

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Estudos filogenéticos dos morcegos filostomídeos da Região Neotropical

Cristina Claumann Freygang

Orientadora: Profa. Dra. Margarete Suñé Mattevi

Co-orientadora: Profa. Dra. Loreta Brandão de Freitas

Tese submetida ao Programa de Pós-
graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutor
em Ciências

Porto Alegre
Novembro/2006

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS e financiado pelos seguintes órgãos: CNPq, G7/FINEP, CAPES, FAPERGS e OEA



O sentido da vida by Quino

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, profa. Dra. Margarete Suñe Mattevi, por acreditar em meu potencial e aceitar trabalhar com organismos tão diferentes de sua linha de pesquisa acrescentando muito a minha formação profissional;

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Loreta Brandão de Freitas;

Ao Prof. Sérgio L. Althoff Msc, por toda ajuda;

Ao Prof. Dr. Thales R.O. de Freitas, ao Prof. Dr. Luiz F.B. de Oliveira, a Fernanda Trierveiler Msc., Denis Sana e à bióloga Andréa Nunes pelo fornecimento das amostras;

À Gabriela Camargo pela ajuda com a extração do material e a Ana Letícia Pereira pela valiosa ajuda no laboratório:

Aos meus colegas da sala 107, Bianca Carvalho, Gustavo Miranda, Jaqueline Andrades-Miranda, Martin Montes e Luciano Silva, a todos os colegas do lab. 108 e demais agregados especialmente a Andréa Marrero, Paula Quiroga, Taiana Haag e Teresa V. Freire, além de todos os muitos amigos da Genética;

À Valéria Muschner pelas dicas com o PAUP;

Ao Elmo e a Ellen por todos os galhos quebrados;

A todos os meus amigos de “caminhadas orientadas”;

Ao CNPq, pelo fornecimento da bolsa e ao G7/FINEP, CAPES, FAPERGS e OEA pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular,

Aos meus pais, Maria Claudete e Frederico, e a minha irmã Tatiana por tudo;

Aos muitos que ajudaram e que não foram citados aqui, devido à caduquice de uma mente estressada;

Aos meus morceguinhos...

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	III
Sumário.....	IV
Lista de Figuras.....	VI
Lista de Tabelas.....	IX
Resumo.....	X
Abstract.....	XII
Capítulo 1: INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A ordem Chiroptera....	1
1.2. Família Phyllostomidae.....	6
1.3. Marcadores moleculares e estudos em quirópteros	10
Capítulo 2: OBJETIVOS.....	15
Capítulo 3: ARTIGO 1.....	16
3.1. Abstract	17
3.2. Introduction	17
3.3. Materials and Methods	19
3.4. Results.....	23
3.5. Discussion	27
3.6. References	34
Capítulo 4: ARTIGO 2.....	47
3.1. Abstract	48
3.2. Introduction	48
3.3. Materials and Methods	50
3.4. Results.....	53
3.5. Discussion	56
3.6. References	60
Capítulo 5: ARTIGO 3.....	69
3.1. Abstract	70
3.2. Introduction.....	71
3.3. Materials and Methods	73
3.4. Results.....	76
3.5. Discussion	79
3.6. References	84
Capítulo 6: DISCUSSÃO.....	94
ANEXO 1.....	105
ANEXO 2.....	109
ANEXO 3.....	116
ANEXO 4.....	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135

LISTA DE FIGURAS

Capa: De baixo para cima 1- *Desmodus rotundus*. Retirado de <http://www.uni-bayreuth.de/departments/ddchemie/umat/knoblauch2/knoblauch2.htm>; 2- *Rhinophyla pumilio*. Foto de Nancy Simmons; 3- Espécie não identificada. Retirado de <http://www.batcon.org/vrcnew/index.asp?curpage=5&sortField=#>; 4- *Vampyressa pusilla*. Foto de Marcos Tschapka; 5- Espécie não identificada. Retirado de www.cpap.embrapa.br/peld/peld_temas2.htm. Importante salientar que as relações apresentadas na capa não refletem as relações filogenéticas entre as espécies.

Capítulo 1

- Figura 1: Biodiversidade de morcegos baseada no número de espécies em 500km² (Retirado de FINDLEY,1993). O gradiente de cores aumenta a cada 20 espécies e vai do branco (sem morcegos presentes) até vermelho (120 espécies ou mais).....1
- Figura 2: Apêndice nasal. Foto de Marcos Tschapka.....7
- Figura 3: Principais características morfológicas externas utilizadas para reconhecimento das famílias de Quiroptera. Uropatágio equivale a membrana interfemural. Figura cedida por Sérgio L. Althoff.....8

Capítulo 3

- Figure 1: 1a. Maximum Likelihood tree for cytochrome b gene. Likelihood settings from best-fit model (TrN+G) selected by hLRT: Lset Base=(0.2908 0.3014 0.1296) Nst=6 Rmat=(1.0000 4.1839 1.0000 1.0000 16.3966) Rates=gamma Shape=0.2132 Pinvar=0. Numbers above branches are bootstraps values. ■ Cerrado ▲ Atlantic Rainforest ● northern South America ◆ Central America. 1b. Neighbor-Joining analysis tree for combined analyses of cyt b ad RAG2 genes under ML parameters.

Likelihood settings from best-fit model (TrN+I+G), gamma shape=1.3359 and Pinvar=0.6767. Numbers above branches are bootstraps values.....45

Figure 2: Mismatch distributions of *Artibeus lituratus* of cyt b gene. The histogram shows the observed distribution of pairwise differences between the individuals of analysed populations. The line shows the expected distribution for a growing population under the sudden expansion model. The x-axis refers to the number of differences between pairs of haplotypes; the y-axis shows the observed/expected occurrence of each pairwise difference. 2b: Mismatch distributions of *Artibeus lituratus* of cyt b + RAG2 genes. 2c: Mismatch distributions of *Artibeus fimbriatus*. 2d: Mismatch distributions of *Artibeus fimbriatus* of cyt b + RAG2 genes. 2e: Median-joining network for mitochondrial cyt b haplotypes of *Artibeus lituratus*. Gray circles represent Atlantic Forest haplotypes; black circles represent Cerrado haplotypes; hollow circles represent haplotypes not sampled or that have become extinct. Correspond to the haplotypes listed in Table 1. 2f: Median-joining network for mitochondrial cyt b haplotypes of *Artibeus fimbriatus*.....46

Capítulo 4

Figure 1: Figure 1: A) Maximum likelihood tree for RAG2 gene. Likelihood settings from best-fit model (K80+G) selected by hLRT Lset Base=equal Nst=2 TRatio=3.0953 Rates=gamma Shape=0.0845 Pinvar=0. Numbers above branches are the bootstraps values. B) Results from Bayesian analysis of concatenated cyt b and RAG2 genes. Likelihood settings from best-fit model (GTR+I+G) selected by hLRT. Lset Base=(0.2860 0.2628 0.1885) Nst=6 Rmat=(1.6334 3.7942 0.9114 0.3789 14.5266) Rates=gamma Shape=0.2266 Pinvar=0.3133. Numbers above branches are posterior probabilities values.....68

Capítulo 5

- Figure 1: A) Bayesian analysis tree for cytochrome b gene. Likelihood settings from best-fit model (GTR+I+G) selected by hLRT: Lset Base=(0.3837 0.3647 0.0620) Nst=6 Rmat=(0.2724 5.4353 0.5994 0.3884 10.7232) Rates=gamma Shape=0.4763 Pinvar=0.4352. Numbers above branches are posterior probabilities values. B) Bayesian analysis tree for RAG2 gene. Likelihood settings from best-fit model (K80+G) selected by hLRT (Lset Base=equal Nst=2 TRatio=3.0666 Rates=gamma Shape=0.3396 Pinvar=0). Numbers above branches are posterior probabilities values.....92
- Figure 2: A) Results from Bayesian analysis of concatenated cyt *b* and RAG2 genes. Likelihood settings from best-fit model (GTR+I+G) selected by hLRT. Lset Base=(0.2980 0.2885 0.1806) Nst=6 Rmat=(2.2294 3.8488 1.0797 0.4228 14.8018) Rates=gamma Shape=0.4488 Pinvar=0.4149. Numbers above branches are posterior probabilities values. B) Figure adapted from Fig. 5A and 5B from Baker *et al.* (2003).....93

Anexo 2

- Figura 4: Representação parcial da mitocôndria mostrando os genes tRNA-Glu, citocromo b e tRNA-Thr. Nas caixas cinzas se apresenta a posição de início e fim do gene *cit b* e as caixas brancas os “primers” e suas posições segundo a seqüência da mitocôndria de *Mus musculus*. Setas vermelhas indicam os primers utilizados.....111
- Figura 5: Diagrama representando os genes RAG, mostrando os sítios de anelamento, com destaque para os primers utilizados. Figura retirada de BAKER *et al.* (2000).....112
- Figura 6: Pontos de coleta das amostras utilizadas neste estudo (1) Palmeirante, (2) Colinas do Sul, (3) Jaraguá do Sul, (4) Indaial, (5) Gaspar, (6) Blumenau, (7) Porto Belo, (8) Gov. Celso Ramos, (9) Florianópolis, (10) Sto Amaro da Imperatriz, (11) Treze de Maio, (12) Nova Veneza, (13)

Jacinto Machado, (14) Santa Rosa do Sul (15) Itaiópolis.....115

Anexo 3

- Figura 7: Mapa de cobertura da vegetação nativa da Mata Atlântica. Em laranja, área de cobertura original e em verde, áreas remanescentes. Retirado de HERINGER & MONTENEGRO (2000).....131
- Figura 8: Área de cobertura do bioma Cerrado em vermelho. Figura retirada da home-page da Conservation International.....133

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1:	Classificação geral da ordem Quiroptera, segundo SIMMONS (2005b) com destaque para as espécies existentes nos gêneros estudados. A divisão em subgêneros não foi apresentada.....	2
-----------	---	---

Capítulo 3

Appendix	Accession numbers (in parenthesis) of sequences corresponding to the voucher number, and next the collection site.....	40
Table 1:	Species (acronyms), collection sites, morphoclimatic domains, number of individuals, cytochrome <i>b</i> haplotypes found in this sample, and GenBank accession numbers of literature.....	41
Table 2:	Pairwise sequence divergence (in %) estimated by Kimura-2 parameters for cytochrome <i>b</i> in large <i>Artibeus</i> and outgroups.....	42

Capítulo 4

Table 1:	Species, morphoclimatic domains of the collect sites, localities, and GenBank accession numbers of specimens analyzed.....	65
----------	--	----

Capítulo 5

Table 1:	Species, morphoclimatic domains of the collect sites, localities, and GenBank accession numbers of specimens analyzed.....	89
----------	--	----

