UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado

Trabalho de Conclusão de Curso

Uso de técnicas moleculares para auxílio na delimitação de espécies crípticas de morcegos do gênero *Carollia* (Chiroptera: Phyllostomidae)

Tuane Letícia Carvalho

Pelotas, 2015

Tuane Letícia Carvalho

Uso de técnicas moleculares para auxílio na delimitação de espécies crípticas de morcegos do gênero *Carollia* (Chiroptera: Phyllostomidae)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial de aprovação no curso de Ciência Biológicas - Bacharelado.

Orientadora: Profª Drª Juliana Cordeiro

Co-Orientador: M.Sc. Leonardo Carreira Trevelin

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C331u Carvalho, Tuane Letícia

Uso de técnicas moleculares para auxílio na delimitação de espécies crípticas de morcegos do gênero Carollia (Chiroptera: Phyllostomidae) / Tuane Letícia Carvalho. – 51f. : il. - Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2015. – Orientadora Juliana Cordeiro ; coorientador Leonardo Carreira Trevelin.

1.Biologia. 2.Carollinae. 3.Espécies crípticas. 4.DNA barcode. 5.Barcode gap. 6.Rede de haplótipos. I.Cordeiro, Juliana. II.Trevelin, Leonardo Carreira. III.Título.

CDD: 599.4

Tuane Letícia Carvalho

Uso de técnicas moleculares para auxílio na delimitação de espécies crípticas de morcegos do gênero *Carollia* (Chiroptera: Phyllostomidae)

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 19/11/2015

Banca examinadora:

.....

Profª. Drª. Juliana Cordeiro, Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

.....

Profª. Drª. Ana Maria Rui, Doutora em Ecologia pela Universidade Federal de Brasília.

.....

Profª. Drª. Monica Laner Blauth, Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Aos meus pais Genival e Mara, e à minha irmã Tamara, pelo apoio e carinho, por terem acreditado que eu faria valer a pena cada dia de esforço dedicados a mim. Vocês são a minha paz, meu porto seguro, meu tudo.

Ao meu namorado Raphael pela paciência e pelas palavras de conforto, por nunca desistir do nosso companheirismo nesses anos, apesar de toda a distância. Amo muito você.

Ao meu cunhado Jefe pelas curiosidades científicas compartilhadas quase que semanalmente. Você já faz parte da família e tem todo o meu carinho.

À minha família, em especial aos meus avós e à minha prima Jú por todo o amor e apoio. Amo muito vocês.

Aos meus amigos Anne, Eduardo, Raissa, Bruna, Victoria, Suélen, Camila e Tanisa pelos reencontros inesquecíveis, pelos abraços e pelas risadas. Estamos juntos, com ou sem salário, até a velhice. Amo muito vocês.

Aos meus colegas de graduação pela amizade construída nesses anos de estresse, de felicidade e de sabedoria.

Aos professores do curso de graduação em Ciências Biológicas pelos ensinamentos, em especial ao César e Dornelles pelo espaço cedido para o cafezinho e pelo acolhimento.

Aos presentes que a UFPel me deu: Aline, Priscila, Mariana e Luize, vocês são incríveis, minha passagem por Pelotas não teria sido a mesma sem vocês. Sou grata eternamente e espero que a nossa amizade seja mantida por muitos anos. Na boa e na ruim, eterno bonde das borboletas.

Em especial à minha orientadora Juliana Cordeiro por todas as oportunidades, paciência e ensinamentos. Sou grata a você pelas pequenas, mas importantes conquistas. Obrigada por além de ter sido uma excelente orientadora ser uma ótima amiga. Você tem um lugar especial no meu coração desesperado.

Ao meu co-orientador Leo por toda paciência em campo, pelos ensinamentos e pelos dias e noites inesquecíveis de medo, cansaço, mas principalmente de satisfação.

Aos meus amigos Cris e Yuri pelo apoio e pelos abraços, por suprirem toda a falta que um irmão faz no meu dia a dia. Muito obrigada de coração, vocês são demais.

Resumo

CARVALHO, Tuane Letícia. **Uso de técnicas moleculares para a delimitação de espécies crípticas de morcegos do gênero *Carollia* (Chiroptera: Phyllostomidae).** 2015. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Espécies crípticas são espécies morfologicamente idênticas, isoladas reprodutivamente e muito frequentemente simpátricas. *Carollia brevicauda* e *Carollia perspicillata* (Ordem Chiroptera, Família Phyllostomidae) são espécies irmãs que pertencem a um complexo de cinco espécies crípticas, ou complexo *brevicauda*. Estas duas espécies possuem distribuição simpátrica na região da Amazônia, sendo este, aparentemente, o local onde ocorreu a diversificação deste complexo de espécies. Tanto a diversificação recente quanto a sobreposição da distribuição tornam a diferenciação morfológica bastante dificultada. Devido ao desafio que tem sido distinguir corretamente *C. brevicauda* e *C. perspicillata*, este estudo tem como objetivo determinar diferenças genéticas que auxiliem na delimitação destas duas espécies. O estudo foi realizado utilizando análises moleculares de 45 amostras de indivíduos coletados no estado do Pará e Maranhão. Foram analisados os genes *COI* e *CytB* utilizando três metodologias baseadas na técnica de DNA *Barcode*: identificação de Unidades Taxonômicas Operacionais; identificação de *barcode gap* por meio das distâncias genéticas intraespecíficas *versus* interespecíficas; e análise de rede de haplótipos. As análises em sua totalidade apresentaram baixos valores de suporte e divergência genética entre as sequências, sugerindo a necessidade de análises genéticas e morfológicas mais detalhadas. Além disso, foi observado uma diferença entre os marcadores que podem estar associadas às taxas de mutação de cada um. As sequências das amostras coletadas na Amazônia mostraram grande proximidade à espécie *C. perspicillata*.

Palavras-chave: Carollinae; espécies crípticas; DNA *Barcode*; *barcode gap*, rede de haplótipos

Abstract

CARVALHO, Tuane Letícia. **Use of molecular techniques for the delimitation of cryptic species *Carollia* genre bats (Chiroptera: Phyllostomidae).** 2015. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Cryptic species are morphologically identical species, reproductively isolated and very often sympatric. *Carollia brevicauda* and *Carollia perspicillata* (Chiroptera: Phyllostomidae) are sister species belonging to a complex of five sibling species, or *brevicauda* complex. These two species have sympatric distribution in the Amazon region, where the diversification of this species complex take place. Both, the recent diversification and the distribution overlap becomes the morphological differentiation difficult. Because of the challenge that has been to distinguish *C. brevicauda* and *C. perspicillata* correctly, this study aims to determine genetic differences that could assist in the delineation of these two species. The study was conducted using analyzing 45 samples collected in the state of Pará and Maranhão. The COI and CytB genes were analyzed using three methods based on DNA barcode technique: (i) identifying Operating Taxonomic Units; (ii) identification of barcode gap through intraspecific versus interspecific genetic distances; and (iii) haplotype network analysis. The majority of the analyzes showed low support values and low genetic divergence among the sequences, suggesting the need for more detailed genetic and morphological analyzes. Moreover, the differences detected in the results between the markers that may be associated with different mutation rates. However, the sequences of samples collected in the Amazon Forest showed close proximity to the species *C. perspicillata*.

Keyword: Carollinae; cryptic species; DNA Barcode; barcode gap, haplotype network

Lista de figuras

Figura 1 Mapa representativo dos pontos de coleta 17

Figura 2 Relações filogenéticas entre as sequências de *COI* 22

Figura 3 Relações filogenéticas entre as sequências de *CytB* 23

Figura 4 Relações filogenéticas entre as sequências concatenadas..... 24

Figura 5 Gráfico de distribuição genética do gene *COI* 28

Figura 6 Gráfico de distribuição genética do gene *CytB* 28

Figura 7 Gráfico de distribuição genética 28

Figura 8 Rede de haplótipos 30

Lista de Tabelas

Tabela 1 Número de sequências geradas e obtidas *in silico* para o gene *COI* e *CytB*..... 22

Tabela 2 Divergência genética inter e intraespecífica das sequências geradas agrupadas e das sequências obtidas *in silico* para *C. perspicillata* e *C. brevicauda*. 25

Sumário

1 Introdução 9

1.1 Objetivos 11

1.1.1 Objetivo Geral 11

1.1.2 Objetivos Específicos 11

2 Revisão da Literatura 12

2.1 Ordem Chiroptera 12

2.2 Família Phyllostomidae 12

2.3 Gênero *Carollia* 14

3 Materiais e Métodos 17

3.1 Obtenção das sequências 17

3.2 Análise dos dados 18

4 Resultados 21

4.1 Análise de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU´s) 21

4.2 Análise de divergência genética e identificação de *barcode gap* 25

4.3 Análise de agrupamento por rede de haplótipos 29

5 Discussão..... 31

6 Conclusão 34

Referências 35

Apêndices 39

Anexos 47

1 Introdução

O uso de sequências de DNA como caracteres genéticos para auxiliar na discriminação entre espécies vem demostrando grande eficiência em complementar a taxonomia morfológica nos últimos anos. Segundo Hebert et al (2004a), estas técnicas têm sido especialmente eficazes na identificação de espécies consideradas crípticas ou que pertencem a um complexo de espécies, situações onde a taxonomia, apenas por caracteres morfológicos, parece ser dificultada.

Um procedimento que pode fornecer uma solução confiável e eficaz nestes casos é a técnica do DNA *Barcode* (CLARE et al, 2007; FRANCIS et al, 2007; HEBERT et al, 2004b). Esta técnica se baseia no sequenciamento de um gene mitocondrial específico, citocromo oxidase subunidade I (*COI*), cuja sequência de nucleotídeos serve como um "código de barras" para cada espécie; estas sequências são posteriormente depositas em um banco de dados de livre acesso (HEBERT et al, 2003), o *Barcode of Life Data System* (BOLD). A partir da proposta do uso do *COI* como DNA *Barcode*, pôde-se comprovar a eficiência desta técnica quando é identificado que a diversidade genética intraespecífica do gene é menor do que a sua diversidade genética interespecífica (HEBERT et al, 2004b; KEKKONEN; HEBERT, 2014). Isto potencializa a existência de um *barcode gap*, ou seja, a existência de diferenças estatisticamente significativas entre a divergência genética entre indivíduos da mesma espécie e entre indivíduos de espécies diferentes. Assim, a presença de um *barcode gap* possibilita identificação de indivíduos cujas distâncias genéticas estejam abaixo deste valor de *gap*, sendo considerados indivíduos de mesma espécie. Desta forma, o gene *COI* pode ser usado como uma ferramenta de identificação taxonômica (JORGER; SCHRODL, 2013; PUILLANDRE et al, 2011; WINTERBOTON et al, 2014).

Várias técnicas têm sido descritas para estabelecer qual a melhor forma de identificar o *barcode gap*, considerando que pode haver uma sobreposição das distâncias intraespecíficas e interespecíficas, sendo difícil definir um limite de valores de forma visual (MEIER et al, 2008). Neste contexto, Puillandre et al (2011) propuseram o método *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) que detecta automaticamente o *barcode gap*, separando as sequências em potenciais espécies. A partir de possíveis limites de distâncias genéticas para pares da mesma espécie, o algoritmo faz uma partição preliminar das sequências e calcula o limite máximo para as distâncias dentro de cada partição. Considerando este limite como o máximo de variação intraespecífica, o algoritmo, então, identifica o *gap* na distribuição de distâncias par-a-par que potencialmente corresponde ao *barcode gap*, ou seja, o primeiro *gap* que ocorreu em uma distância maior do que a calculada no passo anterior. Os indivíduos são, então, separados em grupos de possíveis espécies.

Os morcegos (Ordem Chiroptera) representam a segunda maior ordem no quesito diversidade taxonômica entre os mamíferos (VOSS; EMMONS, 1996). As espécies do gênero *Carollia* (Família Phyllostomidae) são morcegos de pequeno a médio porte, com hábitos frugívoros, que se encontram amplamente distribuídos desde o México até o norte da Argentina, incluindo Brasil e Paraguai (PAVAN et al, 2011). Atualmente o gênero inclui oito espécies: *C. benkeithi*, *C. brevicauda*, *C. castanea*, *C. manu*, *C. monohernandezi*, *C. perspicillata*, *C. sowelli* e *C. subrufa* (VELAZCO et al, 2013). A taxonomia deste gênero tem sido um desafio para muitos especialistas, visto que a morfologia dos principais caracteres diagnósticos apresenta variação fenotípica populacional (JARRIN; MENENDEZ-GUERRERO, 2011).

Carollia perspicillata e *C. brevicauda* são espécies irmãs mais amplamente distribuídas do seu gênero, representando boa parte das capturas nas comunidades onde ocorrem, indicando uma grande abundância (MCLELLAN; KOOPMAN, 2008). São caracterizadas por apresentarem baixa divergência genética interespecífica (3,78%) (VELAZCO et al, 2013). Estudos recentes justificam esta baixa variabilidade à uma origem recente com distribuição simpátrica destas espécies dentro da região da Amazônia Oriental (HOFFMAN; BAKER, 2003; PAVAN et al, 2011). Todas essas características, somadas à dificuldade na taxonomia baseada em caracteres morfológicos, tornam estas duas espécies, assim como as demais do complexo *brevicauda*, espécies crípticas (CLARE, 2011b).

