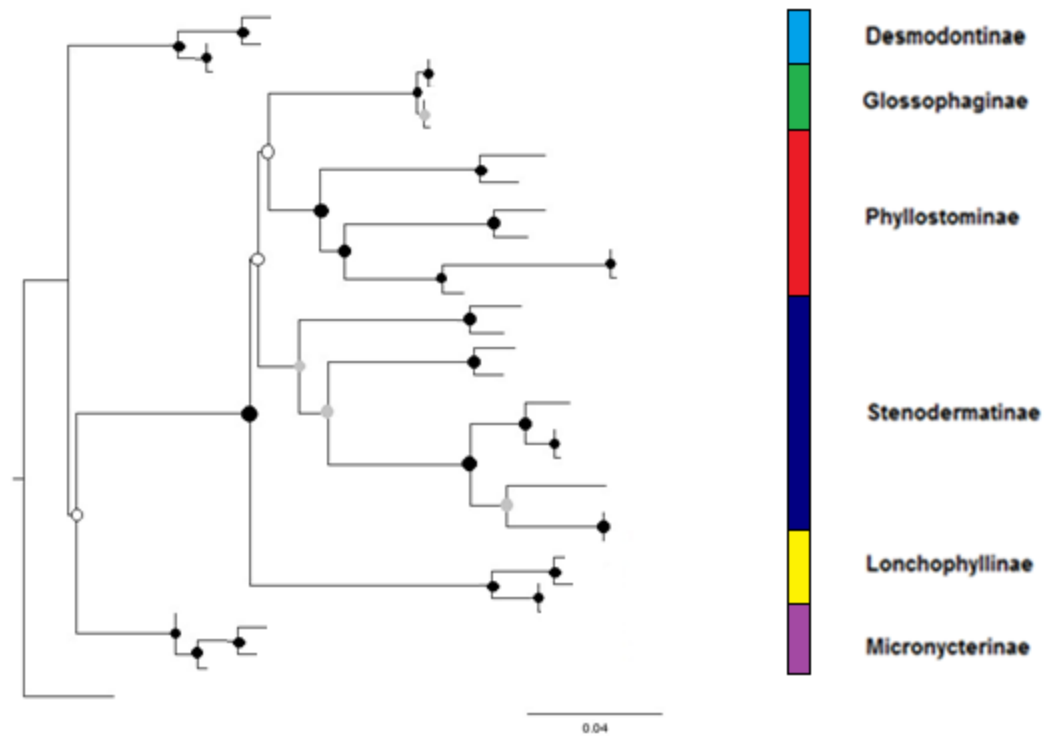
	Desmodontinae	Phyllostominae	Lonchophyllinae	Stenodermatinae	Micronycterinae	Glossophaginae
<b>Desmodontinae</b>						
<b>Phyllostominae</b>	10,43%					
<b>Lonchophyllinae</b>	11,72%	12,82%				
<b>Stenodermatinae</b>	12,17%	11,57%	13,69%			
<b>Micronycterinae</b>	15,60%	16,16%	17,06%	13,92%		
<b>Glossophaginae</b>	9,99%	10,45%	11,11%	10,66%	13,59%	
<b>Grupo_externo</b>	14,05%	14,21%	15,15%	10,07%	9,79%	11,93%

**Tabela 7.** Estimativa de divergência de sequências (%) par a par dentro das subfamílias de Phyllostomidae, utilizando o gene B-Fibrinogênio. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.

Subfamília	Distâncias
Desmodontinae	10,96%
Phyllostominae	7,82%
Lonchophyllinae	6,37%
Stenodermatinae	10,25%
Micronycterinae	12,52%
Glossophaginae	0,42%



**Figura 5.** Filogenia molecular do Beta-Fibrinogênio gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco indica probabilidade posterior  $< 95\%$  e preto  $\geq 95\%$ .



**Figura 6.** Filogenia molecular do Beta-Fibrinogênio gerada pelo método de Máxima Verossimilhança (MV). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco para bootstrap  $\leq 50\%$ , cinza para  $50 - 70\%$  e preto para  $\geq 70\%$ .

Os conjuntos de dados não apresentaram saturação de substituições de base significativa pelo índice de saturação do método de Xia e Xie (2001). O programa jModeltest selecionou os modelos evolutivos mais apropriados para os conjunto de dados. O modelo evolutivo selecionado pelo critério Akaike e Bayesiano foi o GTR+G com  $\gamma=1.0490$  e K80+G, com  $\kappa=3.2917$  ( $t_i/t_v = 1.6458$ ) e  $\gamma= 1.0530$ , respectivamente.

A Figura 5 apresenta a filogenia pelo método de Inferência Bayesiana (IB) e a Figura 6 apresenta a filogenia pelo método de Máxima Verossimilhança. As cores na filogenia seguem as dos grupos formados pelas subfamílias.

As distâncias genéticas foram calculadas entre e dentro de seis subfamílias, as distâncias interclados variaram de 15,15% a 9,79% (Tabela 5) e as distâncias dentro das subfamílias variaram de 12,52% a 0,42% (Tabela 6), sendo a primeira referente à subfamília Micronycterinae e a segunda, tendo a menor distância, na subfamília Glossophaginae.

#### **3.1.4 VWF**

Foram obtidos 1007 pb, de 36 indivíduos. As distâncias genéticas foram calculadas entre e dentro de sete subfamílias, utilizando como grupo externo *Noctilio leporinus* e *Myotis daubentonii*.

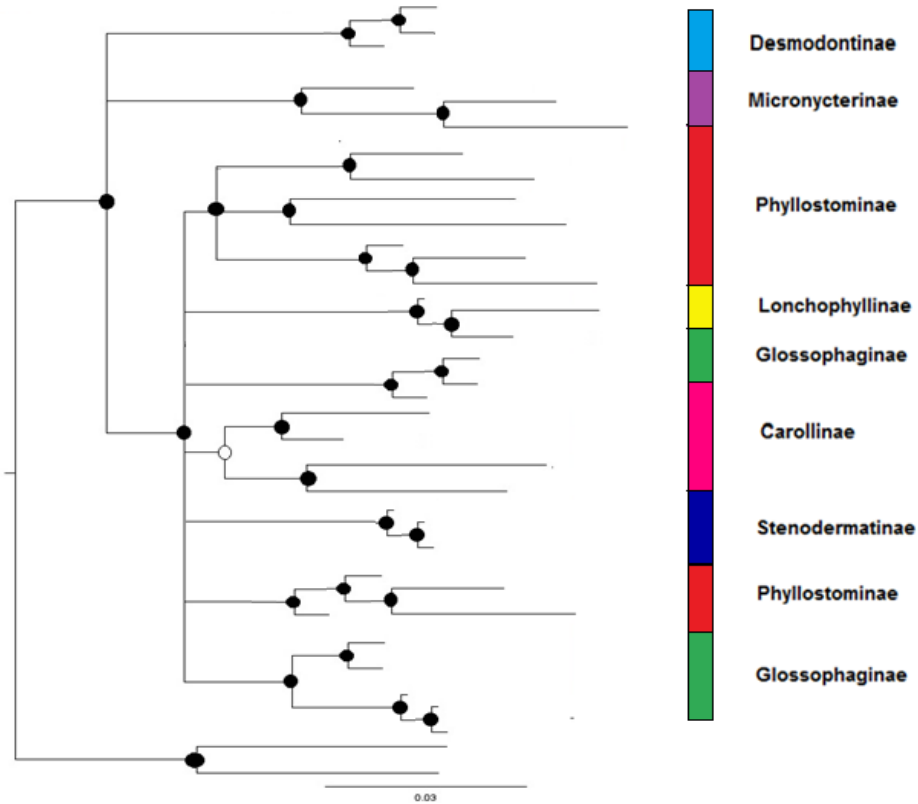


**Tabela 8.** Estimativa de divergência de sequências (%) par a par entre grupos de VWF de subfamílias Phyllostomidae. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.