RESUMO

A ordem Quiroptera pode ser considerada um componente importante das comunidades neotropicais. Seus membros são de particular interesse para a biologia evolutiva, pois, devido a sua capacidade de voar a longas distâncias, podem apresentar, potencialmente, padrões de dispersão distintos daqueles exibidos por outros pequenos mamíferos que não voam. Além disso, são excelentes ilustrações de radiação adaptativa, ótimo forrageamento, altruísmo recíproco e coevolução, entre outros atributos. A família Phyllostomidae é a mais diversificada dos morcegos neotropicais e apresenta grande diversidade morfológica, relacionada aos variados hábitos alimentares. Esta variedade de hábitos dificulta a reconstrução da história filogenética do grupo. Os diversos estudos feitos não têm alcançado um consenso quanto às relações de parentesco em vários níveis (desde o subfamiliar ao genérico) com conseqüente variação nos arranjos classificatórios e a monofilia de algumas dessas subfamílias, bem como a monofilia de muitos gêneros. O único consenso parece ser com relação ao monofiletismo da família em si, consensualmente evidenciado por vários estudos. Utilizando seqüências dos genes mitocondrial citocromo b e nuclear RAG2 analisou-se espécies de morcegos da família Phyllostomidae coletadas ao sul do paralelo 07°S em território brasileiro e comparamos com outras seqüências obtidas no GenBank visando verificar se a inclusão de espécimes do sul da região Neotropical altera ou não as relações já descritas para esta família, basicamente com representantes da América Central e Norte da América do Sul. Além disso, testaram-se as diferentes hipóteses de agrupamento dentro dos Stenodermatinae tendo por base representantes dos biomas brasileiros Mata Atlântica e Cerrado, regiões sub-amostradas em outras análises filogenéticas e, mais especificamente, investigou-se as relações filogenéticas das espécies de grandes *Artibeus* com ênfase àquelas provenientes do território brasileiro. Estudou-se, também, a variação genética e possível estruturação geográfica de duas espécies deste gênero, *A. fimbriatus* e *A. lituratus*. Com relação à análise filogenética, na base da árvore gerada situou-se o gênero *Macrotus*. A seguir, encontrou-se o clado formado por *Diphylla* e *Desmodus*. O próximo clado une duas espécies - *Tonatia*

silvcola e *Trachops cirrhosus*, e, logo a seguir, no próximo nodo colocou-se a espécie *Glossophaga soricina*, que, na análise realizada apenas com o gene RAG2 agrupou-se ainda com *Anoura geoffroyi*. *Rhinophyla pumilio* situou-se no ramo seguinte e, na seqüência, observou-se um clado formado pelos representantes da subfamília Stenodermatinae. Dentro dos Stenodermatinae, as espécies do gênero *Sturnira* representam a linhagem mais basal. O segundo clado inclui os gêneros *Chiroderma*, *Vampyressa*, *Uroderma*, *Vampyrodes* e *Platyrrhinus*. O último clado apresenta um ramo representado por *Enchisthenes hartii* e, então, se divide em dois grupos-irmãos, o primeiro incluindo os gêneros *Ametrida*, *Pygoderma*, *Sphaeronycteris*, *Stenoderma* e *Phyllops*. No outro grupo irmão (o grupo dos *Artibeus*), as relações encontradas estão de acordo com a maioria dos trabalhos que discutem a filogenia deste gênero. Especificamente na árvore dos *Artibeus* encontrou-se que *A. obscurus* é o grupo irmão de *Artibeus* sp., localizando-se na posição mais basal, seguida por *A. fimbriatus*. *A. jamaicensis* ocupa uma posição intermediária, seguida por um clado formado por *A. hirsutus*, *A. inopinatus* e *A. fraterculus*. Já *A. lituratus*, *A. amplus* e *A. planirostris* estão entre as espécies mais derivadas. Vale a pena destacar na filogenia dos *Artibeus*, no entanto, que a posição basal observada para *A. obscurus* diverge da encontrada em outras análises filogenéticas. Além disso, os resultados aqui obtidos reforçam a idéia de que *A. planirostris* é uma espécie plena e não uma subespécie de *A. jamaicensis* e indicam que *Artibeus* sp. possa ser uma nova espécie. Quanto aos marcadores moleculares utilizados neste trabalho observa-se que o gene mitocondrial citocromo b foi bastante eficiente para detectar relações filogenéticas no nível intragenérico, mas foi limitado em termos de resolução para estudos de níveis taxonômicos superiores. Já o gene nuclear RAG2 apresentou uma boa resolução para o estudo dos Phyllostomidae, mas demonstrou-se ineficaz na tentativa de desvendar as relações genéticas entre as espécies de morcegos do gênero *Artibeus*.

ABSTRACT

The order Chiroptera may be considered a very important component of Neotropical communities. Its members are particularly interesting to evolutionary biology, as, due to its ability to long distances fly, they could present, potentially, dispersal patterns distinct from those depicted by other small mammals that do not fly. Besides these, they constitute excellent examples of adaptive radiation, optimal feed habits, reciprocal altruism, and co-evolution, among other attributes. The Phyllostomidae family is the most diversified of Neotropical bats, presenting significant morphologic diversity that is linked to the varied food habits they show. This variety in food habits makes it difficult to reconstruct the phylogenetic history of the group. The numerous studies that have been carried out did not reach a consensus about the multi-level kinship relationships (from sub-family to genus). Consequently, taxonomic arrangements vary considerably, side by side with the monophyly of some of these sub-families, and also the monophyly of several genera. The only consensus may lie in the monophyly of the family itself, reached after the conduction of several studies. This study analyzed sequences of the cytochrome b mitochondrial gene and RAG2 nuclear gene of bats of the Phyllostomidae family collected south of parallel 07° S in the Brazilian territory, which were compared to other sequences deposited in GenBank, aiming to ascertain whether the inclusion of specimens collected south of the Neotropical region alters the relationships previously described for the family, basically done with representatives from Central America and northern South America. Apart from this, different cluster hypothesis were tested within Stenodermatinae, based on specimens of the Brazilian biomes Atlantic Forest and Cerrado, regions that have been but under-sampled in other phylogenetic analyses. More specifically, the phylogenetic relationships of the large *Artibeus* species were investigated, with emphasis on species inhabiting the Brazilian territory. Also, the genetic diversity and the possibility that two species ranked under the genus, namely *A. fimbriatus* and *A. lituratus*, were geographically structured were investigated. Concerning the phylogenetic analysis, the *Macrotus* genus took the base of the generated tree. Next, the clade formed by *Diphylla* and *Desmodus* was found. A clade that joint

two species, *Tonatia silvicola* and *Trachops cirrhosus*, followed and then, in the forthcoming node is located the species *Glossophaga soricina*. This species, in the analysis of the RAG2 gene alone clustered also with *Anoura geoffroyi*. *Rhinophyla pumilio* was found at the same branch, followed by a clade formed by the representatives of the Stenodermatinae sub-family. Among the Stenodermatinae, the species of the *Sturnira* genus represented the most basal lineage. The second clade included the genera *Chiroderma*, *Vampyressa*, *Uroderma*, *Vampyrodes*, and *Platyrrhinus*. The last clade presented a branch formed by *Enchistenes hartii*, which branches out into two sister-groups, the first including the genera *Ametrida*, *Pygoderma*, *Sphaeronycteris*, *Stenoderma* and *Phyllops*. In the other sister-group (the *Artibeus* group), the relationships observed are in accordance with what has been reported in most studies that address the phylogeny of the genus. Concerning the *Artibeus* tree, *A. obscurus* is a sister-group of *Artibeus* sp., lying at a more basal position, followed by *A. fimbriatus*. *A. jamaicensis* takes an intermediary position, followed by a clade formed by *A. hirsutus*, *A. inopinatus*, and *A. fraterculus*. As for *A. lituratus*, *A. amplus*, and *A. planirostris*, these species are among the most derived. It is worth mentioning that the basal position observed for *A. obscurus* in the *Artibeus* phylogeny. Nevertheless this place differs from that observed in other phylogenetic studies. Moreover, the results obtained in the present study underline the notion that *A. planirostris* is a species itself, and not a sub-species of *A. jamaicensis*, and also suggest that *Artibeus* sp. may be a new species. As regards the molecular markers employed in the present study, the mitochondrial gene cytochrome b was found to be more efficient in the detection of phylogenetic relationships at intra-genus level, but failed to afford an enhanced resolution for higher taxonomic levels. In turn, the RAG2 gene showed good resolution in the study of Phyllostomidae, but was incapable to shed more light on the genetic relationships between the species of the *Artibeus* genus.

INTRODUÇÃO

1.1. A ordem *Chiroptera*

Os morcegos representam um dos grupos mais antigos e especializados dos mamíferos, a ordem Chiroptera. Ocorrem no mundo todo com exceção dos pólos (Fig. 1), sendo, por exemplo, os únicos mamíferos nativos do Hawaii e da Nova Zelândia (MENDES, 1972; FUTUYMA, 1992; SIMMONS, 2005a).

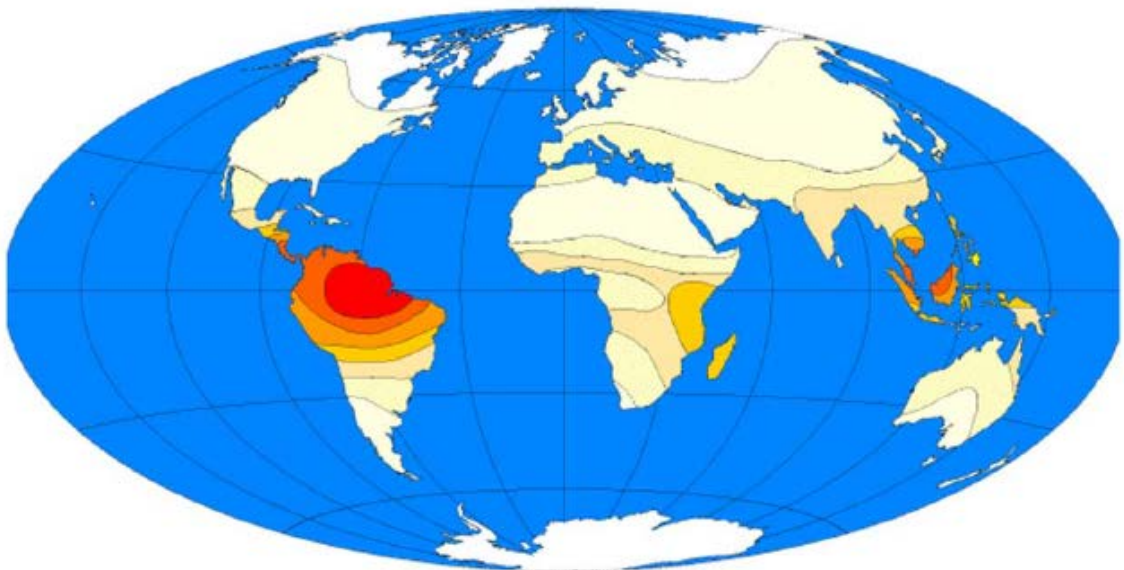


Figura 1: Biodiversidade de morcegos baseada no número de espécies em 500km² (Retirado de FINDLEY, 1993). O gradiente de cores aumenta a cada 20 espécies e vai do branco (sem morcegos presentes) até vermelho (120 espécies ou mais).