Diversas metodologias moleculares que utilizam premissas de DNA *Barcode*, ou ligadas a genes mitocondriais, mostraram sucesso em responder problemas taxonômicos, filogenéticos e filogeográficos relacionados a morcegos da família Phyllostomidae (BAKER; SOLARI; HOFFMAN, 2002; DITCHFIELD et al, 2000; FERREIRA et al, 2014; HOFFMAN; BAKER, 2003; PAVAN et al, 2011; VELAZCO et al, 2013). Considerando as dificuldades na identificação taxonômica, principalmente devido à ampla distribuição, coexistência em simpátria e baixa divergência genética entre as espécies *C. perspicillata* e *C. brevicauda*, a justificativa deste estudo se baseia na importância da delimitação e descrição de espécies através de análises moleculares como forma alternativa à taxonomia tradicional, sendo a soma dos dois um ponto crucial para a compreensão da biodiversidade. Nossa hipótese é que, baseado na eficiência que a técnica que de DNA *Barcode* vem demostrando, as análises aqui apresentadas sejam capazes de delimitar geneticamente essas duas espécies crípticas de morcego.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Este projeto tem como objetivo geral determinar as diferenças genéticas que auxiliem na delimitação de espécies crípticas de duas espécies de morcegos, *Carollia perspicillata* e *Carollia brevicauda*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Analisar a eficiência da técnica de DNA *Barcode* para delimitar as espécies;
- Identificar o valor de *barcode gap* que delimita as divergências intraespecíficas e interespecíficas de duas espécies do gênero *Carollia*; e,
- Determinar a eficiência da análise de rede de haplótipos para auxiliar a identificação e delimitação de espécies crípticas.

2 Revisão de literatura

2.1 Ordem Chiroptera

Por meio da técnica de DNA *Barcode*, Clare (2011a) realizou uma das maiores pesquisas sobre levantamento de diversidade de espécies de morcegos neotropicais, comparando diferentes habitats em ampla distribuição geográfica. Com 9000 indivíduos analisados, distribuídos em 163 espécies, pode-se comprovar a eficiência desta ferramenta na identificação de espécies, independente da escala geográfica e do tamanho da amostra. Este estudo gerou uma biblioteca de dados moleculares capaz de promover e orientar as pesquisas a respeito de sistemática e filogeografia em Chiroptera.

2.2 Família Phyllostomidae

A taxonomia molecular foi utilizada para analisar detalhadamente a filogenia e sistemática do gênero *Artibeus* (REDONDO et al, 2008). A separação clara entre dois subgêneros, *Artibeus* (morcegos de grande porte) e *Dermanura* (morcegos de pequeno porte), além de um possível subgênero apresentado como *Koopmania* (*A. concolor*), foram demonstradas. Ao todo, quatro espécies possivelmente novas foram encontradas, reforçando a diversidade escondida dentro do gênero.

A associação entre a diversidade genética e a capacidade de dispersão em pequenos mamíferos foi estudada comparando-se padrões filogeográficos e de co-distribuição (DITCHFIELD et al, 2000). Baseando-se na análise da diversidade genética do gene citocromo oxidase B (*CytB*), os autores verificaram a existência de baixos valores de divergência genética intraespecífica para espécies que apresentam ampla capacidade de dispersão, como morcegos filostomídeos.

Comparativamente, os valores encontrados para as relações entre pequenos roedores e marsupiais, que possuem menor área de dispersão, foram muito maiores. Devido ao alto nível de isolamento genético, não houve compartilhamento de haplótipos nas populações de roedores e nas de marsupiais. Enquanto para os morcegos, que apresentam maior capacidade de dispersão, foi encontrado baixos valores de diversidade genética entre populações.

A evolução da especialização alimentar de morcegos Phyllostomidae foi avaliada por Daztmann et al (2010). Todas as linhagens, com diferentes estratégias de alimentação, evoluíram dentro de um período relativamente curto de cerca de 10Ma, do Oligoceno ao Mioceno. Mudanças climáticas e mudanças para uma dieta vegetariana poderiam ter ampliado a área de distribuição levando à diferenciação destas linhagens. Os gêneros nectarívoros *Lonchophylla* e *Lionycteris* (subfamília Lonchophyllinae) se mostraram mais relacionados com filostomídeos frugívoros das subfamílias Rhinophyllinae, Stenodermatinae, Carolliinae, e com o filostomídeo insetívoro da subfamília Glyphonycterinae, do que com o filostomídeo nectarívoro da subfamília Glossophaginae, o que seria o esperado por apresentar o mesmo tipo de especialização alimentar. Esses dados sugerem uma origem independente de adaptações nectarívoras para estas duas subfamílias.

Clare et al (2011b) examinou os padrões genéticos mitocondriais, baseado no gene COI, com os padrões nucleares do cromossomo Y, baseado no íntron do gene *Dby*, para verificar qual a melhor explicação de herança na especiação críptica de oito espécies de morcegos neotropicais (*Chrotopterus auritus*, *Saccopteryx bilineata*, *Glossophaga soricina*, *Desmodus rotundus*, *Trachops cirrhosus*, *Uroderma bilobatum*, *Micronycteris megalotis* e *Platyrrhinus helleri*). Em *C. auritus*, *G. soricina* e *S. bilineata* a autora observou a existência de linhagens evolutivas independentes para ambos os genes, sugerindo a existência de isolamento reprodutivo. *Desmodus rotundus*, *T. cirrhosus*, *U. bilobatum*, *P. helleri* e *M. megalotis* não apresentaram variação consistente com os complexos de espécies propostos pela análise do gene *Dby*. Enquanto o *COI* se mostrou eficiente para a identificação das espécies de morcego. A autora conclui que um único locus demonstrou ser insuficiente para resolver situações hipotéticas de espécies crípticas.

Hernandez Dávila et al (2012) testaram a eficiência do gene mitocondrial *COI* na obtenção de um inventário mais preciso de filostomídeos. A diversidade genética e os padrões filogeográficos de morcegos da Península de Yucatan, do sudeste do

México e do norte da Guatemala foram analisadas e comparadas com amostras da América Central. A prevalência de espécies crípticas também foi investigada. Como resultados foram encontrados valores baixos de variação intraespecífica na maioria das espécies (média=0,75%), variando 8,8% para alguns indivíduos (*Desmodus rotundus* e *Artibeus jamaicensis*). Essa variação pode estar sugerindo a presença de espécies crípticas. Os padrões biogeográficos foram encontrados em oito espécies com uma separação das Américas, em quatro espécies para a Península de Yucatán e em cinco espécies para o Panamá.

A filogenia de Phyllostomidae foi estudada comparando genomas mitocondriais completos de 10 espécies que pertencem à família, incluindo sete subfamílias, entre elas Carollinae (BOTERO-CASTRO et al, 2013). Os resultados foram comparados com dados nucleares (genes *RAG2* e *VWF*). Os dados obtidos pelos autores reforçaram a filogenia de Phyllostomidae já existente (CLARE et al, 2011b).

Os padrões de divergência genética entre populações da espécie *Artibeus obscurus* (família Phyllostomidae) em diferentes locais na Amazônia foram investigados e comparados com outras regiões brasileiras e sul-americanas por Ferreira et al (2013), utilizando um fragmento de 1010bp do gene mitocondrial *CytB*. As amostras sugeriram divergência entre dois grupos monofiléticos associados aos biomas Mata Atlântica e Amazônia, com uma clara divisão Leste/Oeste onde a Mata Atlântica foi separada da Amazônia e Pantanal. Uma população de Bragança (norte do Brasil) mostrou evidência de uma expansão no sul do Brasil, com a formação de dois filogrupos distintos, sugerindo a existência de duas categorias taxonômicas diferentes (espécie e subespécie) para esta população. Esta diferença pode ser justificada por eventos de migração associados a um possível mecanismo de isolamento reprodutivo.

2.3 Gênero *Carollia*

Para compreender as relações filogenéticas entre *Carollia* e *Rhinophylla*, Wright (1999) analisou 1140pb do gene *CytB* para ambos os gêneros. Dentro do gênero *Carollia*, *C. perspicillata* e *C. brevicauda* são as espécies mais intimamente relacionadas, enquanto dentro do gênero *Rhinophylla*, as relações entre as espécies são mais confusas e sugerem uma divergência simultânea para as espécies *R.*

pumilio, *R. fischerae* e *R. alethina*. Considerando que a taxa de evolução do gene *CytB* seja a mesma dentro dos gêneros, os dados indicam uma divergência mais recente para as espécies de *Rhinophylla* do que para as espécies de *Carollia*. Os autores ainda sugerem que se houve um ancestral em comum entre *Carollia* e *Rhinophylla*, essa ancestralidade durou por um curto período de tempo.

Em um estudo de Baker et al (2002) foram reavaliados quatorze novos espécimes do gênero *Carollia* da América Central, até então identificados como *Carollia brevicauda*. Diferenças como o tamanho total do corpo, do crânio e das medidas do antebraço e da tíbia reconduziram os novos espécimes para *C. sowelli*, e os distinguiram de *C. perspicillata* e *C. brevicauda*. Além disso, uma divergência genética interespecífica de 3,6% separou *C. sowelli* de *C. brevicauda*. Contudo, os autores reforçam a importância de novas análises baseadas na morfologia e no uso de genes nucleares.

A fim de comparar espécies relacionadas de morcegos neotropicais da família Phyllostomidae, foi realizado o primeiro estudo de filogeografia utilizando o gene mitocondrial *CytB* (HOFFMAN; BAKER, 2003). Foram analisadas quatro espécies de morcegos frugívoros do gênero *Carollia*, dentre eles *C. brevicauda*, *C. castanea*, *C. perspillatta* e *C. sowelli*. As análises dos dados mostraram alto percentual de haplótipos compartilhados com baixos níveis de variação interespecífica para *C. brevicauda*, *C. perspicillata* e *C. sowelli*, potencialmente refletindo a divergência recente dessas espécies. A variação intraespecífica dentro de *C. brevicauda* e *C. perspicillata* sugeriu uma diversificação em um mesmo momento ao longo de diferentes áreas na América do Sul. Considerando o relógio molecular, a diversificação de *Carollia* teria ocorrido devido à migração destes morcegos durante a formação do Istmo do Panamá, porém não se pode descartar a atuação da Cordilheira dos Andes como um agente biogeográfico nestes morcegos. Os autores ainda indicam que a resolução dos dados moleculares para *C. castanea* ficou incompleta, merecendo estudos mais aprofundados.

Para testar hipóteses a respeito da origem e diversificação de *C. perspicillata* e *C. brevicauda* foi realizado um estudo de filogeografia utilizando uma ampla amostragem e sequências do gene *CytB* (PAVAN et al, 2011). Os autores sugeriram que estas espécies se diversificaram em um evento único durante o Pleistoceno. Os autores ainda apontam que, o lugar mais parcimonioso para o surgimento do ancestral dessas duas espécies, teria sido na Amazônia.

Para compreender melhor a diversificação e evolução do gênero *Carollia* sp. foi realizado a primeira análise filogenética da espécie *Carollia manu* (VELAZCO et al, 2013). A posição filogenética de *C. manu* foi avaliada a partir do sequenciamento do gene mitocondrial *CytB* de dois espécimes com a morfologia semelhante à da espécie, de espécimes do Peru correspondentes a outras espécies do gênero e de sequências disponíveis em banco de dados online para a espécie. Como resultado foram recuperadas nove linhagens para o gênero, sendo duas jamais descritas antes. Dois clados principais puderam ser vistos, um contendo espécies menores (*C. benkeithi* e *C. castanea*) e o outro contendo espécies maiores (*C. subrufa*, *C. sowelli*, *C. perspicillata* e *C. brevicauda*). A espécie *C. manu* foi recuperada como espécie irmã de *C. subrufa.* Valores baixos de diversidade intraespecífica foram encontrados para *C. perspicillata* (1,67%) e para *C. brevicauda* (1,79%). Além disso, a divergência interespecífica entre essas duas espécies foi de apenas 3,75%. Através deste estudo pôde-se comprovar o forte monofiletismo do gênero.

3 Material e Métodos

3.1 Obtenção das sequências

Os espécimes de *Carollia* sp. (Tabela 1) foram coletados em vários pontos dos estados do Pará e Maranhão (Apêndice A), representando uma parte da área de distribuição simpátrica de *C. perspicillata* e *C. brevicauda* na Amazônia (Figura 1). A coleta e a identificação prévia dos espécimes foram realizadas pela equipe de pesquisadores do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), coordenada pelo doutorando MSc. Leonardo Carreira Trevelin. Para a análise molecular, foram obtidas amostras de tecidos (músculo do bíceps, quando possível, ou amostra da asa) de indivíduos que apresentaram divergência morfológica dos caracteres taxonômicos para *C. perspicillata*. As amostras foram preservadas em álcool absoluto e armazenadas em *freezer*.