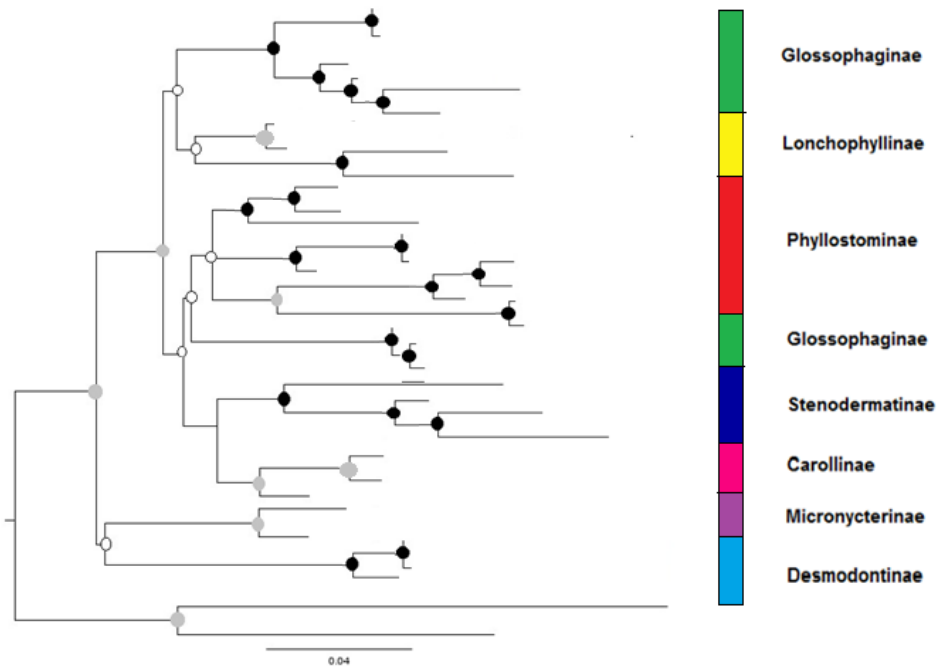
	Desmodontinae	Glossophaginae	Phyllostominae	Micronycterinae	Lonchophyllinae	Carolliinae	Stenodermatinae
<b>Desmodontinae</b>							
<b>Glossophaginae</b>	4,68%						
<b>Phyllostominae</b>	5,42%	4,12%					
<b>Micronycterinae</b>	6,62%	6,04%	6,07%				
<b>Lonchophyllinae</b>	7,57%	6,42%	6,90%	9,29%			
<b>Carolliinae</b>	4,83%	3,29%	3,37%	4,91%	5,96%		
<b>Stenodermatinae</b>	6,82%	4,77%	4,93%	5,95%	7,62%	3,72%	
<b>Grupo Externo</b>	10,53%	10,07%	10,24%	10,68%	12,72%	9,99%	10,86%

**Tabela 9.** Estimativa de divergência de sequências (%) par a par dentro das subfamílias de Phyllostomidae, utilizando o gene VWF. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.

Subfamília	Distâncias
Desmodontinae	1,00%
Glossophaginae	2,03%
Phyllostominae	4,04%
Micronycterinae	3,34%
Lonchophyllinae	1,90%
Carolliinae	1,65%
Stenodermatinae	3,88%



**Figura 7.** Filogenia molecular do VWF gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco indica probabilidade posterior < 95% e preto ≥ 95%.



**Figura 8.** Filogenia molecular do VWF gerada pelo método de Máxima Verossimilhança (MV). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco para bootstrap ≤ 50%, cinza para 50 –70% e preto para ≥ 70%.

Os conjuntos de dados não apresentaram saturação de substituições de base significativa pelo índice de saturação do método de Xia e Xie (2001). O programa jModeltest selecionou os modelos evolutivos mais apropriados para os conjunto de dados. O modelo evolutivo selecionado pelo critério Akaike e Bayesiano foi o GTR+I+G, com  $\gamma=0.6800$  e HKY+I+G,  $\kappa = 8.1680$  (ti/tv = 3.8818), p-inv = 0.4850 e  $\gamma=0.6670$ , respectivamente.

As distâncias genéticas foram calculadas entre e dentro de seis subfamílias, as distâncias interclados variaram de 12,7% a 3,3%. (Tabela 7) e as distâncias dentro das subfamílias variaram de 4,04% a 1% (Tabela 8), sendo a primeira referente à subfamília Phyllostominae e a segunda, tendo a menor distância, na subfamília Desmodontinae.

A Figura 7 apresenta a filogenia pelo método de Inferência Bayesiana (IB) e a Figura 8 apresenta a filogenia pelo método de Máxima Verossimilhança. As cores na filogenia seguem as dos grupos formados pelas subfamílias.

A filogenia Bayesiana (Figura 7) resgatou com altos suportes as relações, todavia Phyllostominae, novamente, e Glossophaginae apresentaram-se parafiléticos. Na análise MV (Figura 8), obtve suportes mais baixos, e somente com um resultado melhor nas relações entre os gêneros das subfamílias. A subfamília Glossophaginae foi a única que não foi resgatada sua monofilia nessa análise.

### 3.1.5 SPTBN1

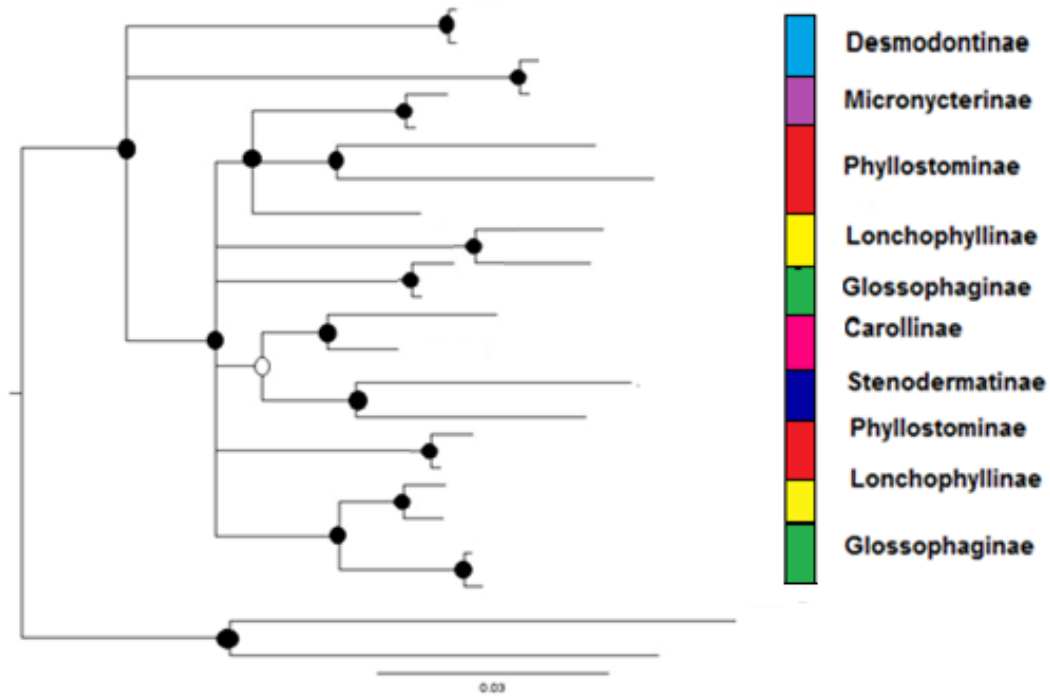
Foram obtidos 675 pb, de 25 indivíduos. As distâncias genéticas foram calculadas entre e dentro das seis subfamílias, utilizando como grupo externo *Noctilio leporinus*.

**Tabela 10.** Estimativa de divergência de sequências (%) par a par entre grupos de SPTBN1 de subfamílias Phyllostomidae. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.