A ordem Chiroptera, com ao todo mais de 1.100 espécies, representa cerca de 20% dos mamíferos atuais (SIMMONS, 2005b), sendo esse número excedido, dentro da classe dos mamíferos, apenas pelos roedores (NOWAK, 1999, EISENBERG & REDDFORD, 1999; SIMMONS, 2005b).

Apresentam-se tradicionalmente subdivididos em duas subordens bem diferenciadas: a subordem Megachiroptera, restrita a algumas regiões da África, Índia, Austrália, sudeste da Ásia e algumas ilhas do Oceano Pacífico e que inclui apenas a família Pteropodidae, e a subordem Microchiroptera, que inclui as demais famílias.

Os Microchiroptera são geralmente menores que os megaquirópteros e possuem um complexo sistema de ecolocalização laringeal, que funciona através da transmissão e recepção de sinais ultra-sônicos permitindo orientar-se e localizar as presas (KOOPMAN, 1993, WILSON, 1997; NOWAK, 1999). Os Megaquiroptera, ao contrário, possuem uma aguçada visão e não apresentam ecolocalização, com exceção de algumas espécies (*Rousettus* spp.), nas quais existe outro tipo de ecolocalização baseada em estalos da língua (JEPSEN, 1970; KOOPMAN, 1993; NOWAK, 1999). Esta subdivisão, porém, gera controvérsias, pois muitos estudos moleculares recentes indicam que Microchiroptera não é um grupo monofilético (SIMMONS, 2005c). A classificação recente de SIMMONS (2005b), por exemplo, já não apresenta essa subdivisão (Tab. 1).

Tabela 1: Classificação da ordem Chiroptera, segundo SIMMONS (2005b) com destaque para as espécies existentes nos gêneros estudados. A divisão em subgêneros não foi apresentada.

Família Pteropodidae
Família Rhinolophidae
Família Hipposideridae
Família Megadermatidae
Família Rhinopomatidae
Família Phyllostomidae
<u>Subfamília Phyllostominae</u>
Gênero <i>Micronycteris</i> : <i>M. brosseti</i> ; <i>M. hirsuta</i> ; <i>M. homezi</i> ; <i>M. matses</i> ; <i>M. megalotis</i> ; <i>M. microtis</i> ; <i>M. minuta</i> ; <i>M. sanborni</i> ; <i>M. schmidtorum</i>
Gênero <i>Chrotopterus</i> : <i>Chrotopterus auritus</i>
Gênero <i>Mimon</i> : <i>Mimon bennettii</i> ; <i>M. cozumelae</i> ; <i>M. crenulatum</i> ; <i>M. koepckeae</i>
Gênero <i>Phyllostomus</i> : <i>P. discolor</i> ; <i>P. elongates</i> ; <i>P. hastatus</i> ; <i>P. latifolius</i>
Gênero <i>Tonatia</i> : <i>T. bidens</i> ; <i>T. saurophila</i>
Gênero <i>Trachops</i> : <i>Trachops cirrhosus</i>
<u>Subfamília Stenodermatinae</u>
Tribo Stenodermatini
Gênero <i>Artibeus</i> : <i>A. toltecus</i> ; <i>A. watsoni</i> ; <i>A. amplus</i> ; <i>A. anderseni</i> ; <i>A. aztecus</i> ; <i>A. cinereus</i> ; <i>A. concolor</i> ; <i>A. fimbriatus</i> ; <i>A. fraterculus</i> ; <i>A. glaucus</i> ; <i>A. gnomus</i> ; <i>A. hirsutus</i> ; <i>A. incomitatus</i> ; <i>A. inopinatus</i> ; <i>A. jamaicensis</i> ; <i>A. lituratus</i> ; <i>A. obscurus</i> ; <i>A. phaeotis</i>
Gênero <i>Chiroderma</i> : <i>Chiroderma doriae</i> ; <i>C. improvisum</i> ; <i>C. salvini</i> ; <i>C. trinitatum</i> ; <i>C. villosum</i>

Gênero *Platyrrhinus*: *P. aurarius*; *P. brachycephalus*; *P. chocoensis*; *P. dorsalis*; *P. helleri*; *P. infuscus*; *P. lineatus*; *P. recifinus*; *P. umbratus*; *P. vittatus*;

Gênero *Pygoderma*: *Pygoderma bilabiatum*

Gênero *Uroderma*: *Uroderma bilobatum*; *U. magnirostrum*

Gênero *Vampyressa*: *V. bidens*; *V. brocki*; *V. melissa*; *V. nymphaea*; *V. pusilla*; *V. thyone*

Tribo Sturnirini

Gênero *Sturnira*: *S. aratathomasi*; *S. bidens*; *S. bogotensis*; *S. erythromos*; *S. liliun*; *S. ludovici*; *S. luisi*; *S. magna*; *S. mistratensis*; *S. mordax*; *S. nana*; *S. oporaphilum*; *S. thomasi*; *S. tildae*

Subfamília Desmodontinae

Gênero *Desmodus*: *Desmodus rotundus*

Gênero *Diphylla*: *Diphylla ecaudata*

Subfamília Brachyphyllinae

Subfamília Phyllonycterinae

Subfamília Glossophaginae

Tribo Glossophagini

Gênero *Glossophaga*: *G. commissarisii*; *G. leachii*; *G. longirostris*; *G. morenoi*; *G. soricina*

Tribo Lonchophyllini

Subfamília Carollinae

Família Craseonycteridae

Família Emballonuridae

Subfamília Taphozoinae

Subfamília Emballonurinae

Família Nycteridae

Família Myzopodidae

Família Mystacinidae

Família Molossidae

Subfamília Molossinae

Subfamília Tomopeatinae

Família Vespertilionidae

Subfamília Vespertilioninae

Tribo Eptesicini

Tribo Nycticeiini

Tribo Nyctophilini

Tribo Lasiurini

Tribo Pipistrellini

Tribo Plecotini

Tribo Vespertilionini

Subfamília Antrozoinae

Subfamília Myotinae

Subfamília Miniopterinae

Subfamília Murininae

Subfamília Kerivoulinae

Família Mormoopidae

Família Noctilionidae

Família Furipteridae

Família Thyropteridae

Família Natalidae

A maioria dos morcegos é pequena (em média cerca de 60g), contudo existe uma grande variação em tamanho de corpo dentro da ordem. Essa variação inclui desde uma das menores espécies de mamíferos, o morcego asiático *Craseonycteris thonglongyai* com cerca de 2g (HULVA & HORACEK, 2002), até o indiano *Pteropus giganteus* com mais de 1.5kg. A forma da cabeça e

asas também varia enormemente entre as diferentes espécies sendo essas características correlacionadas com os nichos de forrageamento (JONES, 2002).

A Região Neotropical destaca-se por possuir a mais rica fauna de microquirópteros do mundo, podendo-se dizer que os morcegos constituem um grupo principalmente tropical (TADDEI, 1980). Essa diversidade deve-se, em grande parte, à variedade de hábitos alimentares incluindo herbivoria (*sensu lato*), insetivoria, carnivoria, piscivoria e hematofagia (TRAJANO, 1984). A diversidade e densidade relativa de suas populações sugerem uma importância notável desse grupo na dinâmica dos ecossistemas tropicais (MARINHO FILHO, 1985).

Devido à variedade de morcegos herbívoros, esses são considerados importantes na dispersão de recursos genéticos (pólen e sementes) a longas distâncias, pois o raio de ação desses animais é relativamente grande e variável de acordo com a espécie (KAGEYAMA, 1996), sendo responsáveis por até 25% da dispersão em algumas regiões (HUMPHREY & BONACCORSO, 1979). Para SILVA & PERACCHI (1995) os morcegos são os mamíferos visitantes/polinizadores mais comuns de uma grande variedade de flores. Além de serem importantes na polinização, tanto em matas como em capoeiras, são grandes controladores de populações de insetos (REIS, 1982). ESBERÁRD (2000) exemplifica esta importância citando que um morcego de 145 gramas espalha 6.000 sementes em uma única noite. Os insetívoros ingerem cerca de 600 insetos em 70 minutos de vôo.

Além disso, morcegos têm grande potencial como indicadores dos níveis de perturbação de habitat, sendo também um bom material para o estudo da diversidade, interação competitiva e respostas para o estudo das flutuações do ambiente, tanto pela sua abundância quanto pelo número de espécies encontradas coexistindo numa mesma área (FENTON *et al.*, 1992). Pode-se encontrar mais de 100 espécies de morcegos coexistindo em uma mesma comunidade ecológica, um número que está longe de ser excedido por qualquer outro grupo de mamíferos (SIMMONS, 2005a).

No entanto, sua conservação ainda entra em conflito com os interesses em controlar os problemas de saúde pública causados por hematófagos e com a

perda de habitat provocada pela mineração, desmatamento e uso recreativo de cavernas (BREDT *et al.*, 1999).

Possuem hábitos noturnos ou crepusculares (SILVA, 1985; RYDELL & SPEAKMAN, 1995), sendo os únicos mamíferos com vôo verdadeiro, o que foi um passo evolutivo fundamental que lhes abriu novos e desocupados espaços no ambiente. As oportunidades representadas por esse nicho, incluindo vida noturna, vôos, insetos, frutas tropicais e flores, permitiram-lhes uma imensa radiação adaptativa, evoluindo em uma grande diversidade em um período relativamente curto.

Além do amplo espectro dos nichos ecológicos, outro fator de sucesso dos microquirópteros é a utilização de abrigos diurnos, que lhes fornecem a proteção contra o clima adverso, predadores e parasitos não residentes (CRESPO *et al.*, 1961; HUMPPREY & BONACCORSO, 1979) e o fato de, diferentemente de aves ou ainda de outros vertebrados terrestres, a maioria das espécies utilizar a ecolocação para localizar e capturar suas presas (SIMMONS, 2005a)

Possuem um registro fóssil bastante incompleto, talvez o mais pobre dentre os mamíferos, mas acredita-se que essa ordem tenha surgido pelo menos há 50 milhões de anos atrás no Eoceno (ALTRINGHAM, 1996; JONES, 2002), coincidindo com um significativo aumento da temperatura global, da diversidade e abundância de plantas e no apogeu da diversidade de insetos do Terciário (TEELING *et al.*, 2005), sendo *Icaronycteris indexam* considerado o fóssil mais antigo. Esta, juntamente com outras espécies fósseis como *Archaeonycteris*, *Hassianycteris* e *Palaeochiropteryx* são consideradas os representantes mais basais das espécies de microquirópteros atuais e *Archaeopteropus transiens* dos megaquirópteros (JONES, 2002).

Evidências, contudo, sugerem que os morcegos possam ter evoluído muito mais cedo do que estas datas fósseis sugerem, colocando a sua origem como se sobrepondo ao fim da era dos dinossauros. Uma dessas evidências é a aparente relação, baseada em comparações imunológicas e morfológicas, entre as espécies de *Noctilio* da América do Sul e *Mystacina tuberculata*, uma das únicas espécies nativas de mamíferos da Nova Zelândia, o que pode ser considerada evidência circunstancial de que estas famílias foram separadas durante a

separação do Gondwana, no Cretáceo (PIERSON *et al.*, 1986, JONES *et al.*, 2002; TEELING *et al.*, 2003).