Figura 1 - Mapa representativo dos pontos de coleta dos estados do Pará e Maranhão, representando uma porção da área de distribuição de *Carollia perspicillata* e *Carollia brevicauda* na Amazônia. O estado do Pará é representado pelos pontos de Nova Ipixuna, Paragominas, Tailândia, Moju e Vizeu. A Reserva Biológica do Gurupi Sul e do Gurupi Norte pertencem ao estado do Maranhão.

Para isolamento do DNA total, foi utilizado o kit de extração *DNeasy® Blood and Tissue* (Qiagen), seguindo o protocolo padrão informado pelo fabricante. Foram analisados dois genes mitocondriais. Um fragmento do gene mitocondrial *CytB* foi amplificado utilizando o par de *primer* específicos para morcegos H15318 e L14121 (REDONDO et al, 2008). O fragmento do gene mitocondrial *COI* foi amplificado utilizando o par de *primer* universal LCO1490 e HCO2198 (FOLMER et al, 1994). As amplificações foram feitas por Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction* – PCR) em um volume final 25ul usando aproximadamente 150ng de DNA, 0,6mM de cada *primer*, 1U de *Taq DNA polymerase recombinant* (Invitrogen), 0,4mM de cada dNTP, 1X de tampão e 3mM de $MgCl_2$. O programa de PCR seguiu as seguintes etapas: 5min de desnaturação a 95°C, 35 ciclos de 1min a 95°C (etapa de denaturação), 1min à 50ºC (para o gene *COI*) e 55°C (para o gene *CytB*) (etapa de anelamento) e 1min a 72°C (etapa de extensão), o programa finalizou com uma etapa de elongação de 5min a 72°C. Os amplicons foram conferidos em gel de agarose 1%, corados com GelRed (Biotium). As amostras positivas para o tamanho de aproximadamente 1000pb (*CytB*) ou 700pb (*COI*) foram purificadas seguindo o protocolo do *kit Illustra™ GFX™ DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). As amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa Macrogen (http://dna.macrogen.com/eng/). Ambas as fitas (*forward* e *reverse*) foram sequenciadas.

Foi realizada uma busca *in silico* nos bancos de dados do BOLD (para as sequências de *COI,* Anexo A) e GenBank (para as sequências de *CytB,* Anexo B) tanto para *C. brevicauda* quanto para *C. perspicillata*.

3.2 Análise dos dados

A qualidade dos cromatogramas resultantes do sequenciamento foi verificada com o programa FinchTV (http://geospiza.com/Products/finchtv.shtml). As sequências consenso foram montadas usando o pacote de programas Staden Package (STADEN, 1996). O alinhamento das sequências foi montado usando a ferramenta ClustalW contida no programa MEGA6 (TAMURA et al, 2013). Para evitar o uso nas análises de cópias de DNA mitocondrial presentes no genoma nuclear (*Nuclear Mitochondrial DNA* - NUMT´s), ou seja, pseudogenes, todas as sequências utilizadas foram analisadas de três formas: (i) verificação de sequências

homólogas através da ferramenta de livre acesso BLASTN fornecida pelo NCBI (http://ncbi.nlm.nih.gov/); (ii) identificação de *stop codon* nas sequências traduzidas; e, (iii) teste Z de seleção, utilizando o método de Nei-Gojobori no programa MEGA6. Este teste verifica a probabilidade de rejeição da hipótese de neutralidade (dN=dS) em favor da hipótese de seleção purificadora (dN<dS); onde: dN = número de substituições não sinônimas em sítios não sinônimos e dS = número de substituições sinônimas em sítios sinônimos.

Para a delimitação de potenciais espécies representadas nas sequências aqui geradas, foram utilizadas três metodologias já empregadas para DNA *Barcode*. Primeiramente, utilizamos a análise de identificação de Unidades Taxonômicas Operacionais (*Operational Taxonomic Units* – OTUs) (HEBERT et al 2003; 2004a, b) que se baseia na observação da formação de unidades de sequências agrupadas de forma monofilética, baseado em modelo evolutivo Neighbor-Joining (NJ) (SAITOU; NEI, 1987) e modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros (K2p) (KIMURA, 1980). Estas análises foram realizadas no programa MEGA6. Como *outgroup* foram usadas as sequências de *Rynophilla pumilio* (JQ601427), *R. fischerae* (JF449110) e *R. lethina* (JF449110) para o *COI*, e *R. pumilio* (DQ312397)*, R. fischerae* (AF187032) *e R. lethina* (AF187028) *para o CytB.* Na análise dos dados concatenados, as sequências para *C. perspicillata* e *C. brevicauda* obtidas *in silico* foram adquiridas a partir dos dados disponíveis no BOLD e GenBank para indivíduos do Equador (VELAZCO et al, 2013). Como *outgroup*, foram utilizadas as mesmas sequências utilizadas nas análises separadas de *COI* e *CytB*.

O segundo método utilizado foi a análise de divergência genética com identificação de *barcode gap*. A divergência genética das sequências foi calculada pelo modelo de substituição nucleotídica K2p (HEBERT et al, 2004a, b), com 500 réplicas de *bootstrap*, utilizando o programa MEGA6. Devido ao grande conjunto de dados adquiridos *in silico* (Anexo A e B), tanto nas análises de OTU´s quanto de *barcode gap*, foi utilizada uma sequência representativa de cada haplótipo identificadas com o programa DnaSP 5.19 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Os valores de *barcode gap* encontrados foram testados com o programa *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) (PUILLANDRE et al, 2011), disponível em http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html, sempre utilizando o modelo evolutivo K2p.

O terceiro método de análise de delimitação de espécies foi a análise de rede de haplótipos, onde é possível realizar uma relação genética entre os haplótipos. Para esta análise foi utilizado apenas as sequências concatenadas. A rede de haplótipos foi gerada usando o algoritmo median-joining no programa Network (BANDELT et al, 1999).

4 Resultados

Para o gene *COI*, 43 sequências foram geradas e 1310 sequências adquiridas *in silico*. Para o gene *CytB*, 36 sequências foram geradas e 119 sequências adquiridas *in silico*. Todas as sequências foram testadas para a presença de NUMT´s, conforme descrito anteriormente. Nenhuma sequência foi identificada como cópia não funcional pois não apresentaram *stop codon*, foram identificadas corretamente quando utilizado o algoritmo BLASTN, e rejeitaram a hipótese de seleção neutra, em favor da hipótese de seleção purificadora.

4.1 Análise de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU´s)

A tabela 1 apresenta o número de sequências obtidas para *COI* e *CytB*. Para a análise do gene *COI*, a matriz de dados finalizou com um tamanho total de 666pb, apresentando 41 sítios polimórficos, sendo 12 parcimoniosamente informativos e 29 mutações únicas (*singletons*). A reconstrução filogenética das sequências de *COI* para análise de OTU´s (Figura 2 resumida e Apêndice B expandida) foi realizada utilizando 609 sequências. As sequências obtidas *in silico* para *C. brevicauda* se apresentaram como um grupo parafilético, e as sequências de *C. perspicillata* se apresentaram como polifiléticas. Além disso, a maioria dos índices de confiabilidade dos ramos apresentaram baixo valor de *bootstrap*.

Tabela 1: Número de sequências geradas e obtidas *in silico* para o gene *COI* e *CytB*. Em parênteses está o número de haplótipos resultante (ver texto).

Localidade/espécies	COI	CytB	Análise concatenada
Rebio do Gurupi Norte	02	02	02
Rebio do Gurupi Sul	04	04	04
Moju	06	07	06
Tailândia	05	05	05
Paragominas	09	10	09
Nova Ipixuna	06	05	05
Vizeu	11	03	03
C. brevicauda (*in silico*)	228 (127)	31 (30)	05
C. perspicillata (*in silico*)	1082 (439)	88 (81)	05

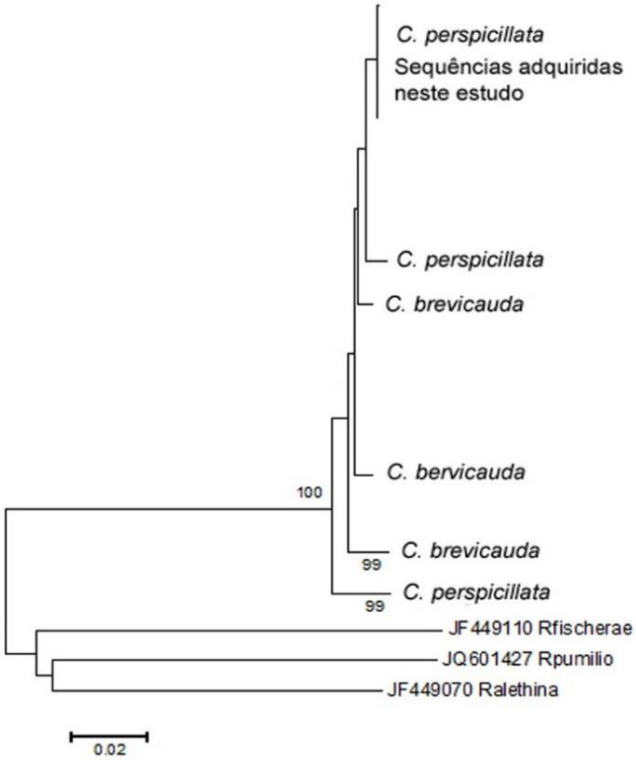


Figura 2 – Reconstrução filogenética consenso resumida das sequências de *COI* geradas neste estudo (43) e dos haplótipos representantes de cada uma das sequências obtidas *in silico* para *C. perspicillata* (439) e *C. brevicauda* (127). Método de reconstrução filogenética: Neighbor Joining. Modelo de substituição nucleotídica: Kimura 2-parâmetros. 500 réplicas de *bootstrap*. Valores abaixo de 90% de *bootstrap* foram retirados. Para os dados completos, ver Apêndice B.

Para o gene *CytB*, a matriz de sequências teve um tamanho total de 1091pb e 47 sítios polimórficos, sendo 24 parcimoniosamente informativos e 23 mutações únicas (*singletons*). A reconstrução filogenética para análise de OTU´s das sequências (Figura 3, resumida e Apêndice C expandida) foi realizada utilizando 147 sequências. Nesta análise dois clados monofiléticos principais foram recuperados.

Um clado agrupou as sequências de *C. brevicauda* e apresentou baixo valor de *bootstrap* (68%). O outro clado agrupou as sequências geradas neste estudo, juntamente com as sequências de *C. perspicillata*, e apresentou alto valor de *bootstrap* (94%).

A análise concatenada dos genes *COI* e *CytB* foi realizada com 36 sequências (Tabela 1). Para as sequências aqui geradas, foram utilizadas sequências do mesmo indivíduo. Para as sequências adquiridas *in silico*, foram utilizadas cinco sequências de *C. perspicillata* e cinco de *C. brevicauda* provenientes da mesma localidade (ver seção 3). A matriz de dados finalizou com um tamanho de 1248pb, apresentando 122 sítios polimórficos e 67 parcimoniosamente informativos. A reconstrução filogenética das sequências concatenadas para análise de OTU´s (Figura 4) agrupou as sequências de *C. perspicillata* em um clado monofilético principal com baixo valor de suporte (52%). Já as sequências concatenadas de *C. brevicauda* se apresentaram como um grupo parafilético.

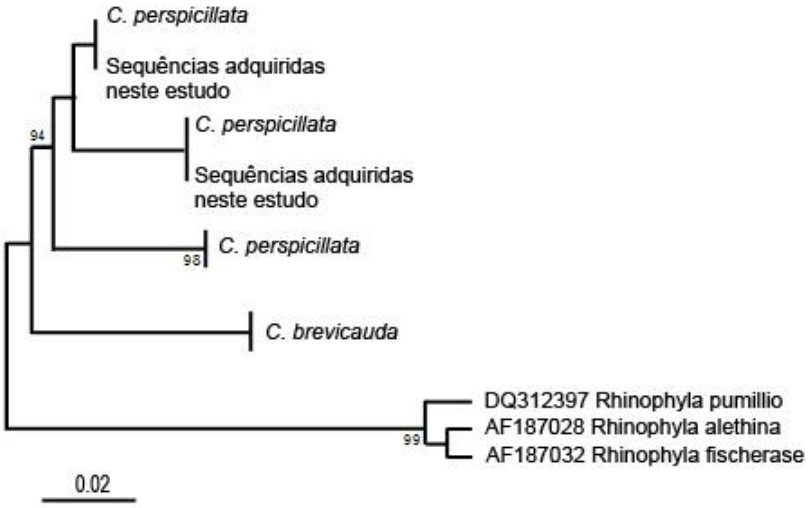


Figura 3 - Reconstrução filogenética consenso apresentada de forma resumida das sequências de *CytB* geradas neste estudo (34) e dos haplótipos representantes de cada uma das sequências obtidas *in silico* para *C. perspicillata* (81) e *C. brevicauda* (30). Método de reconstrução filogenética: Neighbor Joining. Modelo de substituição nucleotídica: Kimura 2-parâmetros. 500 réplicas de *bootstrap*. Valores abaixo de 90% de *bootstrap* foram retirados. Para os dados completos, ver Apêndice C.