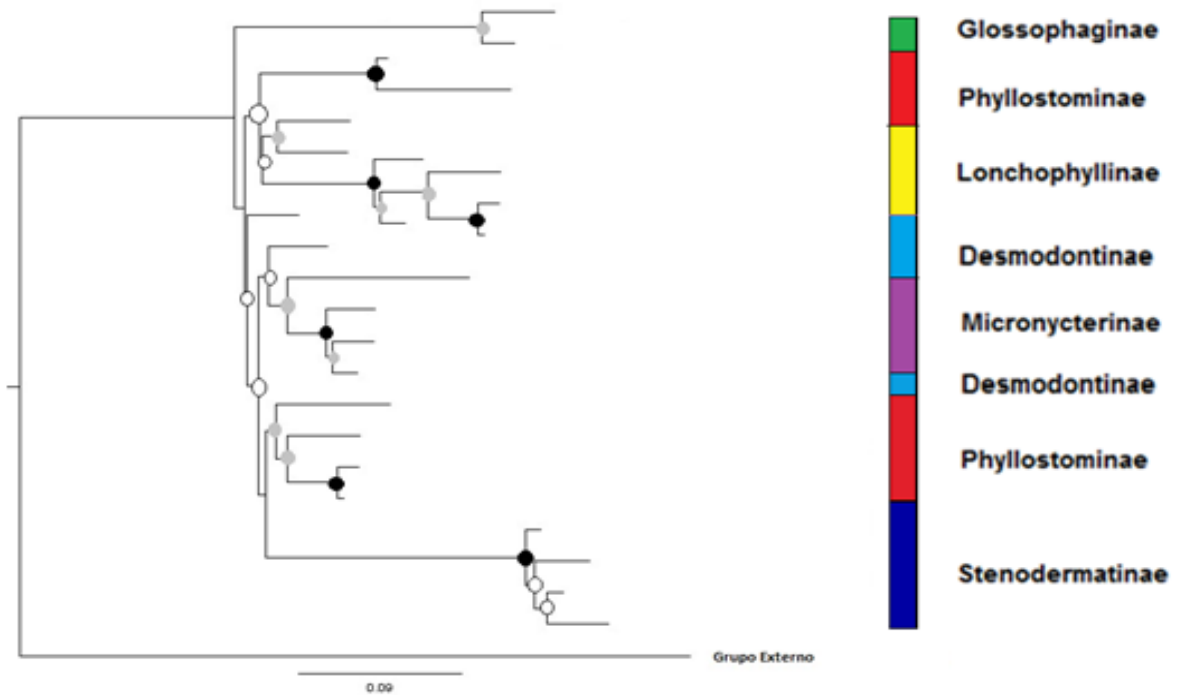
	<b>Glossophaginae</b>	<b>Micronycterinae</b>	<b>Phyllostominae</b>	<b>Desmodontinae</b>	<b>Lonchophyllinae</b>	<b>Stenodermatinae</b>
<b>Glossophaginae</b>						
<b>Micronycterinae</b>	18,08%					
<b>Phyllostominae</b>	13,68%	13,91%				
<b>Desmodontinae</b>	11,33%	10,08%	8,31%			
<b>Lonchophyllinae</b>	9,20%	8,60%	7,97%	7,74%		
<b>Stenodermatinae</b>	12,25%	13,47%	11,70%	11,21%	10,90%	
<b>Grupo Externo</b>	35,86%	37,79%	34,23%	34,31%	34,72%	38,68%

**Tabela 11.** Estimativa de divergência de sequências (%) par a par dentro das subfamílias de Phyllostomidae, utilizando o gene COI. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.

<b>Subfamília</b>	<b>Distâncias</b>
Glossophaginae	12,86%
Micronycterinae	8,86%
Phyllostominae	7,37%
Desmodontinae	9,17%
Lonchophyllinae	6,34
Stenodermatinae	9,58%



**Figura 9.** Filogenia molecular do SPTBN1 gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco indica probabilidade posterior < 95% e preto ≥ 95%.



**Figura 10.** Filogenia molecular do SPTBN1 gerada pelo método de Máxima Verossimilhança (MV). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco para bootstrap ≤ 50%, cinza para 50 –70% e preto para ≥ 70%.

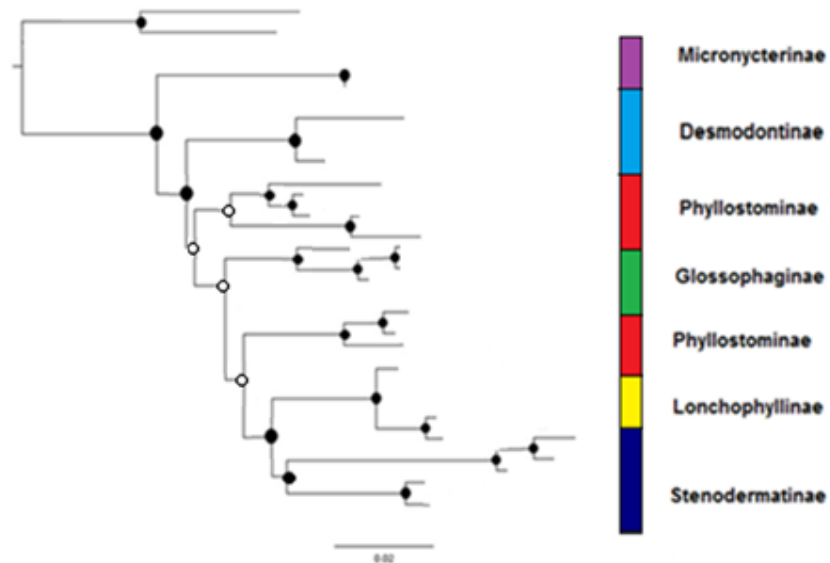
Os conjuntos de dados não apresentaram saturação de substituições de base significativa pelo índice de saturação do método de Xia e Xie (2001). O programa jModeltest selecionou os modelos evolutivos mais apropriados para os conjunto de dados. O modelo evolutivo selecionado pelo critério Akaike e Bayesiano foi o GTR+G, com  $\gamma=2.0600$  e K80+G,  $\kappa = 3.4063$  (ti/tv = 1.7031), e  $\gamma=2.1800$ , respectivamente.

As distâncias genéticas foram calculadas entre e dentro de seis subfamílias, as distâncias interclados variaram de 38,68% a 7,97%. (Tabela 9) e as distâncias dentro das subfamílias variaram de 12,86% a 6,34% (Tabela 10), sendo a primeira referente à subfamília Phyllostominae e a segunda, tendo a menor distância, na subfamília Desmodontinae.

A Figura 9 apresenta a filogenia pelo método de Inferência Bayesiana (IB) e a Figura 10 apresenta a filogenia pelo método de Máxima Verossimilhança. As cores na filogenia seguem as dos grupos formados pelas subfamílias.

Na filogenia IB podemos perceber que há muitas incongruências com as resgatadas pelos outros marcadores nucleares e mitocondrial. Três subfamílias apresentaram parafilia, e partes da árvore permanece incerta. Na análise MV o número de suportes baixos, abaixo de 50% é grande, com parafilia nas subfamílias Phyllostominae e Desmodontinae.

### 3.1.6 Análise Concatenada



**Figura 11.** Filogenia molecular concatenada das seqüências de genoma mitocondrial (COI) e nucleares (RAG2, Beta-Fibrinogênio, VWF e SPTBN1) gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Branco indica probabilidade posterior < 95% e preto ≥ 95%.

A Figura 11 apresenta a filogenia pelo método de Inferência Bayesiana (IB) para filogenia concatenada e as cores na filogenia seguem as dos grupos formados pelas subfamílias

A análise apresentou alguns suportes baixos, e como resultado resolveu algumas relações que nas análises individuais dos genes se mostraram parafiléticos, como Desmodontinae e Lonchophyllinae com os marcadores SPTBN1 e COI. Todavia não recuperou a monofilia de duas subfamílias. Glossophaginae apresentou parafilia na filogenia de dois marcadores, SPTBN1 e VWF, e também na concatenação das seqüências. E Phyllostominae teve sua monofilia recuperada somente pelo gene Beta-Fibrinogênio.

Uma relação importante resgatada nessa filogenia seria a posição do grupo basal da família, identificando Micronycterinae como o mais basal.