Além disso, *Icaronycteris index*, apesar de possuir algumas características consideradas ancestrais em morcegos (e algumas semelhantes a megaquirópteros), apresenta não só as características necessárias ao voo batido, como análises cranianas que indicam uma capacidade de ecolocalização igual as dos microquirópteros atuais (JEPSEN, 1970; SIMMONS & GEISLER, 1998). Estas características avançadas sugerem que os morcegos tenham surgido em algum ponto do final do Paleoceno e se diversificaram muito rapidamente (JEPSEN, 1970; SIMMONS & GEISLER, 1998).

Na região Neotropical ocorrem nove famílias: *Emballonuridae*; *Furipteridae*; *Mollossidae*; *Mormoopidae*; *Natalidae*; *Noctilionidae*; *Phyllostomidae*; *Thyropteridae*; *Vespertilionidae*. No Brasil, cerca de 140 espécies são conhecidas (AGUIAR & TADDEI, 1995; MARINHO-FILHO & SAZIMA, 1998; BREDT *et al.*, 2002), representando, aproximadamente, um terço das espécies de mamíferos brasileiros (MARINHO-FILHO & SAZIMA, 1998).

1.2. A família *Phyllostomidae*

Os morcegos nariz de folha (Família *Phyllostomidae*, do grego: *phyllo* = folha + *stoma* = boca) incluem mais de 160 espécies, na sua maioria adaptadas a baixas altitudes e regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo, confinados ao hemisfério ocidental e distribuídos do sul da Califórnia e Arizona, bem como da planície costeira do Texas, até o norte da Argentina (NOWAK, 1999, SIMMONS, 2005b).

O fóssil do mais antigo representante dessa família, *Notonycteris magdalensis* data do Mioceno (13-25 Ma) (ALTRINGHAM, 1996) e acredita-se que a família tenha surgido entre o Mioceno e Pleistoceno na América do Sul e no Pleistoceno na América do Norte (NOWAK, 1999).

A principal característica para o reconhecimento dos morcegos desta família é a presença de um apêndice nasal, conhecido também como “folha nasal”

(Fig. 2) uma protuberância carnosa do nariz com uma certa forma lanceolada, podendo ser longa e ultrapassar a cabeça do animal em tamanho em algumas espécies, ou ainda ser quase ausente em outras. Na Subfamília Desmodontinae, por exemplo, o apêndice nasal é bastante reduzido, apresentando a forma discóide (NOWAK, 1999).



Figura 2: Apêndice nasal. Foto de Marcos Tschapka

São caracterizados pela ausência de processo pós-orbital. Além disso, o terceiro dedo possui três falanges completas e o tamanho da cauda e da membrana interfemural é variável (Fig. 3). As asas são, em geral, largas e a coloração da pelagem varia desde o castanho claro ou alaranjado até o castanho escuro ou negro (EISENBERG & REDFORD, 1999).

Apresentam grande diversidade morfológica, relacionada aos variados hábitos alimentares, entre os quais são incluídos: insetivoria, frugivoria, carnivorina, frugivoria, folivoria, granivoria, nectarivoria, onivoria e hematofagia (NOWAK, 1999; PERACCHI *et al.*, 2006). Um exemplo desta variação morfológica é o número de dentes, que varia entre 26 até 34, refletindo, em parte, a diversidade de hábitos alimentares (EISENBERG & REDFORD, 1999).

Esta variedade de hábitos tem se tornado um problema para sistematas, dificultando a reconstrução da história filogenética do grupo. Como consequência, as relações filogenéticas do grupo são estudadas por mais de um século sem chegar a nenhum consenso (WETTERER *et al.*, 2000).

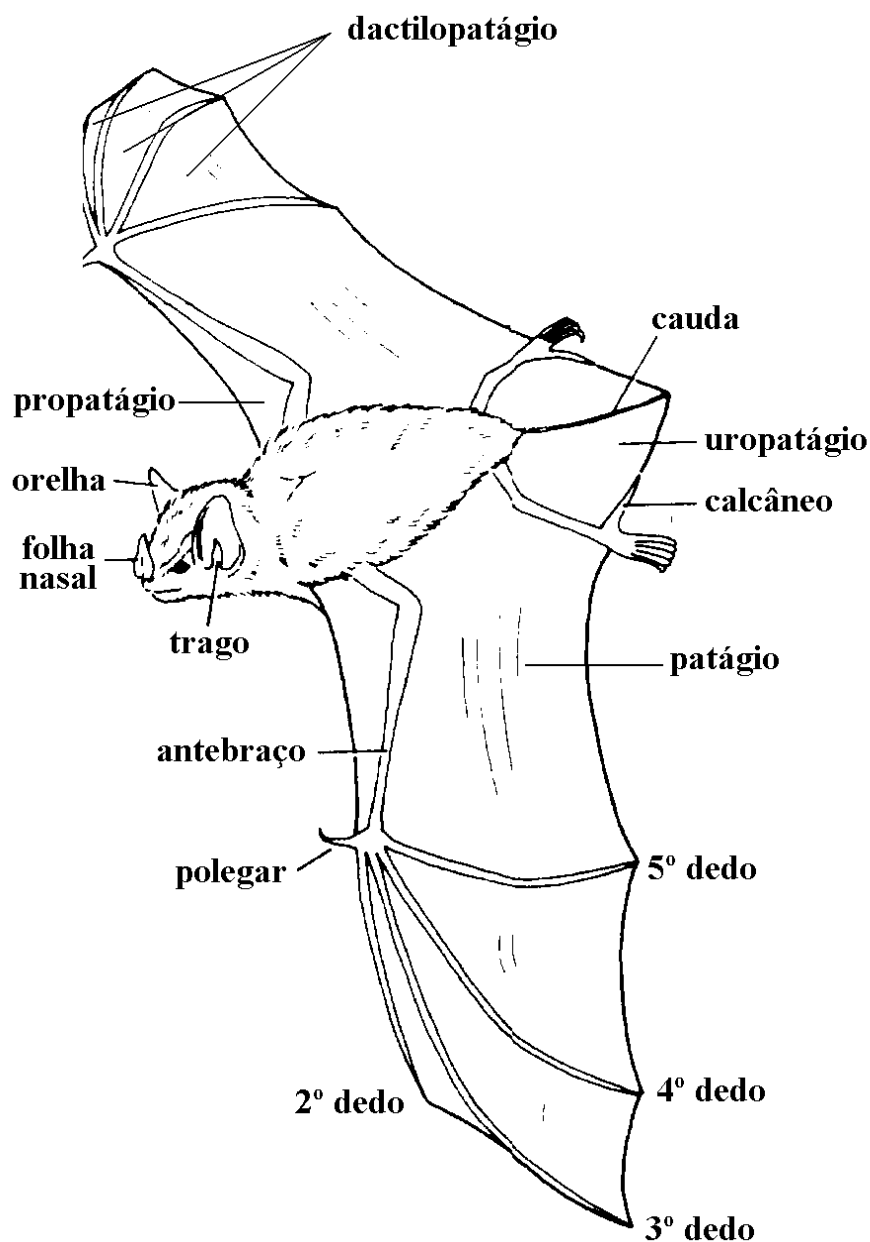


Figura 3: Principais características morfológicas externas utilizadas para reconhecimento das famílias de Chiroptera. Uropatágio equivale à membrana interfemural. Figura cedida por Sérgio L. Althoff.

Historicamente Phyllostomidae pode ser dividido em pouco mais de duas até mais que oito subfamílias. A classificação de KOOPMAN (1993), bastante utilizada até recentemente pela maioria dos autores reconhece um grande número de subfamílias, incluindo uma subfamília de hematófagos

(Desmodontinae), uma de insetívoros, carnívoros e onívoros (Phyllostominae), quatro de nectarívoros e polinívoros (Brachyphyllinae, Phyllonycterinae, Glossophaginae e Lonchophyllinae), e duas de frugívoros (Carolliinae e Stenodermatinae). No Brasil, os filostomídeos estão representados por 92 espécies e 40 gêneros, agrupados em seis subfamílias - *Phyllostominae*, *Lonchophyllinae*, *Glossophaginae*, *Carolliinae*, *Stenodermatinae* e *Desmodontinae* e que correspondem a 55,76% e 62,5%, respectivamente, dos morcegos já registrados no país (PERACCHI *et al.*, 2006), sendo, dentre as famílias de Chiroptera brasileiras, a mais diversa (MARINHO-FILHO & SAZIMA, 1998).

No entanto, a monofilia tanto de algumas dessas subfamílias quanto de muitos gêneros, incluindo *Micronycteris*, *Mimon*, *Phyllostomus*, *Artibeus*, e *Vampyressa*, tem sido questionada por muitos autores (WETTERER *et al.*, 2000).

Os conjuntos de dados utilizados para tentar resolver esses problemas incluem aloenzimas, morfologia cromossômica, associações parasita-hospedeiro, distâncias imunológicas, sítios de restrição de rDNA e seqüências de DNA mitocondrial e nuclear. As análises destes dados tem produzido um grande número de hipóteses divergentes sobre as relações dos Phyllostomidae (WETTERER *et al.*, 2000).

Exemplos recentes das tentativas de resolver os problemas dentro de Phyllostomidae são os trabalhos de WETTERER *et al.* (2000), que analisaram diversos dados existentes na literatura para produzir uma “árvore de evidência total” (total evidence tree) para todos os gêneros atuais de filostomídeos. Outro exemplo foi o trabalho de JONES *et al.* (2002), que utilizaram o método MRP (Matrix Representation using Parsimony), o de BAKER *et al.* (2000) que realizaram uma análise cladística de 66 taxa utilizando o gene nuclear RAG2 e o de BAKER *et al.* (2003) que investigaram as relações filogenéticas entre 48 gêneros utilizando 2,6kb dos genes mitocondriais 12S rRNA, TrnVal, 18S rRNA e cerca de 4,0kb do gene nuclear RAG2.

1.3. Os marcadores moleculares e os estudos em quirópteros

O surgimento, a partir da década de 70 do século XX, de metodologias capazes de decifrar as seqüências de DNA como eletroforese, reações de hibridação e seqüenciamento, aliada à implantação da técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase, MULLIS *et al.*, 1986) disponibilizaram aos geneticistas um potente arsenal tecnológico para poder utilizar as variações das seqüências de DNA do núcleo ou de organelas como marcadores informativos para os mais diversos estudos (MATTEVI, 2003).