De uma forma geral, a maioria dos clados em todas as análises (*COI*, *CytB* e dados concatenados), apresentaram valores baixos de *bootstrap* dando baixo suporte aos ramos. Em relação às sequências geradas neste estudo, em todas as análises, elas agruparam com as sequências obtidas *in silico* para *C. perspicillata*.

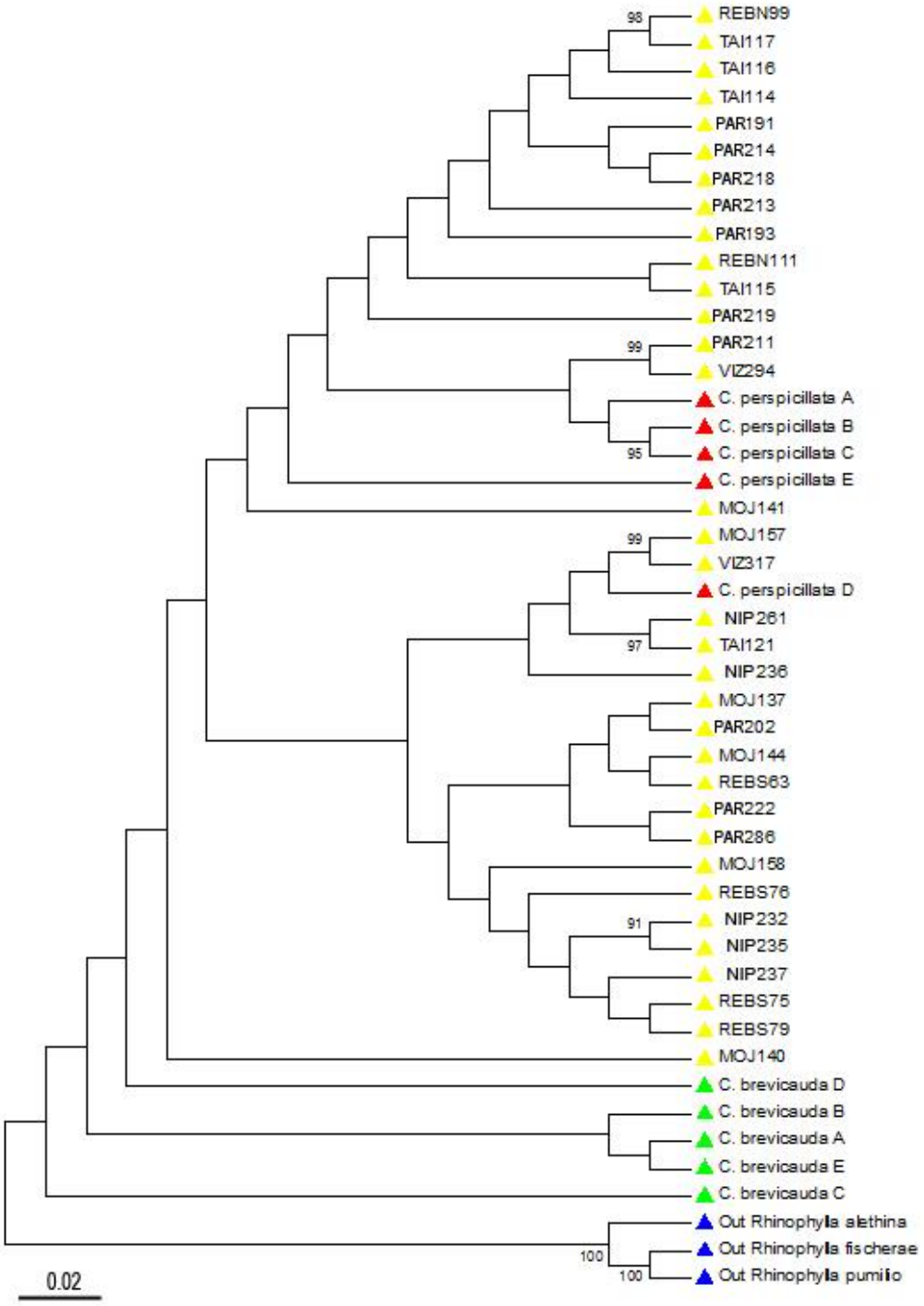


Figura 4 - Reconstrução filogenética consenso dos dados concatenados. Triângulos amarelos: sequências geradas neste estudo; triângulos vermelhos: sequências adquiridas *in silico* para *C. perspicillata*; triângulos verdes: sequências adquiridas *in silico* para *C. brevicauda*; triângulos em azul: sequências utilizadas como *outgroup*. Método de reconstrução filogenética: Neighbor Joining. Modelo de substituição nucleotídica: Kimura 2-parâmetros. 500 réplicas de *bootstrap*. Valores abaixo de 90% de *bootstrap* foram omitidos.

4.2 Análise de divergência genética e identificação de *barcode gap*

Para a análise de divergência genética e identificação de *barcode gap,* agrupamos as sequências adquiridas *in silico* de *C. perspicillata* como pertencente à mesma espécie. Realizamos o mesmo procedimento para as sequências de *C. brevicauda*. Para as sequências geradas neste estudo, inicialmente, agrupamos por localidade. As análises foram feitas de forma separada para as sequências de *COI*, de *Cytb*, e as sequências concatenadas (Apêndice D). Os valores de divergência variam de 0% (sequências altamente similares) a 100% (sequências altamente divergentes). A média geral das divergências genéticas para o gene *COI* foi de 1,4%; para o gene *CytB* foi de 2,4%; e para as sequências concatenadas foi de 1,6%.

A tabela 2 apresenta os valores de divergência genética intraespecíficos e interespecíficos. Para a análise de divergência as sequências aqui geradas foram agrupadas (Tabela 2) e calculadas as divergências inter e intra comparando com as sequências *in silico*.

Tabela 2 - Divergência genética interespecífica (abaixo da diagonal) e intraespecífica (na diagonal em negrito) das sequências geradas neste estudo e agrupadas, e das sequências obtidas *in silico*, agrupadas por espécie, para *C. perspicillata* e *C. brevicauda*. Os valores das análises de *COI*, *CytB* e concatenadas são representados nesta mesma ordem, da esquerda para a direita, separados por barra. Os valores estão em porcentagem (%).

	Sequências geradas	*C. brevicauda*	*C. perspicillata*
Sequências geradas	**0,6 / 1,4 / 1,1**		
C. brevicauda	2,2 / 4,0 / 3,1	**1,7 / 1,8 / 1,4**	
C. perspicillata	0,7 / 1,7 / 1,3	2,4 / 3,9 / 3,2	**0,9 / 1,7 / 1,2**

Em relação às divergências intraespecíficas, os valores das sequências *in silico* de *C. perspicillata* foram de 0,9% (*COI*), 1,7% (*CytB*) e de 1,2% (*COI*+*CytB*). Para *C. brevicauda* os valores intraespecíficos foram de 1,7%, 1,8% e 1,4%. Para as sequências geradas neste estudo, os valores de divergência genética entre as sequências de mesma localidade (Apêndice D) foram bastante baixos, variando de 0,3% a 0,6% (*COI*), 0,5% a 1,7% (*CytB*) e 0,4% a 1,2% (*COI*+*CytB*). Quando as sequências foram todas agrupadas (Tabela 2), esses valores passaram para: 0,6% (*COI*), 1,4% (*CytB*) e 1,1% (*COI*+*CytB*).

Em relação aos valores de divergência genética interespecíficos (Tabela 2; Apêndice D), todas as sequências aqui geradas foram agrupadas (independentemente da localidade) e comparadas com as sequências *in silico*. Este agrupamento foi feito com base no fato de que as divergências genéticas (intraespecíficas e interespecíficos) foram muito baixas, e de que não houve agrupamento monofilético específico das sequências aqui geradas (Figuras 2, 3 e 4). Os valores obtidos na comparação entre *C. perspicillata* e sequências geradas aqui foram de 0,7% (*COI*), 1,7% (*CytB*) e 1,3% (*COI+CytB*). Nas comparações com *C. brevicauda* foram obtidos os valores de 2,2% (*COI*), 4,0% (*CytB*) e 3,1% (*COI+CytB*). Na comparação da divergência genética entre *C. perspicillata* e *C. brevicauda*, os valores foram de 2,4% (*COI*), 3,9% (*CytB*) e 3,2% (*COI+CytB*) (Tabela 2).

A existência de uma lacuna (*barcode gap*) entre as sequências interespecíficas e intraespecíficas, significa dizer que existe uma diferenciação real entre as sequências pertencentes a uma mesma espécie e as sequências de espécies diferentes; auxiliando na delimitação de diferentes espécies. Para visualizar a existência de tal *barcode gap*, foram construídos gráficos de divergência genética das sequências agrupadas de *C. brevicauda*, *C. perspicillata* e das diferentes localidades (Figuras 5, 6 e 7).

A figura 5 apresenta o gráfico dos dados de divergência genética para o gene *COI*. De forma geral, os valores de divergência interespecíficos foram muito baixos, assim como alguns valores de divergência genética intraespecíficas foram altos (por exemplo, no intervalo de 1,6%-2,0% estão presentes comparações intraespecíficas de *C. brevicauda* (Tabela 2). Isto demonstra que *C. brevicauda* apresenta alta variabilidade genética em relação a *C. perspicillata,* dificultando a identificação de um *barcode gap*. O programa *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) (PUILLANDRE et al, 2011) foi utilizado para testar esse *barcode gap*. Com o valor padrão do programa (1,5%), para todas as análises (*COI*, *CytB* e *COI+CytB*) não foi possível realizar a divisão inicial dos dados, o que é necessário para o êxito da análise. Portanto, diminuímos o valor para 1,0%, como proposto pelo próprio programa. Com isso, houveram duas possibilidades de agrupamento das sequências: (i) existe apenas uma potencial espécie no nosso conjunto de dados, agrupando todas as sequências; ou, (ii) existem nove potenciais espécies no nosso conjunto de dados, agrupando sequências de *C. brevicauda* em

sete espécies potencialmente diferentes, e as sequências de *C. perspicillata* em conjunto com as aqui geradas em duas espécies potencialmente diferentes.

A figura 6 apresenta o gráfico dos dados de divergência genética para o gene *CytB*. Com os dados de *CytB* foi possível identificar um *barcode gap* por volta dos valores de 2,4% a 3,6%. Porém, quando estes valores foram testados com o programa ABGD todas as sequências foram identificadas como pertencendo a apenas uma espécie em potencial, inclusive as obtidas *in silico.* Quando testamos valores menores, como sugerido pelo próprio programa, só foi possível encontrar potenciais espécies com o valor de *barcode gap* de 0,5%. Com este valor, houveram três cenários possíveis: (i) existe somente uma potencial espécie no nosso conjunto de dados, agrupando todas as sequências; (ii) existem duas potenciais espécies no nosso conjunto de dados, agrupando sequências de *C. brevicauda*, e as sequências de *C. perspicillata* em conjunto com as aqui geradas; ou, (iii) existem oito potenciais espécies no nosso conjunto de dados, onde as sequências de *C. brevicauda* se dividem em sete potenciais espécies, e as sequências de *C. perspicillata*, agrupadas com as aqui geradas, formam apenas uma potencial espécie.

A figura 7 apresenta os dados das sequências concatenadas. Foi possível identificar um *barcode gap* por volta de 2,0% a 2,8%. Quando os valores de *barcode gap* foram testados com o programa ABGD, só foi possível identificar a separação de potenciais espécies utilizando o valor de *gap* de 0,5%. Com este valor, o programa ABGD nos apresenta dois possíveis cenários: (i) ou as sequências agrupam todas como uma mesma espécie (Apêndice E); ou (ii) são propostas 11 potenciais espécies, resultando em diferentes agrupamentos para as sequências de *C. brevicauda*, de *C. perspicillata* e das geradas neste estudo (Apêndice F).

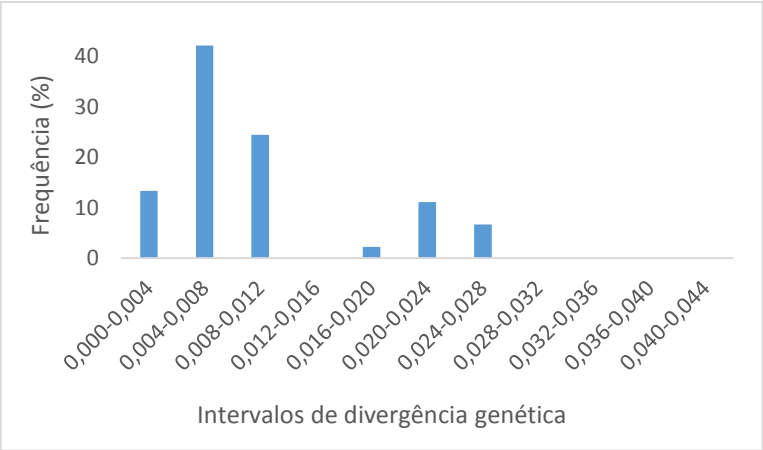


Figura 5 - Gráfico de distribuição nos intervalos de divergência genética em relação a frequência de sequência/indivíduos do gene *COI*.