#### 4. DISCUSSÃO

As escolhas dos genes nucleares utilizadas aqui foram baseadas no conhecimento da literatura de marcadores que se demonstraram informativos e foram utilizados em outros estudos com mamíferos, morcegos e até mesmo em espécies na família Phyllostomidae, que nos leva a prever que os genes em questão trariam resultados adequados com provável informação filogenética.

Muitas vezes um determinado gene apresenta uma boa informação em um grupo filogenético, entretanto, quando usado em outro grupo, pode não dar a mesma resposta, dependendo da taxa evolutiva do grupo e do gene. Os resultados desse estudo fornecem evidências de cinco genes, um mitocondrial e quatro nucleares. De acordo com as divergências de sequências par-a-par e filogenias podemos observar as diferenças nas taxas evolutivas de cada um deles.

Os resultados do gene COI, indicam que o mesmo evolui mais rápido, como o esperado, por se tratar de um gene mitocondrial, com taxa evolutiva reconhecidamente mais rápida. Ele tem o melhor desempenho filogenético, conforme observado por Avise anteriormente (AVISE 1987). Isso não é surpreendente e este gene é largamente utilizado em análises filogenéticas (CLARE, 2011; BAKER, 2003). Esse gene mitocondrial é utilizado frequentemente para estudos, por exemplo, de espécies crípticas (BAKER E BRADLEY, 2006; CLARE, 2011), nos quais somente o DNA mitocondrial é utilizado. Entretanto é fortemente recomendado que se utilize também marcadores nucleares adicionalmente ao DNA mitocondrial, uma vez que a herança destes marcadores é exclusivamente materna e poderia contar a história da linhagem e



não da espécie como um todo. Por isso testamos mais quatro genes nucleares. Este gene mitocondrial está constando nesse estudo para fins de comparação com os genes nucleares.

O marcador nuclear RAG2 é amplamente utilizado em diversos grupos, sendo comparado, em alguns trabalhos, aos marcadores mitocondriais, por apresentar uma divergência intraespecífica alta, descrevendo em Mormoopidae altos níveis de divergência (LEWIS-ROTTIT, *et al.*). O Recombination Activation Gene 2 (RAG2) é bastante utilizado em estudos para lançar luz à sistemática filogenética de táxons de morcegos *e.g.* *Myotis* (LACK *et al.*, 2010), morcegos da subfamília Molossinae (AMMERMAN *et al.*, 2012) e *Sturnira* (VELAZCO E PATTERSON, 2013). Todavia parece não ter o mesmo resultado para Phyllostomidae, pois as distâncias entre as subfamílias encontradas no gene RAG-2 apresentam uma baixa divergência na porcentagem par-a-par, e a filogenia, mesmo recuperando com altos suportes vários ramos, contem algumas relações não resolvidas, indicando ser um gene com pouco potencial para resolução da família em questão.

As sequências do gene RAG2 utilizadas, foram as únicas análises com sequências representando a subfamília Macrotinae. Isto é importante, pois pudemos testar as hipóteses de Honeycutt e Sarich (1987), que através de estudos de imunologia, investigaram as relações dentro de Phyllostomidae, onde *Macrotus* foi o gênero mais divergente, mostrando-se associado aos desmodontíneos para formar a linhagem basal para a família. Os nossos dados não corroboraram esta hipótese. A subfamília associada, nesse estudo a Macrotinae foi Micronycterinae.

Estudos utilizando o gene nuclear VWF em roedores conseguem recuperar monofilias e resolver relações de clados intermediários (HUCHON *et al.*, 2002). Em quirópteros, para Pteropodidae, apresentou uma estrutura robusta em sua

classificação, mas sem resolver relações mais profundas, talvez pelo fato do grupo ter se diversificado rapidamente (ALMEIDA *et al*, 2011). Para Phyllostomidae encontramos uma porcentagem baixa nos resultados, sua filogenia não recuperou muitas relações e apresentou baixos suportes, semelhante ao RAG 2, podendo considerar ambos como marcadores mais conservados.

O conceito de “altamente conservado” geralmente significa uma porcentagem baixa de divergência, no entanto, dois genes podem mostrar o mesmo valor de porcentagem de divergência, mas tem padrões muito diferentes de evolução e, correspondentemente, diferente utilidade filogenética (GRAYBEAL, 1994). É comum que os cientistas utilizem esses genes para analisarem divergências mais profundas (KUMAZAWA E NISHIDA, 1993).

O gene nuclear Beta-Fibrinogênio já foi utilizado para resolução intraespecífica do gênero *Micronycteris*, da subfamília Micronycterinae, apresentando altos suportes e dados confiáveis, com uma evolução um pouco lenta, quando comparado aos marcadores mitocondriais, resolvendo ramos mais profundos dentro desse gênero (PORTER, 2007). Para os filostomídeos, neste trabalho, apresentou resultados mais promissores, do que os outros genes nucleares, com porcentagens de divergências mais altas, e filogenias com suportes robustos, recuperando todas as monofilias das subfamílias, refletindo um possível resultado mais compatível com a taxa evolutiva da família Phyllostomidae.

Por fim, o gene SPTBN1, que ainda não foi bem explorado em muitos táxons, já foi utilizado para trabalhos descritos com antílopes, apresentando uma boa resolução, porém em análises concatenadas, sem deixar claro o desempenho individual do marcador (Robinson *et al*, 2014). Ele também foi usado com sucesso em roedores, apresentando um elevado índice de consistência e bom suporte nas análises

filogenéticas (MONTGELARD *et al*, 2003). Para morcegos filostomídeos neste estudo esse gene apresentou uma boa porcentagem de divergências entre as sequências, quando comparado com os outros genes nucleares, possuindo uma proximidade em valores com o gene Beta-fibrinogênio, sendo ambos introns, todavia a filogenia do último trouxe resultados melhores nas duas análises realizadas. Vale ressaltar que o marcador SPTBN1 teve pouco sucesso de amplificação, quando comparado aos outros genes, e somente quatro amostras estavam disponíveis no GenBank.

Por se tratar de um intron, foi observada a presença de elevadas inserções e deleções nesse último marcador, SPTBN1, por esse motivo, talvez, o alinhamento não esteja correto, acarretando uma insegurança nos dados do mesmo. Sabe-se que para se ter um melhor desempenho das previsões de informatividade para sequências de aminoácidos, estes devem estar em um bom alinhamento (LÓPEZ-GIRÁLDEZ *et al*, 2013).

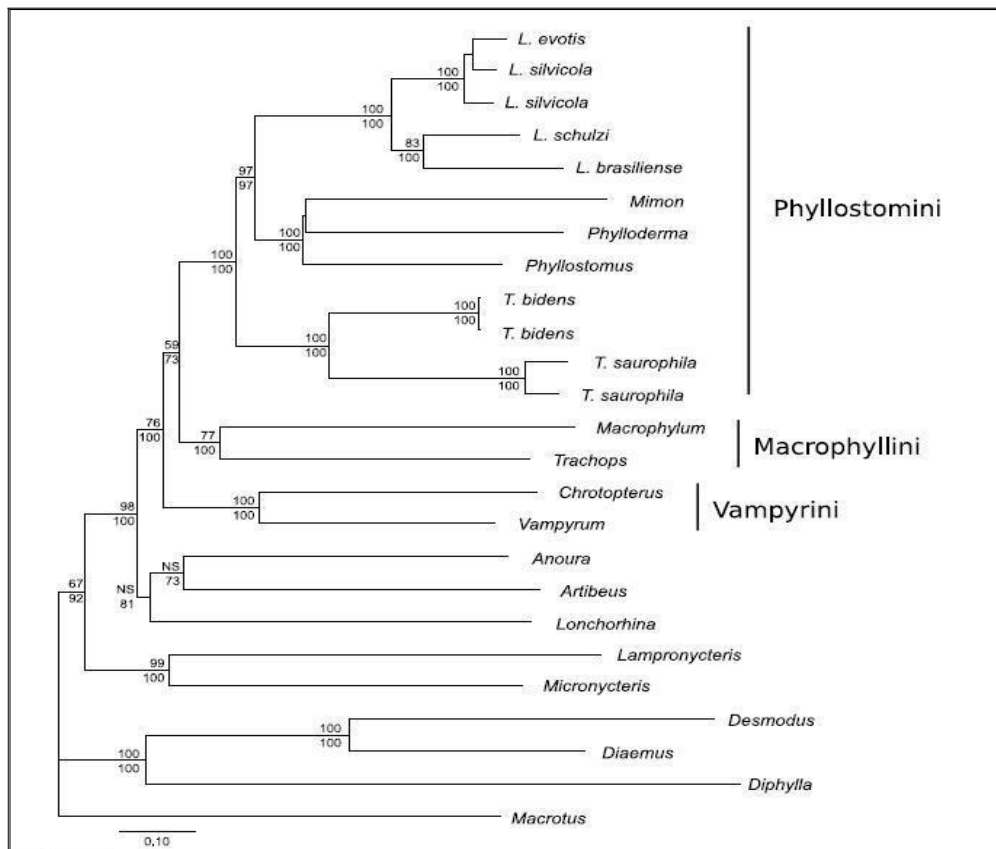
Com base nos resultados de RAG2 e VWF, a utilização dos mesmos podem apresentar extensas politomias, com relações inconclusivas nas árvores filogenéticas da família Phyllostomidae, enquanto que os genes nucleares Beta-Fibrinogênio e SPTBN1 podem resolver as relações de processos de especiação mais recentes, sendo indicado principalmente o primeiro citado para ser utilizado em trabalhos para resolução da filogenia de filostomídeos. Problemas com o alinhamento de SPTBN1 permitem a gente concluir que o Beta-Fibrinogênio é um melhor marcador.