Estes marcadores permitem a mensuração de parâmetros fundamentais da demografia das espécies (tamanho efetivo da população, efeito-fundador de “gargalos de garrafa”, fluxo gênico sexo-específico, etc), além de serem usados para inferir as relações históricas e geográficas entre grupos (HEDRICK, 2001). Podem ainda ser uma ferramenta poderosa na detecção de espécies crípticas, já que as diferenças genéticas que se acumulam entre as espécies com o passar do tempo nem sempre se refletem em caracteres morfológicos (MAYER & VON HELVERSEN, 2001a), além de serem utilizados em análise forense onde podem ser utilizados para identificar a origem biológica de amostras provenientes de espécies caçadas/coletadas ilegalmente ou ameaçadas de extinção, tais como sangue, carcaça, carne, penas, ovos ou de produtos comercializados como chifres, marfim, cascos de tartarugas, etc.

Seu uso, obviamente, não descarta a importância da utilização de caracteres morfológicos e citológicos. O ideal é tentar utilizar-se das ferramentas mais eficazes para a resolução do problema específico, levando em consideração as condições de trabalho de que se dispõe, o problema que se queira estudar e o material biológico existente.

Muitos trabalhos descrevendo padrões de diferenciação geográfica intraespecífica em morcegos têm utilizado diferentes marcadores, o que dificulta comparações e gera conflitos. Alguns estudos, por exemplo, relatam baixos níveis de divergência genética e pouca estruturação geográfica, como no caso de DITCHFIELD (2000), que afirma que a divergência em morcegos é 10 vezes mais lenta do que em outros mamíferos. Outros estudos, como os de WILKISON & FLEMING (1996), COOPER *et al.* (2001) e MAYER & VON HELVERSEN (2001a) apresentam níveis bem mais altos de divergência.

Esses conflitos podem estar relacionados aos marcadores moleculares utilizados, que variam de estudo para estudo, pois, diferentes tipos de marcadores moleculares podem transmitir informações de forma diversa. A comparação dos resultados obtidos para marcadores moleculares mitocondriais e nucleares pode revelar uma diferente contribuição de machos e fêmeas para a dinâmica dos genes nas populações de uma espécie. Outra possível explicação é a tentativa de comparar em uma mesma análise, espécies de hábitos diferentes, como as migratórias e sedentárias, por exemplo (BURLAND & WILMER, 2001).

Mesmo com os problemas de comparações, os estudos moleculares têm proporcionado novas e importantes idéias sobre a ecologia, organização social e outros aspectos relacionados aos morcegos, além de abrir novos e excitantes campos de estudos (BURLAND & WILMER, 2001), como nas análises de padrões de migração (PETIT & MAYER, 2000), estrutura de populações (MILLER-BUTTERWORTH *et al.*, 2003), caracterização de espécies crípticas (MAYER & VON HELVERSEN, 2001a; MAYER & VON HELVERSEN, 2001b), testes de modelos evolutivos (LEWIS-ORITT *et al.*, 2001a), introgressão (HOOFMANN *et al.*, 2003) além de estudos de estrutura de populações baseada em testes de paternidade como os realizados por PETRI *et al.* (1997).

No que se refere especificamente à sistemática e filogenia diversos grupos tem sido estudados como Mormoopidae (LEWIS-ORITT *et al.*, 2001b; DAVALOS, 2006), Vespertilionidae (HOOFER & VAN DEN BUSSCHE, 2003), Natalidae (VAN DEN BUSSCHE & HOOFER, 2001; DÁVALOS, 2005), Phyllostomidae (BAKER *et al.*, 2000; WETTERER *et al.*, 2000; BAKER *et al.*, 2003), Stenodermatini (VAN DEN BUSSCHE *et al.*, 1993) e Lonchophyllini (DAVALOS & JANSÁ, 2004) só para citar alguns exemplos.

Apesar dos estudos com marcadores moleculares em quirópteros encontrarem-se bastante difundidos no meio científico nos últimos anos, não existe ainda um trabalho que inclua todas as famílias para resolver os problemas de classificação da ordem (SIMMONS, 2005b).

Além disso, os estudos moleculares realizados com morcegos brasileiros estão, em geral, incorporados em trabalhos com amostragem geográfica mais ampla, com objetivos diversos onde as amostras são apenas mais uma localidade

para os estudos filogenéticos e filogeográficos (LEE *et al.*, 2002; HOFFMANN & BAKER, 2003; HOFFMAN *et al.*, 2003). Por isso, a estrutura populacional e a história evolutiva dos morcegos no Brasil são muito pouco conhecidas e os animais endêmicos do país, como *Chiroderma doriae*, por exemplo, são basicamente desconhecidos do ponto de vista molecular (DITCHFIELD *et al.*, *in press*).

Atualmente, o marcador dominante para esses estudos é o DNA mitocondrial (mtDNA). O mtDNA é circular, haplóide, e, em animais, costuma ser de pequeno tamanho (aproximadamente 16.500 pares de bases) podendo variar entre 6kb e 20kb dependendo do organismo estudado (SHIMKO *et al.*, 2001).

Encontra-se localizado no citoplasma do interior das mitocôndrias, com centenas de milhares de cópias por célula (MOREIRA, 2001) sendo quase todo o genoma mitocondrial envolvido em funções codificantes. Pseudogenes, íntrons, famílias de DNA repetitivo e seqüências espaçadoras entre genes são raras (AVISE, 1994).

O mtDNA apresenta padrão de herança matrilinear e a capacidade de acumular substituições de bases, inserções e deleções com uma taxa média de 5 a 10 vezes mais rápida do que a do DNA nuclear cópia simples (BROWN *et al.*, 1979) devido, provavelmente, ao excesso de resíduos metabólicos, baixa fidelidade na replicação e ausência de mecanismo de reparo (LI, 1997).

Estas características o tornam apropriado para a investigação de diferenciações genéticas recentes, podendo, deste modo, auxiliar no estabelecimento de relações filogenéticas entre os organismos em estudo (MOREIRA, 2001), sem a ambigüidade causada pela recombinação meiótica que ocorre em genes nucleares, ou ainda, introduzir análises comparativas ao nível das populações (DINIZ FILHO, 2000).

A filogeografia baseada no mtDNA permite a descrição aperfeiçoada da distribuição geográfica, distâncias genéticas e tempos de divergência entre linhagens evolutivas de animais, o que leva à maior compreensão de biogeografias regionais e áreas de endemismo, bem como à elaboração de propostas de áreas de conservação (SILVA & PATTON, 1998).

O marcador mitocondrial mais extensivamente utilizado nas filogenias moleculares, principalmente nas que avaliam as relações entre hierarquias taxonômicas superiores, é o gene do citocromo b. Este gene é um dos treze codificadores de proteína do genoma mitocondrial (IRWIN *et al.*, 1991), sendo considerado o marcador que pode prover a melhor resolução em estudos de taxa de mamíferos com tempos de divergência entre aproximadamente 4 a 44 MA (IRWIN *et al.*, 1991; SMITH & PATTON, 1991).

Uma das limitações desses marcadores, é que, dependendo do tempo de divergência entre linhagens e das taxas de mutação, muitas das homologies observadas podem ser, na verdade, homoplasias.

No que se refere aos trabalhos sobre Chiroptera, esse marcador é considerado apropriado para elucidar relações dentro de gêneros, mas a saturação de alguns tipos de mutação complica a resolução em níveis taxonômicos mais elevados (BAKER *et al.*, 2000), o que tem levado recentemente os pesquisadores a utilizar também como marcador o gene nuclear RAG2 (recombination activating gene).

As proteínas RAG são codificadas por dois pares de genes (RAG1 e RAG2) que, nos tetrápodes, não são interrompidos por íntrons e situados 8Kb um em relação ao outro no genoma nuclear e possuem 1,043 e 527 aminoácidos, respectivamente. Esses genes aparentemente chegaram como transposons no ancestral dos gnastostomados (jawed vertebrates), assumindo, após sua inserção, significativa função no sistema imune, catalisando a recombinação V(D)J (BAKER *et al.*, 2000).

Estes genes são expressos somente nos linfócitos B e T, onde os níveis do transcrito variam nos diferentes estágios de desenvolvimento e formam as nucleases responsáveis pela clivagem do DNA no processo de recombinação V(D)J (SADOFKY, 2001; KLEIN, 2004).

O potencial de RAG2 na análise filogenética está bem claro nos trabalhos realizados com a ordem Chiroptera por BAKER *et al.* (2000), CARSTENS *et al.* (2004) e BAKER *et al.* (2003), principalmente dentro da família Phyllostomidae, grupo altamente controverso onde a magnitude da adaptação morfológica para

estratégias mais eficientes de alimentação pode resultar em fenótipos tão modificados que mascaram as relações filogenéticas basais (BAKER *et al.*, 2000).

RAG2 pode, particularmente, ser de grande utilidade para estudos da evolução dos filostomídeos, pois, além de evoluir mais lentamente que o citocromo b, sua função na resposta imunológica provavelmente não está ligada às características morfológicas utilizadas frequentemente como critérios diagnósticos na taxonomia do grupo.

Capítulo II

OBJETIVOS

Considerando que estudos filogenéticos em níveis genérico e específico no contexto regional brasileiro são mais raros e que nossa amostra consta de populações e espécies de morcegos habitantes de diferentes biomas do Brasil, no presente trabalho, baseados em seqüências do gene mitochondrial citocromo b e do gene nuclear RAG2, nos propomos a:

- Analisar 19 espécies de morcegos da família Phyllostomidae coletadas ao sul do paralelo 07°S em território brasileiro e compará-las com outras seqüências obtidas no GenBank visando verificar se a inclusão de espécimes do sul da região Neotropical altera ou não as relações descritas para esta família com representantes da América Central e Norte da América do Sul.

- Testar as diferentes hipóteses de agrupamento dentro dos Stenodermatinae pela análise das relações entre 09 gêneros tendo por base representantes dos biomas brasileiros Mata Atlântica e Cerrado, regiões sub-amostradas em outras análises filogenéticas.

- Investigar as relações filogenéticas das espécies de grandes *Artibeus* (com ênfase àquelas provenientes do território brasileiro) em cinco espécies do Brasil e seqüências de seis espécies acessadas através do GenBank.

- Estudar a variação genética e possível estruturação geográfica de duas espécies de *Artibeus*: *A. fimbriatus* e *A. lituratus*.

Artigo 1

RELATIONSHIPS OF BRAZILIAN AND OTHER SOUTH AMERICAN *ARTIBEUS*
SPECIES OF PHYLLOSTOMIDAE BAT GENUS

Artigo submetido à revista *Molecular Phylogenetics and Evolution*

Cristina Claumann Freygang¹, Sérgio L. Althoff², Ana Letícia Pereira³,
Margarete Suñé Mattevi^{1-3*}

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul

²Universidade Regional de Blumenau, Caixa Postal 1507, CEP 89010971, Blumenau, Santa Catarina

³Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Av. Farroupilha, n. 8001, CEP 92450-900, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author: Fax and Phone: 55 (51) 33113386

E-mail address: mattevi@terra.com.br

Abstract

This study describes the analysis of the mitochondrial cytochrome *b* (cyt *b*) and the nuclear recombination activator (RAG2) genes in 39 specimens belonging to 5 *Artibeus* species, *A. fimbriatus*, *A. lituratus*, *A. planirostris*, *A. obscurus*, and *Artibeus* sp obtained from 14 sites of the Brazilian territory plus 18 representatives of the *Artibeus* species from GenBank. The phylogenetic relationships between the large *Artibeus* were investigated, with emphasis placed on those species from the Brazilian territory that had never been included in previous molecular phylogenetic analyses. *A. obscurus* was found to be a sister group of *Artibeus* sp. (which seemed to be a new species) at the most basal position, followed by *A. fimbriatus*. *A. jamaicensis* takes an intermediary position, followed by a clade formed by *A. hirsutus*, *A. inopinatus*, and *A. fraterculus*. As for the group *A. lituratus* and *A. amplus* plus *A. planirostris*, they are among the most derived species.