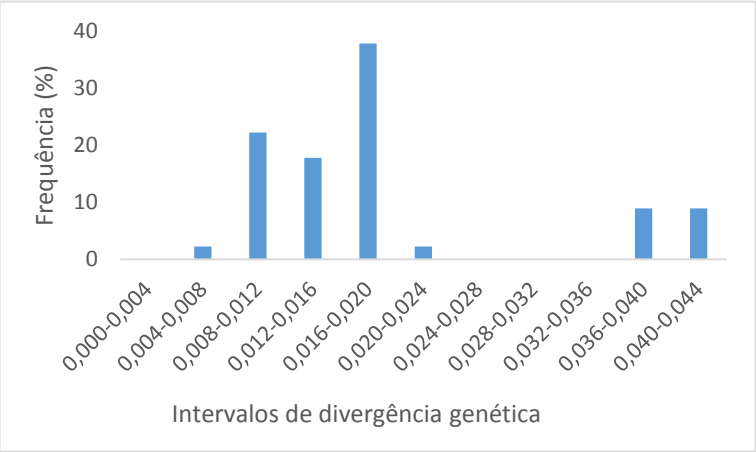


Figura 6 - Gráfico de distribuição nos intervalos de divergência genética em relação a frequência de sequência/indivíduos do gene *CytB*.

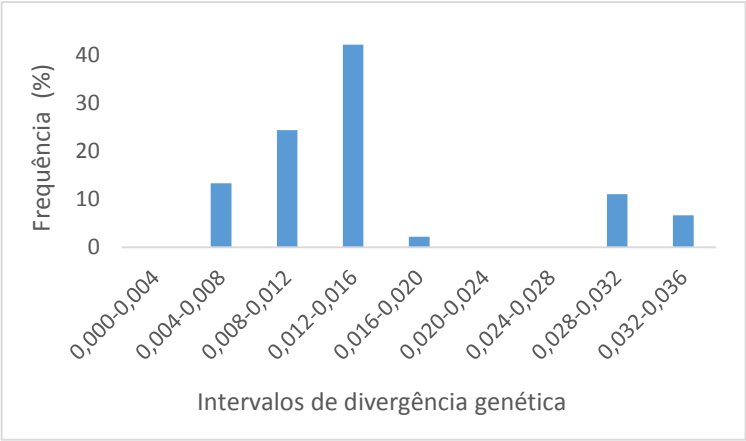


Figura 7 - Gráfico de distribuição nos intervalos de divergência genética em relação a frequência de sequência/indivíduos das sequências concatenadas.

4.3 Análise de agrupamento por rede de haplótipos

Considerando que não foi possível encontrar um valor de *barcode gap* consistente entre nossos dados utilizando os valores de divergência genética; realizamos uma análise de agrupamento por rede de haplótipos para verificar se existe algum padrão de agrupamento dos nossos dados, potencialmente representando diferentes populações na Amazônia. Esta análise foi realizada para os dados de *COI* e de *CytB*, mas devido ao grande conjunto de dados para esses marcadores, apenas os dados concatenados serão apresentados e discutidos.

Na análise de Network com os dados concatenados, foi utilizado o mesmo conjunto de dados das análises anteriores. Todas as sequências adquiridas *in silico* são de indivíduos procedentes do Equador. A matriz utilizada foi a mesma usada na análise de identificação de OTU´s para os dados concatenados (seção 4.1). Nossos dados apresentaram um total de 40 haplótipos, sendo que a diversidade haplotípica foi de Hd=0,996 e a diversidade nucleotídica foi de π=0,01396. A figura 8 apresenta a rede de haplótipos resultante desta análise.

A configuração da rede de haplótipos confirma a separação das sequências de *C. brevicauda* das demais, distante por 24 passos mutacionais. As sequências de *C. perspicillata* se dividiram entre os agrupamentos resultantes das sequências geradas neste estudo. E, por sua vez, essas sequências se dividiram em, aparentemente, três agrupamentos sem relação às localidades provenientes. As sequências de Nova Ipixuna, Moju, Rebio do Gurupi Sul foram reunidas em um mesmo agrupamento (Figura 8). É interessante notar que as sequências de Rebio do Gurupi Sul e Norte se mostraram bastantes diferentes, pertencendo a agrupamentos de haplótipos distintos. Houveram apenas duas situações com compartilhamento de haplótipo entre diferentes localidades, que é o caso do haplótipo H_19 (Moju e Vizeu), H_22 (Vizeu e Tailândia) e H_27 (Paragominas e Tailândia).

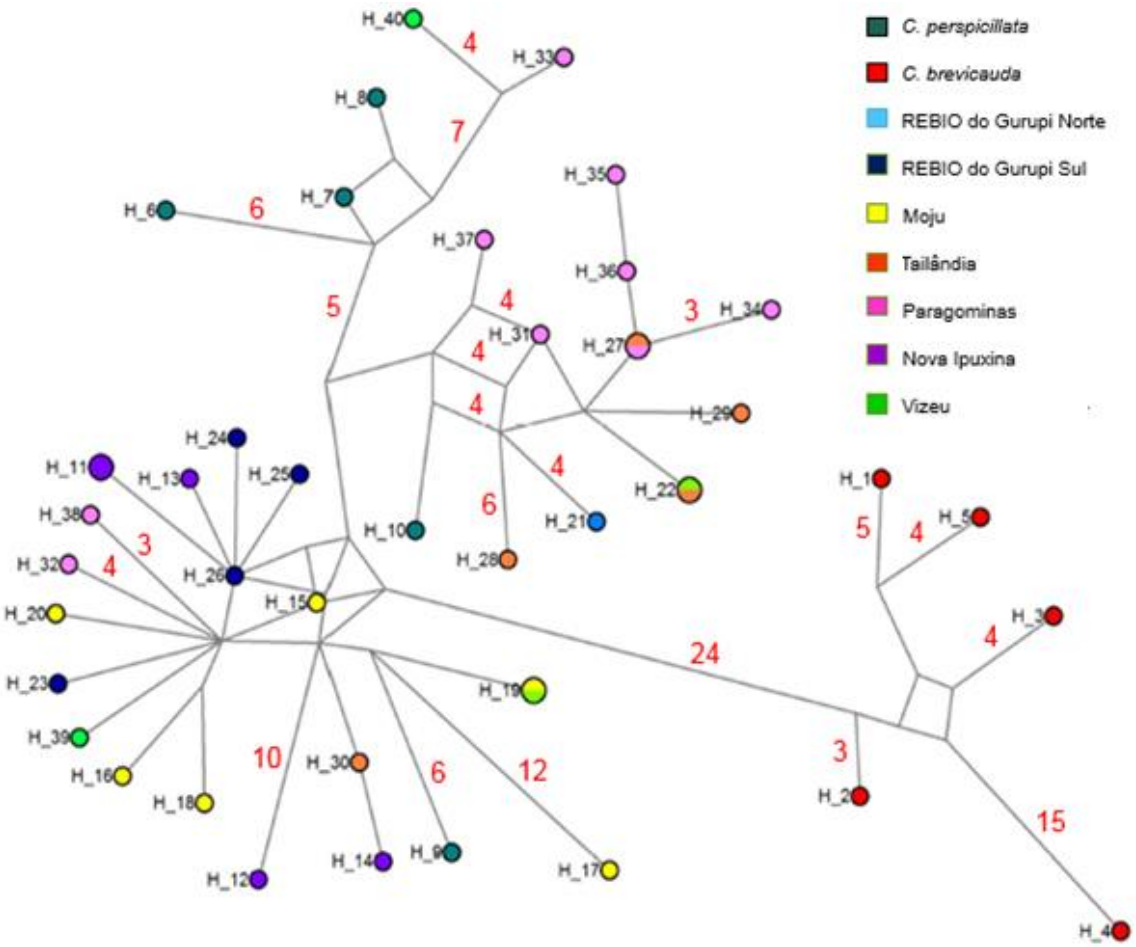


Figura 8 - Rede de haplótipos das sequências concatenadas construída com o algoritmo median-joining no programa Network. Os círculos representam diferentes haplótipos, e os diâmetros são proporcionais à frequência dos haplótipos. O número de mutações por sitio foram representados apenas para valores maiores que duas mutações e se encontram na cor vermelha.

5 Discussão

Analisando as reconstruções filogenéticas (Figuras 2, 3 e 4), podemos perceber que o gene *COI* não foi capaz de recuperar grupos monofiléticos, como o esperado considerando a metodologia de DNA *Barcode* (BLAXTER et al, 2005; HEBERT et al, 2004b). O gene *CytB*, ao contrário, demonstrou ser um bom marcador molecular e conseguiu recuperar dois grupos monofiléticos, um para *C. perspicillata* e outro para *C. brevicauda*, como por Velazco et al (2013). Em todas as análises, no entanto, não foi possível identificar grupos monofiléticos específicos das populações amazônicas pela análise de *COI* e *CytB*. Desta forma, em todas as análises, as sequências aqui geradas agruparam com as sequências obtidas *in silico* para *C. perspicillata.*

As análises de divergência genética resultaram em valores intraespecífico baixos para todas as amostras. Para espécies com alta capacidade de dispersão, como os morcegos, são esperados baixos valores de divergência genética intraespecífica, facilitando a manutenção de fluxo gênico mesmo entre populações menos próximas (CLARE, 2011; DITCHFIELD et al, 2000). Em relação aos valores de divergência genética interespecífico, todas as comparações entre as sequências geradas neste estudo com as sequências de *C. brevicauda* apresentaram valores altos, tanto para a análise de *COI* (2,2%), como na análise de *CytB* (4,0%), e se assemelham aos valores de divergência entre *C. perspicillata* e *C. brevicauda* (2,4% *COI* e 3,9% *CytB*).

Os trabalhos de Baker et al (2002) e Velazco et al (2013) encontraram valores de divergência genética próximos para o gene *CytB*, entre *C. perspicillata* e *C. brevicauda*; de 3,67% no primeiro e 3,75% no segundo trabalho. Esse valor é próximo do encontrado aqui, de 3,9%. Já os valores de divergência genética

interespecífica entre as sequências geradas aqui com as sequências adquiridas *in silico* para *C. perspicillata* foram bastante baixos (0,7% *COI* e 1,7% *CytB*), e próximos aos valores de divergência intraespecífica de *C. perspicillata* (0,9% *COI* e 1,7% *CytB*). Todos estes resultados reforçam a ideia de que as sequências geradas neste trabalho pertencem à espécie *C. perspicillata*.

As diferenças entre os marcadores podem estar associadas às taxas de evolução específicas de cada um. Dos dois marcadores, o *COI* apresenta uma taxa de evolução mais lenta (SIMON et al, 2006), devido a isso, ele pode não recuperar as relações entre espécies que divergiram há muito pouco tempo. Ao contrário, o gene *CytB* apresenta uma taxa de evolução mais rápida, e demonstrou ser um marcador molecular um pouco mais eficiente, recuperando diferenças genéticas entre as espécies (HOFFMAN et al, 2003; PAVAN et al, 2011; VELAZCO et al, 2013).

O uso de um único marcador molecular pode levar a uma interpretação errada da filogenia de um grupo (CLARE, 2011a). Nas reconstruções filogenéticas com os dados concatenados, foi obtido um padrão semelhante ao encontrado na análise com o gene *COI*, sendo que não foi recuperado dois grupos monofiléticos distintos para as duas espécies. Este padrão encontrado é resultado da presença das sequências do gene *COI* na análise.

Os resultados da análise concatenada das divergências genéticas apresentaram valores de divergência genética interespecíficas e intraespecífica intermediários aos valores encontrados nas análises de *COI* e de *CytB*. Assim como nas análises separadas, a análise concatenada conseguiu separar as duas espécies em dois grupos potenciais. Na rede de haplótipos das sequências concatenadas, a diferença entre *C. perspicillata*+sequências geradas aqui e *C. brevicauda* foi observada por 24 passos mutacionais entre esses dois agrupamentos.

Aparentemente, as sequências geradas não apresentaram relação com as localidades provenientes, não demonstrando uma estruturação populacional visível. Características como a alta capacidade de dispersão, adaptação a ambientes antropizados e hábitos alimentares frugívoros, como as encontradas nas espécies *C. perspicillata* e *C. brevicauda*, dificultam o isolamento genético e por consequência uma estruturação genética populacional (GARDNER, 2009). As sequências de Rebio do Gurupi Sul e Norte se mostraram bastantes distantes, pertencendo a

agrupamentos distintos. Altos valores de distância genética entre populações geograficamente mais próximas não é o esperado dentro de uma espécie onde o isolamento por distância não é um processo considerado, pois indivíduos mais próximos geograficamente tem maior probabilidade de cruzarem, e consequentemente maior fluxo gênico entre populações mais próximas (WRIGHT, 1943).

De uma forma geral, tanto as análises de OTU´s, como as divergências genéticas e a rede de haplótipos, apontam o fato de que as amostras geradas neste estudo pertencem à espécie *C. perspicillata*. Ainda que haja certa diferenciação genética entre *C. perspicillata* e *C. brevicauda*, elas estão separadas por uma divergência genética baixa, apresentando haplótipos muito parecidos, com poucos passos mutacionais de diferença. Estas informações são um indicativo de que estas duas espécies, possivelmente, passaram por um evento recente de especiação, tal como proposto por Pavan et al (2011), e que ainda podem estar se diferenciando, ou restabelecendo um contato antes interrompido.