Uma incongruência frequentemente encontrada em estudos moleculares de Phyllostomidae é a monofilia (ou não) da subfamília Phyllostominae, que foi recuperada, no presente trabalho, pelos genes RAG 2, Beta-fibrinogênio e VWF. Essa subfamília é muito estudada, sendo relatados alguns conflitos. Pesquisadores reconhecem que Phyllostominae pode ser um grupo parafilético, contudo as linhagens,

indicadas pela imunologia, não são totalmente coerentes com as reconhecidas por diversos autores (SLAUGHTER, 1970; SMITH, 1976; WALTON & WALTON, 1968).

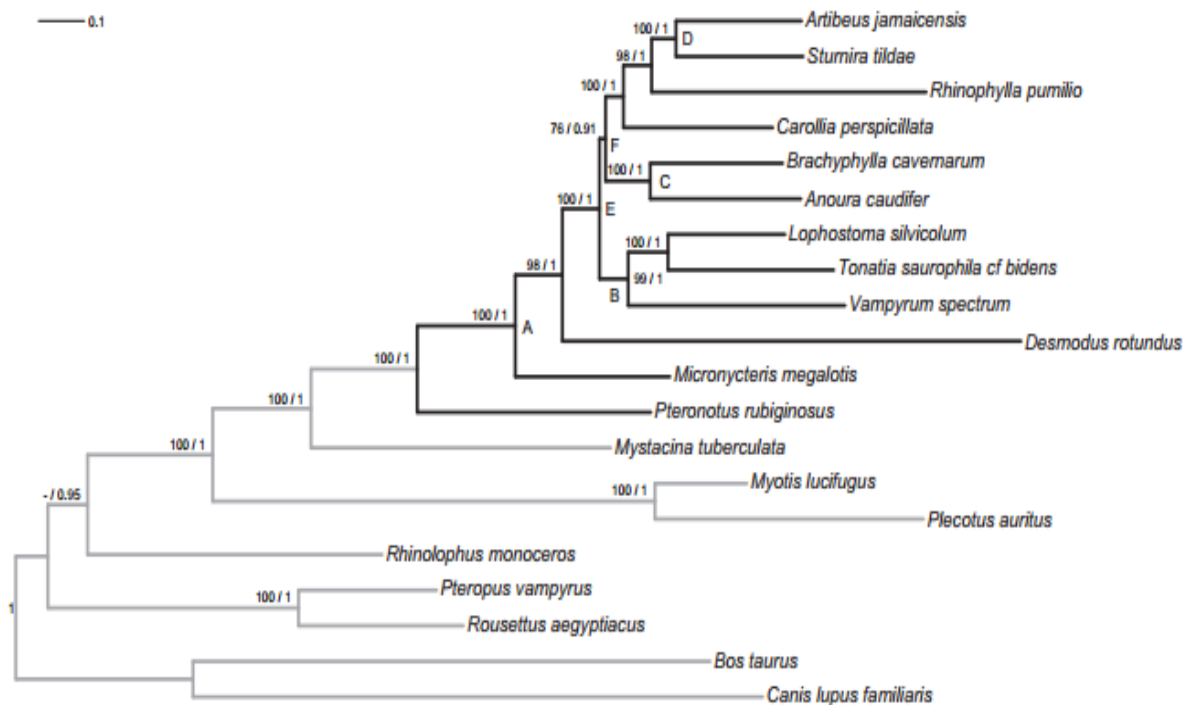
Frequentemente a subfamília Phyllostominae passa por reformulações (BAKER *et al.*, 1989), retirando gêneros e elevando-os a novas subfamílias (HONEYCUTT; SARICH, 1987), utilizando dados de morfologia, imunologia e molecular. Entretanto, sua monofilia também é sustentada em outras pesquisas (SIMMONS, 2005; BAKER *et al.*, 2003; BAKER *et al.*, 2000).

Outra questão não resolvida em Phyllostomidae seria a posição do grupo mais basal. Em filogenia proposta por Hoffmann *et al.* (2008) ( Figura 12 ) coloca a subfamília Macroptinae como mais basal seguida de Desmodontinae.



**Figura 12.** Filogenia molecular proposta por Hoffmann *et al.*, 2008.

Botero-Castro (2013) (Figura 13) obteve conflitos em seus resultados, utilizando o genoma mitocondrial total e dois genes nucleares, VWF e RAG 2, recuperando duas filogenias com grupos basais diferentes, a nuclear com o desmodontinae e a mitocondrial com o micronycterinae, todavia sua filogenia concatenada recuperou Micronycterinae, assim como nos resultados concatenados do presente estudo (Figura 11). A filogenia concatenada não contemplou a subfamília Macrochinae, pois as sequências de Macrochinae somente foram analisadas no marcador RAG2.



**Figura 13.** Filogenia molecular de morcegos Phyllostomidae inferida a partir de uma concatenação das sequências de genomas mitocondriais completos de e nuclear marcadores VWF e RAG2 por Botero-Castro *et al*, 2013.

Relativamente pouca preocupação foi dada para problemas individualizados de cada gene, a maioria dos pesquisadores tem simplesmente utilizado em níveis globais a divergência de sequência, com isso, podemos utilizar padrões de previsões para a utilidade de determinados genes, todavia com a consciência de que essas previsões

podem falhar. O real utilitário filogenético de um gene em um grupo só pode ser conhecido quando ocorre a tentativa de resolução filogenética naquele grupo (GRAYBEAL, 1994). Tal lacuna motivou a realização da atual pesquisa para a família, que objetivou lançar luz sobre a informatividade real dos marcadores propostos. Trabalhos semelhantes foram feitos, porém com outros grupos (GRAYBEAL, 1994; LÓPEZ-GIRÁLDEZ *et al*, 2013, ZHANG *et al*, 2013).

Não se pode sugerir que encontremos o único gene ideal, para elucidar as relações filogenéticas de um grupo, mas para cada divergência particular, pode-se ser necessário vários genes para sua resolução (KUMAZAWA E NISHIDA, 1993; GRAYBEAL, 1994).

A partir de informações de muitos genes pode-se permitir que outras perguntas interessantes sejam respondidas, sendo melhor embasadas por um grau de concordância entre diversos genes, fornecendo uma história mais sólida sobre os táxons.