Keywords: Chiroptera; *Artibeus* phylogeny; Phyllostomidae; mitochondrial DNA; cytochrome b; nuclear DNA; RAG2.

1. Introduction

The *Artibeus* genus Leach, 1821, according to the classifications of Koopman (1993) and Simmons (2005) belongs to the Phyllostomidae family, subfamily Stenodermatinae. The species of this genus present a V-shaped narrow interfemoral membrane. Pelage texture is velvety, and varies in color from brown to grayish or black, with silvery hues on the back that lighten up ventrally. Four white facial bands are normally present, but a clear dorsal line is not observed. *Artibeus* differs from other related genera in cranial and dental features (Nowak, 1999). The total number of teeth depends on the number of molars, and can be 28, 30 or 32, varying from species to species and, at times, from individual to

individual (Nowak, 1999; Rui and Drehmer, 2004). Concerning food habits, *Artibeus* species are essentially frugivorous, but may also feed on pollen, nectar, flower organs, and insects (Barquez *et al.*, 1993).

The genus systematic remains a controversial subject matter mainly because the paucity of accurate information about the geographic distribution and variation within the different *Artibeus* taxa, with several authors relating specimens wrongly assigned (Taddei *et al.*, 1998).

Koopman (1993) and Marques-Aguiar (1994) have advocated the assignment of *Artibeus* species under four sub-genera: *Artibeus* Leach, 1821 (classified as "large *Artibeus* species"), *Dermanura* Gervais, 1856, *Enchistenes* Andersen, 1906, and *Koopmania* Owen, 1991. Nevertheless, no consensus has been reached about the real taxonomic status of these groups, which are considered by other authors as distinct genera (Van den Bussche *et al.*, 1998; Wetterer *et al.*, 2000). In a more recent classification, Simmons (2005) recognizes three sub-genera only, *Artibeus*, *Dermanura* and *Koopmania*, and considers *Enchistenes* as a genus. In her classification, the author assigns a total of 18 species to the *Artibeus* genus, with eight being included in the *Artibeus* sub-genus, nine in the *Dermanura* sub-genus, one in the *Koopmania* sub-genus, and also considers *Enchistenes* as a monotypic genus.

Artibeus is found in the whole Neotropical region, occurring from Mexico and throughout all the Central and South Americas up to northern Argentina and southern Brazil (Koopman, 1993; Eisenberg and Redford, 1999).

Some *Artibeus* species are among the most common and abundant Phyllostomidae of the Neotropical communities. For instance, in southernmost Brazil, *A. lituratus* (Olfers, 1818) and *A. fimbriatus* Gray 1838 account for more than 70% of the bat specimens collected in Atlantic Forest domain (Rui and Fabián, 1997). But studies on the probable geographic variation patterns of the large *Artibeus* (sub-genus *Artibeus*) in the Brazilian territory are very scarce. The complex communities of large *Artibeus* found in the south-southeastern Brazilian territory (geographically associated to the Atlantic Forest and Cerrado environments) could be pointed out as a case which invites a comprehensive revision, in which the comparisons with all other geographic forms should be

include. The documentation available for the *Artibeus* diversity in the southern, southeastern and west-central Brazilian regions is also poor (Tavares *et al.*, *in press*).

The interspecific phylogenetic relationships in the *Artibeus* genus have been investigated by means of morphological (Marques-Aguiar, 1994; Wetterer *et al.*, 2000; Guerrero *et al.*, 2003) and molecular characters. As regards molecular studies, valuable contribution has been made the analyses of several *Artibeus* species using the cytochrome *b* gene carried out by Van Den Bussche *et al.* (1998), the investigations of the taxonomic status of *Artibeus jamaicensis triomylus* and other six taxa of large *Artibeus* found in the Gulf of Mexico, Caribbean and Central America made by Guerrero *et al.* (2004), and the study also with the group of large *Artibeus* performed by Lim *et al.* (2004). Nevertheless, all these research papers have preferentially focused on specimens representative of Central and North of South America, while a considerable portion of the distribution area of the genus was sampled to a minor extent.

This study investigates the phylogenetic relationships of the large *Artibeus* species, with emphasis placed on those species found in the Brazilian territory that, to the present, have not been included in other previous molecular studies. These relationships were analysed using the mitochondrial gene cytochrome *b* (*cyt b*) and nuclear recombination activating gene (RAG2) sequences in 5 Brazilian species obtained from 14 sites, complemented by the sequences of 6 species retrieved from GenBank. A second purpose consisted in the evaluation of the genetic variation and the search of a possible geographic structuration of two species, *A. fimbriatus* and *A. lituratus*, whose sampling procedure generated useful information.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

Tissues from 39 specimens, 19 of *Artibeus lituratus*, 4 of *A. planirostris*, 3 of

A. obscurus, 8 of *A. fimbriatus* and 5 of *Artibeus* sp, were obtained from 14 sites in an area ranging from 7° to 28°S and 47° to 49°W, of the Brazilian territory (Table 1). The skins and skulls of these specimens are stored in the Mammals Collection of Universidade Regional de Blumenau and Mammals Collection of the Museu Nacional, Rio de Janeiro.

Table 1 here

To this analysis, 18 representatives of 6 *Artibeus* species from the GenBank, collected in 10 different South American localities were added. Nine of these sites ranged from Peru to Mexico, with only one individual being native to Brazil (Table 1).

The sequences of five microchiroptera taxa, *Sturnira lillium*, *S. tildae*, *Artibeus (Dermanura) cinereus*, *Enchisthenes hartii* and *Glossophaga soricina* were included as outgroups. The choice of the outgroups was based on Baker *et al.* (2003) and Simmons (2005).

2.2. Nucleotide acid sequence analysis

DNA was extracted from kidney, liver, heart or muscle (stored at -20°C or in ethanol 70% purity) using the standard protocol described in Medrano *et al.* (1990). The mitochondrial *cyt b* gene sequences were isolated via polymerase chain reaction (PCR) using the primers MVZ05, MVZ23 (light-strand), MVZ16 (heavy-strand) suggested by Smith and Patton (1993) and MUS15398 (heavy-strand) suggested by Anderson and Yates (2000). PCR reaction were run in a total volume of 25µl containing: 10x PCR buffer, MgCl₂ 2.6 mM, dNTP 0.56 µM, 0.2µM of each primer, 1 unit Taq polymerase, and 1-2ul template DNA. Reaction conditions were as follows: Initial denaturation (92°C – 5min); followed by 5 cycles in Touchdown (denaturation: 92°C - 1 min; annealing temperature step-downs every cycle 1°C from 50°C to 46°C - 1 min; extension: 72°C - 1 min). The annealing temperature for the final 35 cycles was 46°C with denaturation and

extension phases as above. Final extension: 72°C – 10 min. Each round of PCR reactions also included one negative control to check for contamination.

For the amplification of nuclear RAG2, the primers RAG2F1 (light-strand), RAG2F2 (heavy-strand) suggested by Baker *et al.* (2000) were used. PCR reactions were run in a total volume of 25µl containing: 10x PCR buffer, 2,6mM of MgCl₂, 1,12µM de dNTP, 0,32µM of each primer, 1 unit of Taq polymerase, and 1-2ul of template DNA. Reaction conditions were as follows: Initial denaturation (92°C – 5min); followed by 35 cycles (denaturation: 92°C – 60s; annealing temperature 60°C – 45s; extension: 72°C – 90s). Final extension: 72°C – 10 min. Each round of PCR reactions also included one negative control to check for contamination.

PCR products were purified with exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase (Amersham Biosciences). All taxa were sequenced directly from purified PCR products using the primers cited above and the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Sequencing of both strands was carried out using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). All sequences are available in GenBank as displayed in Table 1.

2.3. Data analysis

The sequences obtained were read employing the Chromas 1.45 program, aligned using the Clustal X 1.81 program (Thompson *et al.*, 1997) under the default setting costs and manually refined with the aid of the Genedoc (Nicholas and Nicholas, 1997). Saturation plots were obtained with Data Analysis in Molecular Biology and Evolution software (DAMBE; Xia and Xie, 2001). The composition of bases and genetics distances (Kimura-2 parameters) was accomplished by the use of Molecular Evolution Genetics Analysis software - MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004).

The phylogenetic analyses were performed using the maximum parsimony (MP) algorithm obtainable in PAUP*, version 4.0b10 (Swofford, 2001) by heuristic

search with tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping, the MULPARS option, and 100 random-addition replicates. Bootstrap statistical support (Felsenstein, 1985) was carried out with 1,000 replications of heuristic search and simple taxon addition, with the all trees saved option.

The ML maximum-likelihood (ML) tree estimation was conducted with PHYML (Guindon and Gascuel, 2003), under appropriate model of nucleotide substitution, determined using the MODELTEST 3.06 program (Posada and Crandall, 1998). Reliability of the trees was tested using 1,000 bootstrap replications.

The neighbor-joining analysis (NJ – Saiton and Nei, 1987) was conducted under a ML model, with parameter settings estimated by MODELTEST, as described by Xiang *et al.* (2002) with 1,000 bootstrap replications.

Bayesian analyses (BI) of the data were performed using MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) to generate a posterior probability distribution using Markov chain Monte Carlo (MCMC) methods following Baker *et al.* (2003). We ran three independent analyses. No *a priori* assumptions about the topology of the tree were made and all searches were provided with a uniform prior. The models of DNA substitution used were those estimated by MODELTEST and used in the standard ML analyses. The MCMC processes were set so that four chains (one cold and three incrementally heated Markov chains) were run simultaneously for 1 million generations, with trees being sampled every 10 generations. Bayesian likelihoods reached at 500,000 generations (burn-in=5000). The values were established by empirical evaluation of tree likelihood scores and following Baker *et al.* (2003). To calculate the posterior probability of each bipartition, a 50% majority-rule consensus tree was constructed from the remaining trees using PAUP*

To detect the presence of character conflict between *cyt b* and RAG2 genes, the incongruence length difference (ILD) test was computed as described by Farris *et al.* (1994, 1995) and implemented in WINCLADA version 0.9.9+ (BETA) (Nixon, 2002). A subset of the individuals for which sequences from both data sets were available was combined into a single analysis.

The population genetics software package ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000) was used to examine patterns of mismatch distribution (Rogers, 1995) using

the observed number of differences between pairs of haplotypes, and the hierarchy analyses of genetic diversity of populations were carried out using AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992).