Nossos dados demonstram que identificar e delimitar espécies crípticas é um processo difícil. Sendo assim, deve ser considerada a importância de estudos morfológicos como complemento aos estudos moleculares aqui apresentados.

6 Conclusão

Ao término desse estudo, pode-se concluir que:

- A técnica de *DNA barcode* não foi eficiente para delimitar as espécies aqui estudadas;
- O valor de barcode gap parece ser muito baixo (0,5%) para delimitar as duas espécies aqui estudadas; e,
- A análise de rede de haplótipos se mostrou eficiente para auxiliar a identificação e delimitação de espécies crípticas, utilizando em conjunto as informações geradas pelas análises de *DNA barcode*.

Referências

BAKER, R. J.; JONES, J. K.; CARTER, D. C. Feedings habitats. **Biology of bats of the new world family Phyllostomidae,** Special Publication Museum Texas Tech University, v. 13, n. 1, 1977.

BAKER, R. J.; SOLARI, S.; HOFFMAN, F. G. A New Central American Species from the *Carollia brevicauda* Complex. **Ocassional Papers**, Museum of Texas Tech University, v. 217, n. 1, 2002.

BANDELT, H. J. et al. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology**, v. 16, p. 37-48, 1999.

BLAXTER, M. et al. Defining operational taxonomics units using DNA barcode data. Phylosophical **Transactions of the Royal Society**, v. 360, n. 1462, p. 1935-1943, 2005.

BOTERO-CASTRO, F. et al. Next-generation sequencing and phylogenetic signal of complete mitochondrial genomes for resolving the evolutionary history of leaf-nosed bats (Phyllostomidae). **Molecular Phyllogenetics and Evolution**, v. 69, p. 728-739, 2013.

CHEN, J. et al. Contrasting Genetic Structure in Two Co-Distributed Species of Old World Fruit Bat. **Plos One**, v. 5, 2010.

CLARE, E. L. Cryptic Species Patterns of Maternal and Paternal Gene Flow in Eight Neotropical Bats. **Plos One**, v. 6, n. 7, 2011a.

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

CLARE, E. L. et al. Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. **Plos One**, v. 6, n. 7, 2011b.

DATZMANN, T. et al. Evolution of nectarivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia). **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 165, 2010.

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

DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian phylogenetics with beauti and the beast 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, p. 1969-1973, 2012.

FERREIRA, W. A. S. et al. Phylogeography of the Dark Fruit-Eating Bat *Artibeus obscurus* in the Brazilian Amazon. **Journal of Heredity**, v. 105, n. 1, p. 48-59, 2013.

FOLMER et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 294–299, 1994.

FRANCIS, C. M. et al. A new species of *Kerivoula* (Chiroptera: Vespertilionidae) from peninsular Malaysia. **Bio One**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2007.

GARDNER, T. A. et al. Prospects for tropical forest biodiversity in a human-modified world. **Ecology Letters**, v. 12, n. 6, p. 561-582, 2009.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA Barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Biology**, n. 270, p. 313-321, 2003.

HEBERT, P. D. N. et al. The species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*es, **Proceedings of National Academy Sciences**, v. 101, n. 41, p. 14812-14817, 2004a.

HEBERT, P. D. N. et al. Identification of Birds through DNA Barcodes , **Plos Biology**, v. 2, n. 10, p. 312, 2004b.

HERNANDEZ-DÁVILA, A. et al. DNA barcoding and genetic diversity of Phyllostomid bats from the Yucatan Peninsula with comparisons to Central America, **Molecular Ecology**, v. 10, 2012.

HOFFMAN, F. G.; BAKER, J. Comparative phylogeography of short-tailed bats (Phyllostomidae). **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3403-3414, 2003.

JARRIN, V.; MENENDEZ-GUERRERO, P. A. Environmental componentes and boundaries of morphological variation in the short-tailed fruit bat (*Carollia sp*.) in Ecuador. **Bio One**, v. 2, n. 13, p. 319-340, 2011.

JORGER, K. M.; SCHRODL, M. How to describe a cryptic species¿ Practical challenges of molecular taxonomy, **Frontiers in Zoology**, v. 10, n. 59, 2013.

KEKKONEN, M.; HEBERT, P. D. N. DNA Barcode-based delineation of putative species: eficiente start taxonomic workflows. **Molecular Ecology Resources**, v.14, p. 706-715, 2014.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 5, n. 25, p. 14510-1452, 2009.

MAYER, F.; DIETZ, C.; KIEFER, A. Molecular species identification boosts bat diversity. **Bio Med Central**, v. 4, n. 4, 2007.

MCLELLAN, L. J.; KOOPMAN, K. F. (2008) Subfamily Carolliinae Miller, 1924. In: Gardner, A.L. (Ed.), **Mammals of South America. Marsupials, xenarthrans, sherws, and bats**. The University of Chicago Press, Chicago and London, 208-216 p.

MEIER, R. G. et al. The used of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the “Barcoding Gap” and leads to misidentification. **Systematic Biology**, v. 57, p. 809-813, 2008.

PAVAN, A. C. et al. 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**, v. 102, p. 527-539, 2011.

PUILLANDRE, N. et al. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 1864-1877, 2011.

PACHECO, V. et al. A new species of *Carollia* (Chiroptera: Phyllostomidae) from the Andes of Peru and Bolivia. **Ocassional Papers**, n. 236, p. 1-15, 2004.

REDONDO, R. A. F. et al. Molecular systematics of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n. 49, p. 44-58, 2008.

SCHNEIDER, S. et al. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. **Genetics**, v. 152, p. 1079-1089, 1999.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new reconstructing phylogenetics trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SIMON, C. et al. Incorporating Molecular Evolution into Phylogenetic Analysis, and a New Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers for Animal Mitochondrial DNA. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systemat**, v. 37, 2006.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology,** v. 5, p. 233-241, 1996.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, n. 30, p. 2725-2729, 2013.

VELAZCO, P. M. On the phylogenetic position of *Carollia manu* (Chiroptera: Phyllostomidae: Carollinae). **Zootaxa**, v. 3, n. 3718, p. 267-276, 2013.

VOZZ, Robert S.; EMMONS, Louise H. **Mammalian diversity in neotropical lowland rainforests: a preliminary assessment**. Bulletin of the American Museum of Natural History, Nova York, 1996, 1-115 p.

WRIGHT, A. J. et al. Systematics of the Genera Carollia and Rhinophylla Based on the Cytochrome-B Gene. **Journal of Mammalogy**, v. 80, n. 4, p. 1202-1213, 1999.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 31, p. 114-138, 1943.

Apêndices

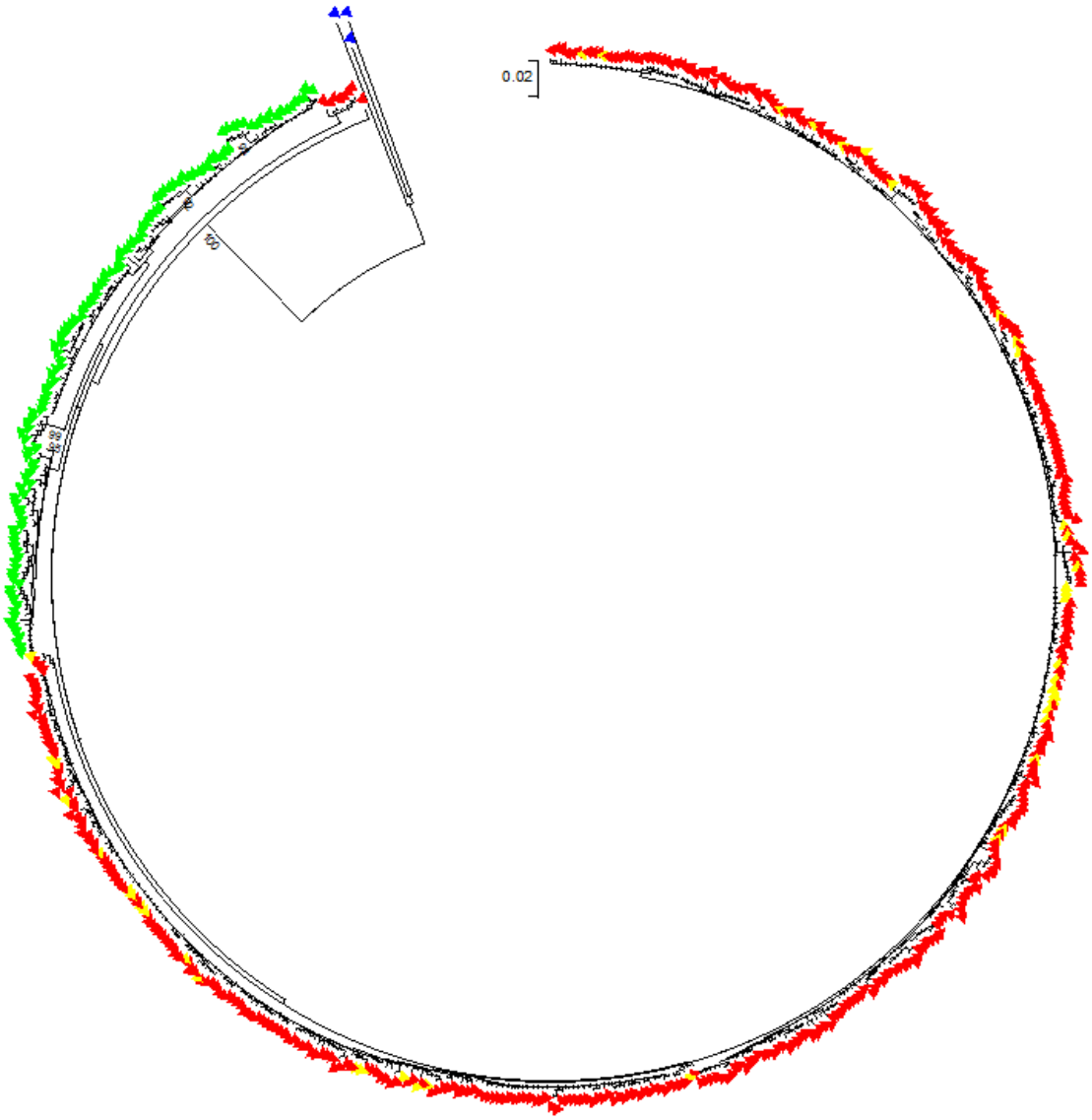
Apêndice A – Tabela com os dados de coleta e de laboratório das amostras de *Carollia* sp.

Código de laboratório	Localidade	Longitude	Latitude	Sequência *CytB*	Sequência *COI*
REBS63	REBIO do Gurupi – Sul	-46,7583	-3,92836	X	X
REBS75	REBIO do Gurupi – Sul	-46,7583	-3,92836	X	X
REBS76	REBIO do Gurupi – Sul	-46,7583	-3,92836	X	X
REBS79	REBIO do Gurupi – Sul	-46,7583	-3,92836	X	X
REBN99	REBIO do Gurupi – Norte	-46,75458	-3,68917	X	X
REBN111	REBIO do Gurupi – Norte	-46,75458	-3,68917	X	X
MOJ136	Estação Experimental Moju	-48,79365	-2,1782	X	-
MOJ137	Estação Experimental Moju	-48,79365	-2,1782	X	X
MOJ140	Estação Experimental Moju	-48,79365	-2,1782	X	X
MOJ141	Estação Experimental Moju	-48,79365	-2,1782	X	X
MOJ144	Estação Experimental Moju	-48,79365	-2,1782	X	X
MOJ157	Estação Experimental Moju	-48,79365	-2,1782	X	X
MOJ158	Estação Experimental Moju	-48,79365	-2,1782	X	X
TAI114	Faz. Marupiara – Tailandia	-48,79365	-2,80368	X	X
TAI115	Faz. Marupiara – Tailandia	-48,52817	-2,80368	X	X
TAI116	Faz. Marupiara – Tailandia	-48,52817	-2,80368	X	X
TAI117	Faz. Marupiara – Tailandia	-48,52817	-2,80368	X	X
TAI121	Faz. Marupiara – Tailandia	-48,52817	-2,80368	X	X
PAR187	Faz. Vitória - Paragominas	-47,40794	-2,98021	X	-
PAR191	Faz. Vitória - Paragominas	-47,40794	-2,98021	X	X
PAR193	Faz. Vitória - Paragominas	-47,40794	-2,98021	X	X
PAR202	Faz. Vitória - Paragominas	-47,40794	-2,98021	X	X
PAR211	Faz. Vitória - Paragominas	-47,40794	-2,98021	X	X
PAR213	Faz. Vitória - Paragominas	-47,40794	-2,98021	X	X
PAR214	Faz. Vitória - Paragominas	-47,40794	-2,98021	X	X
PAR218	Faz. Vitória - Paragominas	-47,40794	-2,98021	X	X
PAR219	Faz. Vitória - Paragominas	-47,40794	-2,98021	X	X
PAR222	Faz. Vitória - Paragominas	-47,40794	-2,98021	X	X
NIP232	Faz. Capixaba - Nova Ipixuna	-49,23787	-4,84497	X	X
NIP235	Faz. Capixaba - Nova Ipixuna	-49,23787	-4,84497	X	X
NIP236	Faz. Capixaba - Nova Ipixuna	-49,23787	-4,84497	X	X
NIP237	Faz. Capixaba - Nova Ipixuna	-49,23787	-4,84497	X	X
NIP247	Faz. Capixaba - Nova Ipixuna	-49,23787	-4,84497	-	X
NIP261	Faz. Capixaba - Nova Ipixuna	-49,23787	-4,84497	X	X
VIZ286	São José do Gurupi - Vizeu	-46,2938	-1,57247	X	X
VIZ287	São José do Gurupi - Vizeu	-46,2938	-1,57247	-	X
VIZ288	São José do Gurupi - Vizeu	-46,2938	-1,57247	-	X
VIZ289	São José do Gurupi - Vizeu	-46,2938	-1,57247	-	X
VIZ290	São José do Gurupi - Vizeu	-46,2938	-1,57247	-	X
VIZ291	São José do Gurupi - Vizeu	-46,2938	-1,57247	-	X
VIZ294	São José do Gurupi - Vizeu	-46,2938	-1,57247	X	X
VIZ297	São José do Gurupi - Vizeu	-46,2938	-1,57247	-	X
VIZ298	São José do Gurupi - Vizeu	-46,2938	-1,57247	-	X