O presente trabalho apresentou uma pesquisa, até então, inédita para Phyllostomidae, analisando o desempenho de genes nucleares para a resolução da família. A conclusão das análises foi que o marcador nuclear Beta-Fibrinogênio apresentou resultados altamente promissores, com filogenias bem resolvidas, incentivando futuros estudos moleculares de morcegos filostomídeos com o mesmo.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Francisca C *et al.* Evolutionary relationships of the old world fruit bats (Chiroptera, Pteropodidae): Another star phylogeny? **Evolutionary Biology 2: bio med central**, [s. L.], v. 281, n. 11, p.1471-2148, 2011.

AMMERMAN, L.K.; LEE, D.N.; TIPPS, T.M. First molecular phylogenetic insights into the evolution of free-tailed bats in the subfamily Molossinae (Molossidae, Chiroptera). **Journal of Mammalogy**, 93(1):12-28. 2012.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A., Saunders, N.C. Intraespecific phylogeography: the bridge between population genetics and systematics. **Annual Reviews of Ecology and Systematics**, 18: 489-522. 1987.

AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press. 2000.

BAKER, R.J.; PORTER, C.A.; PATTON, J.C.; VAN DEN BUSSCHE, R.A. Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. **Occasional Papers**, 202:1-6. 2000.

BAKER, R.J., SOLARI, S., HOFFMANN, F.G. A new Central American species from the *Carollia brevicauda* complex. **Occasional Papers** The Museum of Texas Tech University 217: 1–10. 2002

BAKER, Robert J. *et al.* Diversification among New World leaf-nosed bats: an evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. **Occasional Papers Of Museum Texas Tech University**, Texas, v. 230, p.1-32, 2003.

BAKER, R.J.; BRADLEY, R.T.D. Speciation in mammals and the genetic species concept. **Journal of Mammalogy**, 87(4):643-662. 2006.

BARRATT, E. M.; DEAVILLE, R.; BURLAND, T. M.; BRUFORD, M. W.; JONES, G.; RACEY, P.

A.; WAYNE, R. K. DNA answers the call of pipistrelle bat species. **Nature**, 387:138-139. 1997.

BOTERO-CASTRO, F.; TILAK, M.; JUSTY, F.; CATZEFLIS, F.; DELSUC, F., DOUZERY, E.J.P. Next-generation sequencing and phylogenetic signal of complete mitochondrial genomes for resolving the evolutionary history of leaf-nosed bats (Phyllostomidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 2013.

BRUFORD, M.W.; HANOTTE, O.; BROOKFIELD, J.F.Y.; BURKE, T. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. **Molecular genetic analyses of populations: A practical Approach**. Gráfica: Oxford. 1992.

CLARE, E. L. *et al.* DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. **Guyana. Molecular Ecology Notes**, [s. L.], v. 7, p.184-190, 2007.



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): 22648. 2011.

CLARE, E.L. Cryptic Species? Patterns of Maternal and Paternal Gene Flow in Eight Neotropical Bats. **Plos One**, 6(7):1-13. 2012.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods** 9(8):772. 2012.

DATZMANN, Thomas; VON HELVERSEN, Otto; MAYER, Frieder. Evolution of nectarivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia). **Bmc Evolutionary Biology**, [s. L.], v. 10, p.165-0, 2010.

D'ÁVALOSI, L.M., CIRRANELLO, A.L., GEISLER, J.H., SIMMONS, N.B. Understanding phylogenetic incongruence: lessons from phyllostomid bats. **Biological Reviews**, 87: 991-1024. 2012.

DITCHFIELD, Albert David. **Phylogeography of Neotropical bats using mitochondrial DNA sequences**. 1996. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Integrative Biology, Graduate Division, University Of California, Berkeley, 1996.

DITCHFIELD, A.D. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to non-volant small mammals. **Molecular Ecology**, 9:1307-1318. 2000.

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**, 3:294-297. 1994.

GRAYBEAL, Anna. Evaluating the Phylogenetic Utility of Genes: A Search for Genes Informative About Deep Divergences Among Vertebrates. **Systematic Biology**, Basingstoke, v. 43, n. 2, p.174-193, jun. 1994.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, 52:696-704. 2003.

HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, 22(2):160–174. 1985.

HÄUSSLER, U.; NAGEL, A.; BRUAN, M.; ARNOLD, A. External characters discriminating sibling species of European pipistrelles, *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774) and *P. pygmaeus* (Leach, 1825). **Myotis**, 37:27-40. 2000.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identification through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences**, 270:313- 321. 2003.

HOFFMANN, F.G. e BAKER, R.J. Systematics of bats of the genus *Glossophaga* (Chiroptera: Phyllostomidae) and phylogeography in *G. soricina* based on the cytochrome b gene. **Journal of Mammalogy**, 82:3403-3414. 2001.

HOFFMANN, F.G.; HOOFER, S.R.; BAKER, R.J. Molecular dating of the diversification of Phyllostominae bats based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49(2): 653-658. 2008.

HONEYCUTT, Rodney L.; SARICH, Vincent M.. Monophyly and molecular evolution within three phyllostomid bat genera. **Journal Of Mammalogy**, Lawrence, v. 3, n. 68, p.518-525, nov. 1987.

HUCHON, Dorothe'e *et al.* Rodent Phylogeny and a Timescale for the Evolution of Glires: Evidence from an Extensive Taxon Sampling Using Three Nuclear Genes. **Molecular Biology And Evolution: Oxford Journals**, Oxford, v. 7, n. 19, p.1053-1065, 2002.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R.; BOLLBACK, J.P. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, 294:2310-2314. 2001.

JEFFROY, Olivier *et al.* Phylogenomics: the beginning of incongruence? **Trends In Genetics**, v. 22, p.225-231, 2006.

KUHNER, M.K., YAMATO, J., FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent. **Genetics**, 149:429-434. 1998.

KUMAZAWA, Yara; NISHIDA, Maria. Sequence evolution of mitochondrial tRNA genes and deep-branch animal phylogenetics. **Journal Of Molecular Evolution.**, Nova York, v. 37, p.380-398, 1993.

LACK, J.B.; ROEHRS, Z. P.; STANLEY, JR. C. E.; RUEDI, M.; BUSSCHE, R.A.V.D. Molecular phylogenetics of *Myotis* indicate familial-level divergence for the genus *Cistugo* (Chiroptera). **Journal of Mammalogy**, 91(4):976-992. 2010.

LEWIS-ORITT, Nicole; PORTER, Calvin A.; BAKER, Robert J.. Molecular systematics of the family Mormoopidae (Chiroptera) based on cytochrome b and recombination activating gene 2 sequences. **Mol Phylogenet Evol**, v. 20, p.426-436, 2001.

LÓPES-GIRÁLDEZ, F.; MOELLER, A.H., TOWNSEND, J.P. Evaluating Phylogenetic Informativeness as a Predictor of Phylogenetic Signal for Metazoan, Fungal, and Mammalian. **BioMed Research International**, 2013.

MATTHEE, Conrad A. *et al.* A Molecular Supermatrix of the Rabbits and Hares (Leporidae) Allows for the Identification of Five Intercontinental Exchanges During the Miocene. **Society Of Systematic Biologists**, Oxford, v. 3, n. 55, p.433-447, 2004.

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). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, 45: 372-378. 2007.

MARTINS, Felipe M *et al.* Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): Marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. **Bmc Evolutionary Biology**, v. 9, p.924, 2009.

MCLELLAN, L. J. A morphometric analysis of *Carollia* (Chiroptera, Phyllostomidae). **American Museum Novitates**, n. 2791, p.1-35. 1984.

MIYAMOTO, Michael M.; CRACRAFT, Joel. Phylogenetic inference, DNA sequence analysis, and the future of molecular systematics and the future of molecular systematics. **Oxford University Press**, Nova York, p.3-17, 1991.

MONTGELARD, Claudine; MATTHEE, Conrad A.; ROBINSON, Terence J.. Molecular systematics of dormice (Rodentia: Gliridae) and the radiation of Graphiurus in Africa. **Proceeds Of The Royal Society B**, London, n. 270, p.1947-1955, ago. 2003.

MOORE, W.S. Inferring Phylogenies from mtDNA Variation: Mitochondrial-Gene Trees Versus Nuclear-Gene Trees. **Society for the Study of Evolution**, 49: 718-726. 1995.