The haplotype data were subjected to a median joining analysis (Bandelt *et al.*, 1999) using the NETWORK 4.1 programme (www.fluxus-engineering.com) and the Tajima's D test (Tajima, 1989) was computed using the DnaSP software (Rozas *et al.*, 2003).

3. Results

3.1. Sequence data

Thirty-seven individuals were sequenced for the *cyt b* analysis, with 12 having the gene completely sequenced (1,140 bp). In order to obtain a similar representativeness among the different *Artibeus* species, a 761-bp fragment was chosen for the analysis of the 16 representative specimens within the range of the collection sites investigated. To this sample, 17 other selected sequences deposited in GenBank were added, performing a total of 33 *Artibeus* specimens analysed (Table 1).

The sequence analysis has revealed a significant guanine deficiency, specially in the 3rd position ($P < 0.01$). The values found for base frequencies (not shown) were similar to those observed by Pumo *et al.* (1998) for *Artibeus jamaicensis*.

For the RAG2 analysis, a 770-bp fragment from 37 *Artibeus* specimens (from 5 species) was sequenced, which were analysed together with other two species deposited in GenBank, thus totaling 39 individuals (Table 1). The RAG2 alleles showed an overall even pattern of base composition.

3.2. Phylogenetic analysis

In the *cyt b* analysis, considering exclusively the ingroup, the haplotypes were defined by 261 variable sites (41 of which corresponded to the first codon position, 21 to the second, and 199 to the third). In the maximum parsimony analysis (MP), the heuristic search of the *cyt b* data resulted in 84 most parsimonious trees with 629 evolutionary steps under a consistency index (CI) of 0.512 and a retention index (RI) of 0.661. Among these sites, 159 produced parsimony information, and in the strict-consensus tree (not shown) the bootstrap values varied between 55 - 100, with the tree generated by this analysis showing few polytomies.

The NJ, ML, and BI trees presented similar topologies. The Bayesian analysis (not shown) revealed nodes with posterior probability values between 58 – 100, yet with some polytomies. The tree obtained by the NJ method (not shown) using the MODELTEST parameters, though similar to the other trees, showed minor differences between some specific groups.

The model selected for the maximum-likelihood analysis using the MODELTEST was TrN+G and the gamma shape parameters of 0.2132 and the tree generated therefrom (Fig. 1a) presented considerably varied bootstrap values (between 18.2 and 100%). In this tree it is possible to observe *A. concolor* as the most basal taxon, followed by a clade composed of two sister groups performed by the species *Artibeus sp.* and *A. obscurus*. Next comes *A. fimbriatus* and, after, a set of heterogeneous taxa, *A. hirsutus*, *A. inopinatus*, *A. fraterculus*. Then *A. jamaicensis* is found after that, to which two sister groups join in, respectively formed by *A. lituratus* and *A. planirostris* plus *A. amplus*.

Fig 1 here

The RAG2 analysis (tree not shown), considering only the ingroup, revealed 70 variable sites with 12 corresponding to the first codon position, 10 to the second, and 48 to the third. In the MP analysis, the heuristic search data resulted in 54 most parsimonious trees with 67 steps, and with a CI of 0.940 and RI of 0.933. The number of informative characters for parsimony was 16 and in the

strict-consensus tree (not shown) the bootstrap values varied between 62 and 100. As regards the maximum likelihood analysis, the selected model using the MODELTEST was K80+G with gamma shape parameters estimated as 0.3311.

The MP, NJ, BI and ML analyses for RAG2 (not shown) revealed all trees to have the same topology, with several polytomies and lower bootstraps and posterior probability values for most branches. Nevertheless, in all trees generated, *A. lituratus* separates from the other species, but the gene did not prove its suitability to differentiate the other taxa from each other.

The saturation curve obtained (not shown) both for *cyt b* and RAG2 genes indicated that there is no clear evidence of multiple substitution (saturation) in any codon position; thus, there should be no loss of phylogenetic signal among the more divergent taxa (i.e., outgroup – ingroup) in the analysis.

To the combined analysis, two “small *Artibeus*” species — *Artibeus (Dermanura) cinereus* and *Enchisthenes hartii* - were also added to test the position taken by *A. concolor* in comparison to the small and large *Artibeus*. Concerning the combined phylogenetic analysis of the *cyt b* and RAG2 genes, the ILD test revealed that the amount of character conflict between both genes is not significant ($P = 0.8333$), therefore, the concatenated alignment of the data obtained has resulted in 1,531 characters analysed for five species belonging to our sample and two from GenBank, besides the four outgroups (listed in Table 1). In these analyses, (the combined dataset), 6,898 most parsimonious trees with 650 steps and 147 parsimony-informative characters were found (CI = 0.603; RI = 0.733). The model selected was TrN+I+G, with a gamma shape parameter of 1.1051.

All the trees generated (MP, NJ, ML, and BI) presented identical topology. One NJ tree is shown in Fig. 1b. By comparing the arrangements seen in this tree with those presented by *cyt b* gene in Fig. 1a (taking in account the difference in the number of taxa analysed), we observed that both genes produced the same main species clusters, namely: *A. fimbriatus* and *A. obscurus* (more basal), and *A. lituratus* and *A. planirostris* (more derived). *Artibeus (Dermanura) cinereus* was the most basal species, followed by *A. concolor*, while *Enchisthenes hartii* was found to be closer to *Sturnira* than to *Artibeus* (Fig. 1b).

3.3 Genetic diversity and population structure

The intraspecific genetic diversity and structure of populations were tested in two species, *A. lituratus* and *A. fimbriatus*, using 761-bp fragments of the mitochondrial gene *cyt b* and 770-bp fragments of the RAG2 gene.

Artibeus lituratus presented a high level of genetic diversity, with 13 different haplotypes in 14 individuals (Table 1) analysed from 8 localities, and an average genetic distance of 1.2% for *cyt b* gene (Table 2). These 13 haplotypes differ in only a few mutations (2 to 9) and the two individuals sharing a haplotype belonged one to the Cerrado biome and the other to the Atlantic Forest biome (haplotype 2, Table 1). As for *A. fimbriatus*, the species presented 7 different haplotypes in 7 individuals (Table 1) analysed (from 5 localities), and an average genetic distance of 0.7% for the *cyt b* gene (Table 2). In this situation, the haplotypes likewise differ but in few mutations (2 to 7). When a GenBank sequence from a specimen collected in the state São Paulo, Brazil, was added to the analysis, it exhibited a distinct haplotype, which differed from the nearest one in, at least, 38 mutations.

Table 2 here

The RAG2 data (not shown) were not informative, as although each of the species analysed showed a considerable genetic diversity (13 haplotypes in 18 *A. lituratus* individuals, and 6 haplotypes in 7 *A. fimbriatus* individuals), a high number of haplotypes was shared by the two species. This reveals that RAG2 does not afford the best results as an intrageneric marker.

The results of the mismatch analysis with *A. lituratus*, both for *cyt b* (Fig. 2a) and combined gene analysis (Fig. 2c), are in accordance with the sudden expansion model (Rogers, 1995), indicating that the species apparently is undergoing a population expansion process.

Fig 2 here

As regards *A. fimbriatus*, the histogram constructed with the *cyt b* analysis did not produce conclusive information (not shown); however, the combined gene analysis (Fig. 2b) produced results in accordance to the expansion model. However, when the São Paulo individual is added, the sample moved on to reveal a pattern suggestive of geographic subdivision (Fig. 2d). The results obtained by the Tajima neutrality test for *A. lituratus* and *A. fimbriatus* (Tajima's $D = -1.14456$ and $D = -1.51757$, respectively) also indicate expansion, in spite of the fact that the P values were not significant, an observation very likely explained by the small sample size.

The median-joining analysis conducted in Network has shown the absence of any type of haplotypes structuration, both for *A. lituratus* and *A. fimbriatus* (fig. 2e and 2f), with both graph exhibiting a star-like pattern.

A molecular variance analysis (AMOVA) was also carried out to test the hypothesis that the *A. lituratus* individuals collected in the Cerrado biome and in Atlantic rainforest biome belong to distinct populations yielded a non-significant value for F_{ST} ($P = 0.9765$). These results indicate that the *A. lituratus* is not geographically structured in populations.

4. Discussion

4.1. Phylogenetic analysis

In the present study, one mitochondrial gene (cytochrome *b*) and one nuclear gene (RAG2) were employed in an attempt to shed more light on the genetic relationships between bat species of the *Artibeus* genus, specially with the inclusion of Brazilian taxa so far under-sampled in previous molecular phylogenetic studies. By comparing the results obtained with the two genes individually, *cyt b* has shown high phylogenetic definition, whereas RAG2 failed to prove itself as an efficient marker. Our choice for this gene is explained by the

abundance of sequences available in GenBank, as the database has been intensively employed in phylogenetic and phylogeographic studies of several bat taxa (Baker *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2003; Hoffer *et al.*, 2003; Dávalos, 2005; Dávalos, 2006). In these investigations, the results obtained were, as a whole, useful in the elucidation of the relationships between upper taxonomic categories. Yet, in the present study, which addressed intrageneric relationships, RAG2 was but little efficient, probably due to the relatively recent emergence of the genus and also to the slower evolution of the marker.

Cyt *b*, in turn, has generated trees with well-resolved relationships, such as shown in Fig. 1a, in which *A. concolor* takes a more basal position. This species is found in a region stretching from the south of Colombia, Venezuela, the Guineas and north of Brazil, generally in moist environments (Eisenberg and Redford, 1999). Some controversy hovers around the classification of this species, as Owen (1991) assigned it to the *Koopmania* genus (which encompasses the small *Artibeus*), based on morphologic information. Other authors, nevertheless, consider *Koopmania* as an *Artibeus* sub-genus (Marques-Aguiar, 1994; Van den Bussche *et al.*, 1998; Simmons, 2005). Based on molecular analysis, other authors, on the other hand, propose that the *Koopmania (A.) concolor* should cluster with the other large *Artibeus* species, thus being pulled into the *Artibeus* genus (Lim *et al.*, 2004). It is important to observe that, irrespective of the systematic classification adopted, this taxon is always found at a more basal position in the phylogenies produced by all studies (morphologic investigations as Marques-Aguiar, 1994; molecular investigations, as Van den Bussche *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2004; and the present study). Such basal position is coupled to the fact that *A. concolor* has shown an average genetic distance of 10.3% in comparison to the other large *Artibeus* species analysed (minimum genetic distance 8.2% between *A. concolor* and *A. obscurus*; and maximum genetic distance 12.5% between *A. concolor* and *A. hirsutus*, Table 2). These data cast some doubt over the assignment of the taxon to the *Artibeus* genus, thus corroborating the proposal as emerged from the morphologic analyses. Although these genetic distance were the highest found in this analysis (in which the average distances between species were $\bar{x} = 10.3\%$), it is important to stress that such values are compatible with the

value put forth to describe intrageneric variation for bats (\bar{x} = 10.45%, ranging from 2.51% to 19.83%) as suggested by Bradley and Baker (2001). In the tree obtained with the combined gene data, *A. concolor* was shown to occupy a basal position.