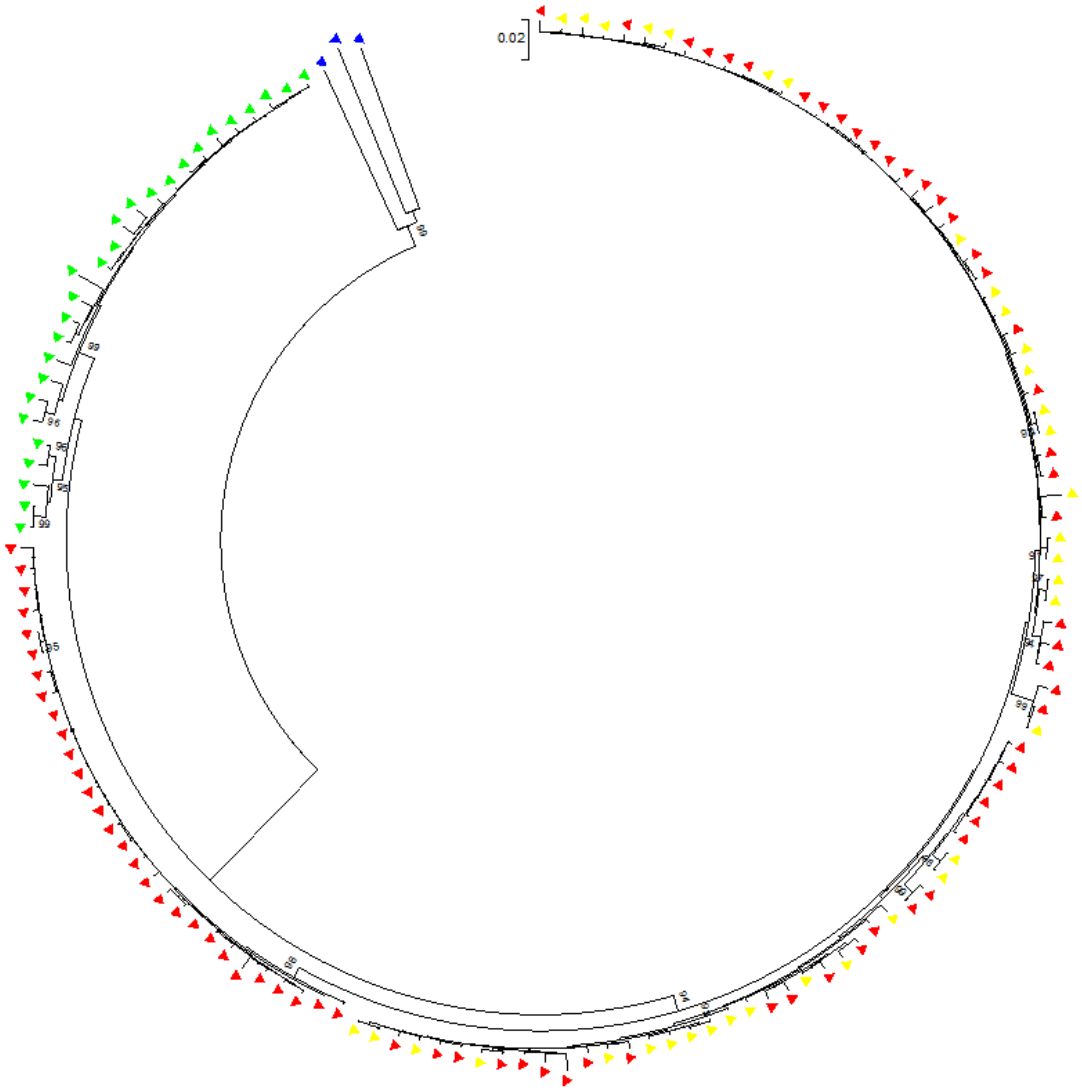
VIZ307	São José do Gurupi - Vizeu	-46,2938	-1,57247	-	X
VIZ317	São José do Gurupi - Vizeu	-46,2938	-1,57247	X	X

X: sequência gerada; -: informação não obtida; as coordenadas estão em *Decimal Degrees.*

Apêndice B - Reconstrução filogenética consenso dos dados de *COI*. Triângulos amarelos: sequências geradas neste estudo; triângulos vermelhos: sequências adquiridas *in silico* para *C. perspicillata*; triângulos verdes: sequências adquiridas *in silico* para *C. brevicauda*; triângulos em azul: sequências utilizadas como *outgroup*. Método de reconstrução filogenética: Neighbor Joining. Modelo de substituição nucleotídica: Kimura 2-parâmetros. 500 réplicas de *bootstrap*. Valores abaixo de 90% de *bootstrap* foram retirados.



Apêndice C - Reconstrução filogenética consenso dos dados de *CytB*. Triângulos amarelos: sequências geradas neste estudo; triângulos vermelhos: sequências adquiridas *in silico* para *C. perspicillata*; triângulos verdes: sequências adquiridas *in silico* para *C. brevicauda*; triângulos em azul: sequências utilizadas como *outgroup*. Método de reconstrução filogenética: Neighbor Joining. Modelo de substituição nucleotídica: Kimura 2-parâmetros. 500 réplicas de *bootstrap*. Valores abaixo de 90% de *bootstrap* foram retirados.



Apêndice D – Tabela de divergência genética interespecífica (abaixo da diagonal) e intraespecífica das sequências geradas e agrupadas por localidaed e das sequências adquiridas *in silico* e agrupadas por espécie para *C. perspicillata* e *C. brevicauda*. Os valores das análises de *COI*, *CytB* e concatenadas são representados nesta ordem e separados por barra. Valores apresentados em porcentagem (%).

	Vizeu	Paragominas	Tailândia	Rebio_Sul	Rebio_Norte	Moju	N. Ipixuna	*C. brevicauda*	*C. perspicillata*
Vizeu	**0,5 / 1,7 / 1,2**								
Paragominas	0,6 / 1,5 / 1,2	**0,6 / 1,2 / 0,9**							
Tailândia	0,8 / 1,7 / 1,3	0,6 / 1,1 / 0,9	**0,6 / 1,2 / 0,9**						
Rebio_Sul	0,4 / 1,2 / 0,9	0,7 / 1,4 / 1,1	0,8 / 1,6 / 1,3	**0,3 / 0,5 / 0,4**					
Rebio_Norte	1,0 / 1,8 / 1,5	0,7 / 1,0 / 0,9	0,6 / 0,8 / 0,7	1,1 / 1,7 / 1,5	**0,6/ 0,8 / 0,7**				
Moju	0,5 / 1,5 / 1,0	0,7 / 1,7 / 1,3	0,8 / 1,8 / 1,4	0,3 / 1,0 / 0,7	1,1 / 1,9 / 1,7	**0,4 / 1,5 / 0,9**			
N. Ipixuna	0,5 / 1,4 / 1,0	0,7 / 1,7 / 1,3	0,8 / 1,8 / 1,4	0,3 / 0,8 / 0,6	1,1 / 1,9 / 1,6	0,4 / 1,3 / 0,9	**0,4 / 1,1 / 0,8**		
C. brevicauda	2,2 / 4,1 / 3,2	2,4 / 4,0 / 3,1	2,5 / 4,2 / 3,3	2,1 / 3,8 / 3,0	2,8 / 4,0 / 3,4	2,1 / 4,1 / 3,2	2,1 / 4,1 / 3,2	**1,7 / 1,8 / 1,4**	
C. perspicillata	0,7 / 1,8 / 1,3	0,8 / 1,7 / 1,3	0,9 / 1,8 / 1,3	0,7 / 1,5 / 1,2	1,1 / 1,7 / 1,2	0,7 / 1,8 / 1,4	0,7 / 1,8 / 1,4	2,4 / 4,0 / 3,2	**0,9 / 1,7 / 1,2**

Apêndice E – Resultado do programa *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) com o valor de *gap* de 0,5%, apresentando o cenário (i).

Initial Partition with prior maximal distance P=4.64e-03

Distance K80 Kimura MinSlope=0.500000

Download (left click and save) or see below the tree file corresponding to this partition: click **here**

Group[1] n: 44 ;id: C._brevicauda_AF511953.1 C._brevicauda_AF511954.1 C._brevicauda_AF511956.1 C._brevicauda_AF511957.1 C._brevicauda_AF511960.1 C._perspicillata_AF511987.1 C._perspicillata_AF511988.1 C._perspicillata_AF511989.1 C._perspicillata_AF511990.1 C._perspicillata_AF511991.1 CAP232 CAP235 CAP236 CAP237 CAP261 MOJ137 MOJ140 MOJ141 MOJ144 MOJ157 MOJ158 REBN111 REBN99 REBS63 REBS75 REBS76 REBS79 TAI114 TAI115 TAI116 TAI117 TAI121 VIT191 VIT193 VIT202 VIT211 VIT213 VIT214 VIT218 VIT219 VIT222 VIZ286 VIZ294 VIZ317

Apêndice F – Resultado do programa *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) com o valor de *gap* de 0,5%, apresentando o cenário (ii).

Initial Partition with prior maximal distance P=2.78e-03

Distance K80 Kimura MinSlope=0.500000

Download (left click and save) or see below the tree file corresponding to this partition: click **here**

Group[1] n: 2 ;id: C._brevicauda_AF511953.1 C._brevicauda_AF511960.1

Group[2] n: 1 ;id: C._brevicauda_AF511954.1

Group[3] n: 1 ;id: C._brevicauda_AF511956.1

Group[4] n: 1 ;id: C._brevicauda_AF511957.1

Group[5] n: 3 ;id: C._perspicillata_AF511987.1 C._perspicillata_AF511988.1 C._perspicillata_AF511989.1

Group[6] n: 19 ;id: C._perspicillata_AF511990.1 CAP232 CAP235 CAP237 CAP261 MOJ137 MOJ140 MOJ144 MOJ157 MOJ158 REBS63 REBS75 REBS76 REBS79 TAI121 VIT202 VIT222 VIZ286 VIZ317

Group[7] n: 1 ;id: C._perspicillata_AF511991.1

Group[8] n: 1 ;id: CAP236

Group[9] n: 1 ;id: MOJ141

Group[10] n: 12 ;id: REBN111 REBN99 TAI114 TAI115 TAI116 TAI117 VIT191 VIT193 VIT213 VIT214 VIT218 VIT219

Group[11] n: 2 ;id: VIT211 VIZ294

Anexos

Anexo A – Lista das sequências adquiridas *in silico* para o gene *COI* no *Barcode of Life Data System* (BOLD).