NESE, Nicolas *et al.* Molecular systematics and phylogeography of the tribe *Myonycterini* (Mammalia, Pteropodidae) inferred from mitochondrial and nuclear markers. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, [s. L.], v. 66, p.126-137, 2012.

PAVAN, A.C.; MARTINS, F.; SANTOS, F.R.; DITCHFIELD, A.; REDONDO, R.A.F. 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.

PINE, R. H. **The bats of the genus *Carollia***. Technical Monograph 8, September. The Texas Agricultural Experiment Station, 125p. 1972.

PORTER, C.A.; HOOFFER, S.R.; CLINE, C.A., HOFFMANN, F.G.; BAKER, R.J. Molecular phylogenetics of the phyllostomid bat genus *Micronicterys* with descriptions of two new subgenera. **Journal of Mammalogy**, 88(5):1205-1215. 2007.

RAUMBAUT, A. 2007. FigTree 1.3.1. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>

REDONDO, R.A.F.; BRINA, L.P.S.; SILVA, R.F.; DITCHFIELD, A.D.; SANTOS, F.R. Molecular systematics of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49:44-58. 2008.

ROBINSON, Tj *et al.* Phylogeny and vicariant speciation of the Grey Rhebok, *Pelea capreolus*. **Nature Publishing Group**, New York, v. 112, p.325-332, nov. 2013.

RODRÍGUEZ-EZPELETA, Naiara *et al.* Detecting and overcoming systematic errors in genome-scale phylogenies. **Systematic Biology**, [s. L.], v. 56, p.389-399, 2007.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, 19:1572-1574. 2003.

SIMMONS, N.B. Order Chiroptera. In: **Mammals Species of the World: a taxonomic and geographic reference**. (WILSON, D.E. & REEDER, D.M eds.). Johns Hopkins University Press, Baltimore: n. 1. p. 312-529. 2005.

SOLARI, S. e BAKER, R. J. Mitochondrial DNA sequence, karyotypic, and morphologic variation in the *Carollia castanea* species complex (Chiroptera: Phyllostomidae) with description of a new species. **Occasional Papers, The Museum, Texas Tech University**. 254: 1–16. 2006.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**. 28(10):2731-2739. 2011.

VELAZCO, P.M.; PATTERSON, B.D. Diversification of the Yellow-shouldered bats, Genus *Sturnira* (Chiroptera, Phyllostomidae), in the New World tropics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 68(3): 683-698. 2013.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, 92:371-373. 2001.

ZHANG, Peng *et al.* Efficient Sequencing of Anuran mtDNAs and a Mitogenomic Exploration of the Phylogeny and Evolution of Frogs. **Society For Molecular Biology And Evolution**, Oxford, v. 8, n. 30, p.1899-1915, mar. 2013.

WADDELL, John *et al.* Using novel phylogenetic methods to evaluate mammalian mtDNA, including amino acid invariant sites-LogDet plus site stripping, to detect internal conflicts in the data, with special reference to the positions of hedgehog, armadillo, and elephant. **Systematic Biology**, [s. L.], v. 48, p.31-53, 1999.

WETTERER, Andrea L. *et al.* Phylogeny of phyllostomid bats (mammalia: chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. **American Museum Of Natural History**, Texas, v. 248, p.1-200, 2000.



## APÊNDICE

**APÊNDICE 1:** Lista dos espécimes utilizados para as análises do gene citocromo c oxidase I (COI) provenientes do GenBank.

	Amostra	Espécie	Subfamília	Família
1	JQ601202	<i>Trachops cirrhosus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
2	JQ601325	<i>Chrotopterus auritus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
3	HQ919730	<i>Lophostoma silvicolum</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
4	JQ601371	<i>Phyllostomus latifolius</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
5	JQ601336	<i>Phyllostomus elongatus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
6	JQ601403	<i>Micronycteris megalotis</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
7	HQ625009	<i>Micronycteris schmidtorum</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
8	JQ601420	<i>Carollia perspicillata</i>	Carolliinae	Phyllostomidae
9	JQ601306	<i>Carollia brevicauda</i>	Carolliinae	Phyllostomidae
10	JQ601377	<i>Glossophaga soricina</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
11	JQ601425	<i>Glossophaga soricina</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
12	JF448842	<i>Diphylla ecaudata</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
13	HQ91970	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
14	JQ600003	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
15	JQ601182	<i>Artibeus lituratus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
16	JQ601195	<i>Platyrrhinus helleri</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
17	JQ601208	<i>Artibeus lituratus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
<u>18</u>	JF446312	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae

**APÊNDICE 2:** Lista dos espécimes utilizados para as análises do gene citocromo c

oxidase I (COI) provenientes do LABEQ.

	Amostra	Espécie	Subfamília	Família
1	RF 26	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
2	RF 20	<i>Artibeus lituratus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
3	PM 57	<i>Artibeus lituratus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
4	AD 688	<i>Artibeus lituratus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
5	AD 585	<i>Anoura geofroyi</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
6	MO 98	<i>Anoura caudifera</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
7	AD 15	<i>Xeronycteris vieirai</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
8	AD 18	<i>Glossophaga soricina</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
9	AD 29	<i>Glossophaga soricina</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
10	AD 818	<i>Micronycteris hirsuta</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
11	PM 20	<i>Micronycteris hirsuta</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
12	VP 435	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
13	VP 136	<i>Diaemus youngii</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
14	RF 14	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
15	AD 1030	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
16	AD 394	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
17	VP 62	<i>Carollia brevicauda</i>	Carollinae	Phyllostomidae
18	VP 124	<i>Carollia perspicilata</i>	Carollinae	Phyllostomidae
19	RF 36	<i>Carollia perspicilata</i>	Carollinae	Phyllostomidae
20	AST 58	<i>Lonchophylla mordax</i>	Lonchophyllinae	Phyllostomidae
21	TV 124	<i>Lonchophylla peracchii</i>	Lonchophyllinae	Phyllostomidae
22	VP 36	<i>Lonchophylla peracchii</i>	Lonchophyllinae	Phyllostomidae
23	VP 171	<i>Lonchophylla peracchii</i>	Lonchophyllinae	Phyllostomidae
24	AD 946	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
25	VP 227	<i>Tonatia saurophila</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
26	GM 58	<i>Lophostoma brasiliense</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
27	LN 4	<i>Chrotopterus auritus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
28	VP 273	<i>Tonatia brasiliensis</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
29	AD 130	<i>Phyllostomus discolor</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
30	AD 611	<i>Tonatia bidens</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
31	TM 25	<i>Natalus stramineus</i>	-	Natalidae
32	TV 57	<i>Noctilio leporinus</i>	-	Noctilionidae

**APÊNDICE 3:** Lista dos espécimes utilizados para as análises do gene RAG2

provenientes do GenBank.

	Amostra	Espécie	Subfamília	Família
1	MN 36720 FURB-SLA	<i>Trachops cirrhosus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
2	1799	<i>Chrotopterus auritus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
3	AN 1918	<i>Lophostoma silvicolum</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
4	AF316470	<i>Micronycteris schmidtorum</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
5	AF316437	<i>Carollia brevicauda</i>	Carolliinae	Phyllostomidae
6	AF316460	<i>Macrotus waterhousii</i>	Macrotinae	Phyllostomidae
7	AF316461	<i>Macrotus waterhousii</i>	Macrotinae	Phyllostomidae
8	AF316452	<i>Glossophaga soricina</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
9	DQ903834	<i>Diphylla ecaudata</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
10	DQ903833	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
11	MN 36260	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
12	DQ903837	<i>Artibeus lituratus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
13	DQ903835	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae

**APÊNDICE 4:** Lista dos espécimes utilizados para as análises do gene RAG2

provenientes do LABEQ.

	Amostra	Espécie	Subfamília	Família
1	RF 26	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
2	RF 20	<i>Artibeus lituratus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
3	PM 57	<i>Artibeus lituratus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
4	AD 688	<i>Artibeus lituratus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
5	AD 585	<i>Anoura geofroyi</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
6	MO 98	<i>Anoura caudifera</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
7	AD 15	<i>Xeronycteris vieirai</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
8	AD 818	<i>Micronycteris hirsuta</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
9	PM 20	<i>Micronycteris hirsuta</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
10	AD 926	<i>Micronycteris megalotis</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
11	AD 948	<i>Micronycteris megalotis</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
12	AD 951	<i>Micronycteris megalotis</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
13	AD 792	<i>Micronycteris minuta</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
14	VP 435	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
15	VP 136	<i>Diaemus youngii</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
16	VP 62	<i>Carollia brevicauda</i>	Carollinae	Phyllostomidae
17	VP 124	<i>Carollia perspicilata</i>	Carollinae	Phyllostomidae
18	AST 58	<i>Lonchophylla mordax</i>	Lonchophyllinae	Phyllostomidae
19	AD 946	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
20	GM 58	<i>Lophostoma brasiliense</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
21	LN 4	<i>Chrotopterus auritus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
22	TM 25	<i>Noctilio albiventris</i>	-	Noctilionidae
23	TV 57	<i>Noctilio leporinus</i>	-	Noctilionidae

**APÊNDICE 5:** Lista dos espécimes utilizados para as análises do gene Beta-

Fibrinogênio provenientes do GenBank.

	Amostra	Espécie	Subfamília	Família
1	DQ233670	<i>Trachops cirrhosus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
2	KF815339	<i>Glossophaga soricina</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
3	KF815342	<i>Lonchophylla hesperia</i>	Lonchophyllinae	Phyllostomidae
4	KF815350	<i>Xeronycteris vieirai</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae

**APÊNDICE 6:** Lista dos espécimes utilizados para as análises do gene Beta-

Fibrinogênio provenientes do GenBank.

	Amostra	Espécie	Subfamília	Família
1	RF 26	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
2	RF 20	<i>Artibeus lituratus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
3	PM 57	<i>Artibeus lituratus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
4	AD 688	<i>Artibeus lituratus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
5	AD 585	<i>Anoura geofroyi</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
6	AD 15	<i>Xeronycteris vieirai</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
7	VP 136	<i>Diaemus youngii</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
8	RF 14	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
9	AD 1030	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
10	VP 435	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
11	PM 08	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
12	AD 1040	<i>Diphylla eucadata</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
13	PM 03	<i>Diphylla eucadata</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
14	PM 22	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
15	VP 179	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
16	VP 331	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
17	TV 124	<i>Lonchophylla peracchii</i>	Lonchophyllinae	Phyllostomidae
18	VP 216	<i>Lonchophylla peracchii</i>	Lonchophyllinae	Phyllostomidae
19	CT 43	<i>Lonchophylla peracchii</i>	Lonchophyllinae	Phyllostomidae
20	AD 818	<i>Micronycteris hirsuta</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
21	PM 20	<i>Micronycteris hirsuta</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
22	AD 926	<i>Micronycteris megalotis</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
23	AD 948	<i>Micronycteris megalotis</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
24	AD 946	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
25	GM 58	<i>Lophostoma brasiliense</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
26	LN 4	<i>Chrotopterus auritus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
27	AD 880	<i>Phyllostomus elongatus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
28	VP 227	<i>Tonatia saurophila</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
29	VP 273	<i>Tonatia brasiliensis</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
30	TM 25	<i>Natalus stramineus</i>	-	Natalidae

**APÊNDICE 7:** Lista dos espécimes utilizados para as análises do gene VWF

provenientes do GenBank.

	Amostra	Espécie	Subfamília	Família
1	FN645693	<i>Trachops cirrhosus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
2	FN645688	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
3	FN645669	<i>Chrotopterus auritus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
4	FN645679	<i>Lophostoma silvicolum</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
5	HG380344	<i>Micronycteris megalotis</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
6	FN645683	<i>Micronycteris microtis</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
7	FN645667	<i>Anoura geoffroyi</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
	HG380339	<i>Anoura caudifer</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
8	AY834738	<i>Anoura geoffroyi</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
10	FN645675	<i>Glyphonycteris sylvestris</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
11	FN645674	<i>Glossophaga soricina</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
12	FN645678	<i>Lonchophylla robusta</i>	Lochophyllinae	Phyllostomidae
13	FN645670	<i>Carollia brevicauda</i>	Carolliinae	Phyllostomidae
14	FN645671	<i>Carollia castanea</i>	Carolliinae	Phyllostomidae
15	AF447550	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
16	HG380342	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
17	AY834737	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
18	FN645666	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
19	FN645681	<i>Myotis daubentonii</i>	-	Vespertilionidae
20	FN645686	<i>Noctilio leporinus</i>	-	Noctillionidae

**APÊNDICE 8:** Lista dos espécimes utilizados para as análises do gene VWF

provenientes do LABEQ.

	Amostra	Espécie	Subfamília	Família
1	RF 26	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
2	AD 585	<i>Anoura geofroyi</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
3	MO 98	<i>Anoura caudifera</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
4	AD 15	<i>Xeronycteris vieirai</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
5	VP 62	<i>Carollia brevicauda</i>	Carollinae	Phyllostomidae
6	VP 124	<i>Carollia perspicilata</i>	Carollinae	Phyllostomidae
7	VP 136	<i>Diaemus youngii</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
8	AST 58	<i>Lonchophylla mordax</i>	Lonchophyllinae	Phyllostomidae
9	PM 20	<i>Micronycteris hirsuta</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
10	AD 946	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
11	GM 58	<i>Lophostoma brasiliense</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
12	LN 4	<i>Chrotopterus auritus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
13	AD 880	<i>Phyllostomus elongatus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
14	VP 227	<i>Tonatia saurophila</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
15	VP 273	<i>Tonatia brasiliensis</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
16	PM 23	<i>Tonatia bidens</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae

**APÊNDICE 9:** Lista dos espécimes utilizados para as análises do gene SPTBN1

provenientes do GenBank.

	Amostra	Espécie	Subfamília	Família
1	AJ866370	<i>Trachops cirrhosus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
2	AJ866369	<i>Glossophaga soricina</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
3	AJ866368	<i>Desmodus rotundus</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
4	AJ866367	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae

**APÊNDICE 10:** Lista dos espécimes utilizados para as análises do gene SPTBN1

provenientes do LABEQ.

	Amostra	Espécie	Subfamília	Família
1	RF 26	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Stenodermatinae	Phyllostomidae
2	AD 585	<i>Anoura geofroyi</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
3	MO 98	<i>Anoura caudifera</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
4	AD 15	<i>Xeronycteris vieirai</i>	Glossophaginae	Phyllostomidae
5	VP 62	<i>Carollia brevicauda</i>	Carollinae	Phyllostomidae
6	VP 124	<i>Carollia perspicilata</i>	Carollinae	Phyllostomidae
7	VP 136	<i>Diaemus youngii</i>	Desmodontinae	Phyllostomidae
8	AST 58	<i>Lonchophylla mordax</i>	Lonchophyllinae	Phyllostomidae
9	TV 124	<i>Lonchophylla peracchii</i>	Lonchophyllinae	Phyllostomidae
10	VP 216	<i>Lonchophylla peracchii</i>	Lonchophyllinae	Phyllostomidae
11	CT 43	<i>Lonchophylla peracchii</i>	Lonchophyllinae	Phyllostomidae
12	AD 818	<i>Micronycteris hirsuta</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
13	PM 20	<i>Micronycteris hirsuta</i>	Micronycterinae	Phyllostomidae
14	AD 946	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
15	GM 58	<i>Lophostoma brasiliense</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
16	LN 4	<i>Chrotopterus auritus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
17	AD 880	<i>Phyllostomus elongatus</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
18	VP 227	<i>Tonatia saurophila</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
19	VP 273	<i>Tonatia brasiliensis</i>	Phyllostominae	Phyllostomidae
20	TV 57	<i>Noctilio leporinus</i>	-	Noctilionidae
21	AD 34	<i>Noctilio leporinus</i>	-	Noctilionidae