Carollia perspicillata: ABECA032-06; ABECA049-06; ABECA091-06; ABECA098-06; ABECA101-06; ABECA145-06; ABECA194-06; ABECA196-06; ABECA289-06; ABECA410-06; ABECA517-06; ABECA519-06; ABECA550-06; ABECA679-06; ABECA755-06; ABECA757-06; ABECA758-06; ABECA775-06; ABECA874-06; ABECA910-06; ABGYA003-06; ABGYA004-06; ABGYA015-06; ABGYA016-06; ABGYA017-06; ABGYA033-06; ABGYA034-06; ABGYA035-06; ABGYA065-06; ABGYA066-06; ABGYA081-06; ABGYA082-06; ABGYA083-06; ABGYA084-06; ABGYA128-06; ABGYA131-06; ABGYA134-06; ABGYA136-06; ABGYA151-06; ABGYA153-06; ABGYA168-06; ABGYA169-06; ABGYA225-06; ABGYA227-06; ABGYA229-06; ABGYA244-06; ABGYA247-06; ABGYA249-06; ABGYA251-06; ABGYA266-06; ABGYA267-06; ABGYA269-06; ABGYA270-06; ABGYA271-06; ABGYA273-06; ABGYA279-06; ABGYA280-06; ABGYA301-06; ABGYA311-06; ABGYA313-06; ABGYA314-06; ABGYA334-06; ABGYA366-06; ABGYA367-06; ABGYA375-06; ABGYA383-06; ABGYA384-06; ABGYA396-06; ABGYA422-06; ABGYA445-06; ABGYA449-06; ABGYA475-06; ABGYA477-06; ABGYA479-06; ABGYA480-06; ABGYA503-06; ABGYA519-06; ABGYA523-06; ABGYA524-06; ABGYA526-06; ABGYA529-06; ABGYA545-06; ABGYA552-06; ABGYA553-06; ABGYA554-06; ABGYA568-06; ABGYA569-06; ABGYA595-06; ABGYA597-06; ABGYA606-06; ABGYA609-06; ABGYA611-06; ABGYA613-06; ABGYA652-06; ABGYA653-06; ABGYA654-06; ABGYA718-06; ABGYA719-06; ABGYA720-06; ABGYA742-06; ABGYA743-06; ABGYA744-06; ABGYA753-06; ABGYA768-06; ABGYA769-06; ABGYA770-06; ABGYA772-06; ABGYA773-06; ABGYA774-06; ABGYA776-06; ABGYA777-06; ABGYA778-06; ABGYA779-06; ABGYA780-06; ABGYA789-06; ABGYA791-06; ABGYA793-06; ABGYA794-06; ABGYA795-06; ABGYA796-06; ABGYA798-06; ABGYA799-06; ABGYA808-06; ABGYA809-06; ABGYA824-06; ABGYA826-06; ABGYA827-06; ABGYA828-06; ABGYA829-06; ABGYA830-06; ABGYA862-06; ABGYB004-06; ABGYB005-06; ABGYB015-06; ABGYB016-06; ABGYB017-06; ABGYB018-06; ABGYB022-06; ABGYB037-06; ABGYB044-06; ABGYB046-06; ABGYB057-06; ABGYB066-06; ABGYB067-06; ABGYB090-06; ABGYB092-06; ABGYB109-06; ABGYB111-06; ABGYB112-06; ABGYB113-06; ABGYB119-06; ABGYB121-06; ABGYB146-06; ABGYB206-06; ABGYB211-06; ABGYB212-06; ABGYB215-06; ABGYB218-06; ABGYB217-06; ABGYB219-06; ABGYB220-06; ABGYB235-06; ABGYB252-06; ABGYB253-06; ABGYB280-06; ABGYB282-06; ABGYB283-06; ABGYB298-06; ABGYB419-06; ABGYB421-06; ABGYB526-06; ABGYB554-06; ABGYB701-06; ABGYB745-06; ABGYB757-06; ABGYB819-06; ABGYB831-06; ABGYB859-06; ABGYB879-06; ABGYB882-06; ABGYB901-06; ABGYC004-06; ABGYC008-06; ABGYC036-06; ABGYC038-06; ABGYC059-06; ABGYC060-06; ABGYC061-06; ABGYC147-06; ABGYC196-06; ABGYC209-06; ABGYC213-06; ABGYC234-06; ABGYC237-06; ABGYC270-06; ABGYC274-06; ABGYC275-06; ABGYC289-06; ABGYC328-06; ABGYC330-06; ABGYC332-06; ABGYC345-06; ABGYC348-06; ABGYC381-06; ABGYC437-06; ABGYC477-06; ABGYC478-06; ABGYC518-06; ABGYC551-06; ABGYC563-06; ABGYC648-06; ABGYC649-06; ABGYC673-06; ABGYC675-06; ABGYC678-06; ABGYC679-06; ABGYC680-06; ABGYC681-06; ABGYC686-06; ABGYC690-06; ABGYC732-06;

ABGYC746- 06; ABGYC791-06; ABGYD026-06; ABGYD029-06; ABGYD062-06; ABGYD075-06; ABGYD104-06; ABGYD179-06; ABGYD199-06; ABGYD241-06; ABGYD367-06; ABGYD395-06; ABGYD424-06; ABGYD435-06; ABGYD476-06; ABGYD596-06; ABGYD704-06; ABGYD738-06; ABGYD839-06; ABGYD849-06; ABGYE008-06; ABGYE075-06; ABGYE129-06; ABGYE131-06; ABGYE248-06; ABGYE249-06; ABGYE253-06; ABGYE328-06; ABGYE354-06; ABGYE407-06; ABGYE408-06; ABGYA335-06; ABGYA355-06; ABGYA358-06; ABGYA365-06; ABGYE479-06; ABGYE480-06; ABGYE489-06; ABGYE491-06; ABGYE602-06; ABGYE613-06; ABGYE614-06; ABGYE629-06; ABGYE639-06; ABGYE698-06; ABGYE761-06; ABGYE764-06; ABGYE776-06; ABGYE786-06; ABGYE840-06; ABGYF008-06; ABGYF027-06; ABGYF044-06; ABGYF058-06; ABGYF071-06; ABGYF094-06; ABGYF100-06; ABGYF103-06; ABGYF155-06; ABGYG042-06; ABGYG056-06; ABGYG059-06; ABGYG1040-08; ABGYG1104-08; ABGYG1119-08; ABGYG1133-08; ABGYG1151-08; ABGYG1192-08; ABGYG1213-08; ABGYG1217-08; ABGYG1219-08; ABGYG1220-08; ABGYG122-06; ABGYG1233-08; ABGYG392-06; ABGYG494-06; ABGYG455-06; ABGYG589-08; ABGYG643-08; ABGYG674-08; ABGYG675-08; ABGYG677-08; ABGYG755-08; ABGYG756-08; ABGYG757-08; ABGYG758-08; ABGYG778-08; ABGYG779-08; ABGYG815-08; ABGYG816-08; ABGYG817-08; ABGYG819-08; ABGYG875-08; ABGYG911-08; ABGYG913-08; ABGYG932-08; ABMXA946-06; ABSA006-06; ABSA017-06; ABSA027-06; ABSA031-06; ABSA032-06; ABSA038-06; ABSA055-06; ABSA056-06; ABSA059-06; ABSA064-06; ABSA068-06; ABSA070-06; ABSA076-06; ABSA077-06; ABSA083-06; ABSA095-06; ABSA097-06; ABSCA031-06; ABSCA032-06; ABSCA038-06; ABSCA039-06; ABSCA176-06; ABSMS009-06; ABSMS023-06; ABSMS032-06; ABSMS049-06; ABSCA031-06; ABSMS059-06; ABSMS135-06; ABSMS143-06; ABSMS166-06; ABSMS223-06; ABSMS255-06; ABSMS320-06; ABSMS409-06; ABSMS461-06; ABSRA1048-10; ABSRA1157-10; ABSRA285-06; ABSRA288-06; ABSRA290-06; ABSRA293-06; ABSRA295-06; ABSRA448-06; ABSRA449-06; ABSRA450-06; ABSRA596-08; ABSRA598-08; ABSRA691-08; ABSRA713-08; ABSRA799-10; ABSRA835-10; ABSRA840-10; ABSRA851-10; ABSRA859-10; ABSRA862-10; ABSRA935-10; ABSRA987-10; ABVSC014-08; ABVSC015-08; BCBN104-05; BCBN129-05; BCBN142-05; BCBN145-05; BCBN146-05; BCBN150-05; BCBN152-05; BCBN153-05; BCBN289-05; BCBN324-05; BCBN325-05; BCBN327-05; BCBN505-05; BCBN506-05; BCBN537-05; BCBN538-05; BCBN580-05; BCBN603-05; BCBN689-05; BCBN741-05; BCBN854-05; BCBN932-05; BCBN933-05; BCBN935-05; BCBNC106-06; BCBNC107-06; BCBNC135-06; BCBNC182-06; BCBNT013-06; BCBNT016-06; BCBNT076-06; BCBNT077-06; BCBNT078-06; BCBNT218-06; BCBNT223-06; BCBNT242-06; BCBNT425-06; BCBNT440-06; BCBNT456-06; BCBNT474-06; BCBNT609-06; BCBNT625-06; BCBNT662-06; BCBNT880-06; BCBNT912-06; BCBZ089-09; BCBZ119-09; GBMA6782-13; GBMIN42432-14.

Carollia brevicauda: ABCMA561-06; ABECA001-06; ABECA008-06; ABECA015-06; ABECA017-06; ABECA125-06; ABECA126-06; ABECA135-06; ABECA246-06; ABECA247-06; ABECA248-06; ABECA249-06; ABECA262-06; ABECA264-06; ABECA375-06; ABECA396-06; ABECA472-06; ABECA503-06; ABECA516-06; ABECA518-06; ABECA549-06; ABECA589-06; ABECA678-06; ABECA695-06; ABECA726-06; ABECA747-06; ABECA754-06; ABECA886-06; ABECA897-06;

ABECA898-06; ABECA918-06; ABECA919-06; ABGYA310-06; ABGYA312-06; ABGYA326-06; ABGYA336-06; ABGYA341-06; ABGYA344-06; ABGYA360-06; ABGYA376-06; ABGYA448-06; ABGYA481-06; ABGYA502-06; ABGYA764-06; ABGYB038-06; ABGYB041-06; ABGYB058-06; ABGYB085-06; ABGYB086-06; ABGYB087-06; ABGYB124-06; ABGYB126-06; ABGYB381-06; ABGYB410-06; ABGYC787-06; ABGYD173-06; ABGYD216-06; ABGYD217-06; ABGYD243-06; ABGYD258-06; ABGYD259-06; ABGYD260-06; ABGYD333-06; ABGYD349-06; ABGYD397-06; ABGYD466-06; ABGYD467-06; ABGYE247-06; ABGYE297-06; ABGYE298-06; ABGYE357-06; ABGYE677-06; ABGYE719-06; ABGYE741-06; ABGYF089-06; ABGYF276-06; ABGYF278-06; ABGYF283-06; ABGYG325-06; ABGYG331-06; ABGYG402-06; ABGYG569-06; ABGYG752-08; ABGYG791-08; ABMXA947-06; ABSCA057-06; ABSCA063-06; ABSCA071-06; ABSMS010-06; ABSMS020-06; ABSMS033-06; ABSMS050-06; ABSMS067-06; ABSMS092-06; ABSMS095-06; ABSMS170-06; ABSMS242-06; ABSMS261-06; ABSMS306-06; ABSMS440-06; ABSMS451-06; ABSMS475-06; ABSRA085-06; ABSRA090-06; ABSRA1040-10; ABSRA121-06; ABSRA266-06; ABSRA306-06; ABSRA315-06; ABSRA332-06; ABSRA351-06; ABSRA375-06; ABSRA485-06; BCBN542-05; BCBN554-05; BCBN656-05; BCBN710-05; BCBN831-05; BCBN859-05; BCBN909-05; BCBN915-05; BCBN939-05; BCBNC083-06; BCBNT007-06; BCBNT743-06; BCBNT774-06; BCBNT980-06; BCBNT981-06.

Anexo B - Lista das sequências adquiridas *in silico* para o gene *CytB* no Genbank.

Carollia perspicillata: KF019723.1; KF019722.1; KF019721.1; FJ589715.1; FJ589714.1; FJ589713.1; FJ589712.1; FJ589711.1; FJ589710.1; FJ589709.1; FJ589708.1; FJ589707.1; FJ589706.1; FJ589704.1; FJ589703.1; FJ589702.1; FJ589701.1; FJ589700.1; FJ589699.1; FJ589698.1; FJ589697.1; FJ589696.1; FJ589695.1; FJ589694.1; FJ589693.1; FJ589692.1; FJ589691.1; FJ589690.1; FJ589689.1; FJ589688.1; FJ589687.1; FJ589686.1; FJ589685.1; FJ589684.1; FJ589683.1; FJ589682.1; FJ589681.1; FJ589680.1; FJ589679.1; FJ589678.1; FJ589677.1; FJ589676.1; FJ589675.1; FJ589674.1; FJ589673.1; FJ589672.1; FJ589671.1; FJ589670.1; FJ589669.1; FJ589668.1; FJ589667.1; FJ589666.1; FJ589665.1; FJ589664.1; FJ589663.1; FJ589662.1; FJ589661.1; FJ589660.1; FJ589659.1; FJ589658.1; FJ589657.1; FJ589656.1; FJ589655.1; KF019720.1; JX444091.1; JX444090.1; JX444089.1; KC011594.1; DQ888280.1; AF511991.1; AF511990.1; AF511989.1; AF511988.1; AF511987.1; AF511986.1; AF511985.1; AF511984.1; AF511983.1; AF511982.1; AF511981.1; AF511980.1; AF511979.1; AF511978.1; AF511977.1; AF511976.1; AF511975.1; AF511974.1; AF187026.1; AF187025.1; FJ589705.1

Carollia brevicauda: KF019716.1; KF019717.1; KF019718.1; KF019715.1; KF019714.1; KF019713.1; KF019712.1; KF019711.1; KF019710.1; KF019709.1; KF019708.1; FJ589654.1; FJ589653.1; FJ589652.1; FJ589651.1; FJ154120.1; AF511960.1; AF511959.1; AF511958.1; AF511957.1; AF511956.1; AF511955.1; AF511954.1; AF511953.1; AF511952.1; AF511951.1; DQ888283.1; DQ888279.1; AF187019.1; AF187018.1; AF187017.1