Next in order comes *A. obscurus*, clustering with a still undescribed *Artibeus* species (*Artibeus* sp., whose specimens were collected in the Atlantic Forest biome and have initially been ranked as *A. aff. jamaicensis* by Althoff, 1996). The cluster obtained presents a considerable consistence within this tree and all other trees generated by the MP, NJ, ML, and BI analyses. This association with *A. obscurus* is confirmed also by the analysis of morphologic and cytogenetic data (Althoff, 1996). This taxon seems to be of restrict distribution, across the southern Atlantic Forest and has so far been trapped between parallels 26°55'S – 49°03'W and 27°18'S – 48°33' W. The interest in this association lies in the fact that the sister species to this taxon is *A. obscurus* which is widely distributed, occurring from Venezuela on the north, Guineas on the east, Colombia, Ecuador and Peru on the west, and moving on southwards, to southern Brazil along the Atlantic Forest (Marques-Aguiar, 1994; Taddei *et al.*, 1998; Simmons, 2005; and the present study). Both taxa differ in sequence divergence values between 3.2% and 4.3%, with an average value of 3.78%. Such number is above the average suggested by Bradley and Baker (2001) for bat intraspecific divergence, but falls within both the intraspecific divergence values (\bar{x} = 3, ranging from 0.09% to 8.7%) and between two sister species (\bar{x} = 6.8%, ranging from 2.50% to 16.42%). These results suggest that the two taxa may be separated into different taxonomic categories, intraspecific (subspecies, for instance) or specific. Bradley and Baker (2001) proposed that the low divergence values, as observed between *A. obscurus* and *Artibeus* sp., may be the effect of recent divergence times. It is likely, therefore, that *Artibeus* sp. represents a recent regional differentiation within the southern limit of the *A. obscurus* domain.

The more basal position in the tree as occupied by *A. obscurus* diverges from that found in other phylogenetic analyses in which the species is revealed as a more derived taxon of *Artibeus* (Marques-Aguiar, 1994; Van den Bussche *et al.*, 1998; Guerrero *et al.*, 2003, 2004; Lim *et al.*, 2004). Thus, the inclusion of

representative specimens collected in the species' southern domain in the present phylogenetic analysis seems to alter the relationships held by *A. obscurus* with the other species under the genus (Fig. 1a). The combined analysis of the two genes (Fig. 1b), nevertheless, places *A. obscurus* in a more intermediary position (50.9% bootstrap) and, also, as a sister species to *Artibeus* sp.

It is also observed that *A. obscurus* presents a strong geographic subdivision (with high bootstrap values) between the representatives (specimens collected in Surinam and French Guinea) of the northern South American territory and those of the Brazilian Cerrado (Fig. 1a). While the intra-group divergence values are small (2.8% and 0.8% genetic distances, respectively), the inter-group divergence figure is higher (3.9%), stressing the evidence of a likely incipient geographic differentiation. Perhaps this nominal taxon represents a higher taxonomic group (macro-species), as some degree of geographic structuration has also been reported by Ditchfield (2000) among the species inhabiting the South American and Atlantic Forest northern regions, and by Lim *et al.*, (2004), among the specimens of the east (Guineas), and west (Venezuela). The average divergence values found in both studies, 3.3% and 3.2%, respectively, among the geographic groups were very similar to those observed in our analysis.

After *A. obscurus*, appears, *A. fimbriatus* whose species formed a highly consistent cluster which occupied a relative baseline position in the tree (Fig.1a), a location observed also in the combined gene analysis (Fig. 1b). Such basal position of *A. fimbriatus* was in accordance with the morphology-based phylogeny described by Marques-Aguiar (1994) and with the molecular phylogenies depicted by Van den Bussche *et al.* (1998) and Lim *et al.*, (2004). *A. fimbriatus* occurs in several restricted areas in the eastern Brazilian regions, inhabiting the states of Bahia to Rio Grande do Sul, and also the Paraguayan territory with populations concentrated in some specific remaining areas of the Atlantic Forest, is more abundant in environments near the coasts (Taddei *et al.*, 1998). Marques-Aguiar (1994), taking into account that the species carries the smallest number of advanced characters in the genus *Artibeus*, considers *A. fimbriatus* a relict.

Next, an assemblage of three species is produced (*A. hirsutus*, *A. inopinatus*, and *A. fraterculus*). The same arrangement is also observed by

Marques-Aguiar (1994), Van den Bussche *et al.* (1998), Lim *et al.* (2004), and Guerrero *et al.* (2004). The three species are restricted to the arid regions of Central America (*A. hirsutus*, *A. inopinatus*), and northern South America, towards the Pacific Ocean (*A. fraterculus*) (Marques-Aguiar, 1994; Eisenberg and Redford, 1999). The proposal of Marques-Aguiar (1994) and by Van den Bussche *et al.* (1998) in which *A. hirsutus* and *A. inopinatus* would be sister species has been confirmed by our results (genetic distance 8.1%, *i.e.*, sister species level). Only *A. hirsutus* was investigated in the RAG2 gene analysis and it was placed at the base of the tree generated by the combined gene analysis (Fig. 2b).

The next node shows *A. jamaicensis*, a species considered to be a complex taxon that exhibits a morphological variability among populations that had led to the recognition of eight subspecies differing primarily in characters such as size, color, and number of upper molars. The geographic and morphometric patterns of these subspecies have never been clearly established, and the status of many of it has also been put to test (such is the case of *A. j. planirostris* and *A. j. triomylus*, Guerrero *et al.*, 2004). The intermediary position occupied by *A. jamaicensis* in the phylogenetic analysis we carried out has also been observed in the studies of Van den Bussche *et al.* (1998), Lim *et al.* (2004), and Guerrero *et al.* (2004).

Further on, a highly consistent clade is observed, including *A. lituratus* and *A. intermedius*. *A. lituratus* is one of largest species of the genus with the most far-reaching distribution span, occurring across the whole Neotropical American region (except for the Antilles) and electing moist areas and evergreen multistratal forests therein as preferred habitats. The species nevertheless tolerates man-made forest clearings and, together with *A. jamaicensis*, is among the most common species of *Artibeus*. *A. intermedius* has been suggested as a synonym to *A. lituratus* (Jones and Carter, 1976), and the fact that both taxa were arranged clustered reinforced this proposal. The very low average divergence values, as observed between *A. lituratus* and *A. intermedius* (between 0.8% and 3%, at intraspecific level, Table 2) are allied to this finding. Another interesting feature to be commented is that the species occupies a derived position, both in the *cyt b* tree (Fig. 1a) and in the combined gene tree (Fig. 1b) such topology has also been found by Marques-Aguiar (1994), Van den Bussche *et al.* (1998), and Lim *et al.*

(2004). Taddei *et al.* (1998), based on a morphometric study, also propose *A. lituratus* as one of the most derived species within the genus.

Lastly, a clade is formed by assembling two taxa (with over 90% bootstrap), which has at the base *A. amplus* and, as most derived species, *A. planirostris*. These species are large *Artibeus* that are similar in size and have an overlapping geographic distribution (Eisenberg and Redford, 1999). But, while *A. amplus* is restricted to open forest and forested areas nearby streams and other moist regions in the northern South America (Marques-Aguiar, 1994), *A. planirostris* spreads more broadly, from the southern Orinoco River to the southeastern South America (though without a delimited southern distribution threshold, as reported by Lim *et al.*, 2004). This more derived position shown in the tree generated by *cyt b* gene is also observed when both genes are analysed in combination (Fig. 1b).

In the past, Handley (1987) and Marques-Aguiar (1994), in extensive studies of the large *Artibeus* systematic, synonymized *A. planirostris* and *A. jamaicensis* (this species as senior-synonym), based on the phylogenetic analysis of morphologic data. In the present study, the *A. planirostris* specimens investigated were originated from the Cerrado biome, and clustered with this species' exemplars natural to the northern South American territory (Fig. 1a), suggesting that the individuals analysed belong to a large clade which includes representatives found from the Brazilian Cerrado to Venezuela. This mentioned clade, however, showed a subdivision (91.5% bootstrap), sorting out the Cerrado *A. planirostris* and the specimens from Central America and northern South America, suggesting a possible geographic structuration. The data obtained in the present study corroborate the Lim *et al.* (2004) proposal, in which *A. planirostris* and *A. jamaicensis* are held to be distinct species.

4.2. Genetic diversity and population structure

The genetic diversity and the possible geographic structure of populations has been investigated in two species, *A. lituratus* and *A. fimbriatus*, both with high genetic diversity and low divergence, but differing as regards the likely

structuration patterns.

Fourteen *A. lituratus* individuals were analysed, revealing 13 haplotypes, a level similar to that observed by Ditchfield and Burns (1998) and Ditchfield (2000), who reported 24 haplotypes in 36 individuals sequenced in a sample that included species of the genus collected from the southern Mexican territory to the southern Brazilian territory (a stretch of land covering round 8,000 km), as well as shared haplotypes observed between sampling sites distant as much as 3,200 km from one another. The average nucleotide divergence found was as little as 1.5%, similar to the 1.2% obtained with our sample. The results of the mismatch analyses, Tajima's neutrality test, AMOVA, and Network conformation suggest that, very likely, the shared haplotype here found for *A. lituratus* is in fact the result of the expansion of the species populations.

As regards *A. fimbriatus*, the analysis likewise indicates the population expansion (Fig. 2b), but when the São Paulo individual is added to the analysis, there seemed to emerge a geographic structure pattern for the species within the Atlantic Forest biome (Fig. 2d). A geographic divergence has also been reported in other Phyllostomidae species, such as *Glossophaga soricina*, *Sturnira lilium*, *Artibeus obscurus*, *A. cinereus*, *Trachops cirrhosus*, and *Carollia perspicillata* (Ditchfield, 2000). In the case of *A. fimbriatus* it is nonetheless necessary to expand sample sizes to characterize this population pattern accurately.

All in all, our findings corroborate the conclusions of Ditchfield (2003), who demonstrated that Brazilian bats undergo a low intraspecies phylogeographic structuration process. On the other hand, some of these species show a concomitantly higher geographic differentiation, in a larger scale, from Mexico to southern Brazil, or even in areas inside the Atlantic Forest biome. Such differentiations would correspond to the geographic patterns found also for rodents and other organisms, suggesting that the certain specific regions underwent an isolation process, drastic enough in intensity, to be visibly reflected in the genomes of several species, among which those of bats.

Acknowledgements

The authors are grateful to Drs. Denis Sana, Fernanda Trierveiler, Luiz Flamarion B. Oliveira, and Thales R.O. de Freitas for field work, to Gabriela Camargo, Luciano S. Silva, and Valéria C. Muschner for help in the Lab analysis and to Dr. Loreta B. de Freitas by several facilities provided.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the Organization of the American States (OAS) have supported this study.

References

- Althoff, S.L. 1996. Estudos taxonômicos e citogenéticos das espécies pertencentes ao gênero *Artibeus* (Mammalia, Chiroptera), ocorrentes na porção oriental da região sul do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná - UFPR. 126p.
- Anderson, S. and Yates, T. 2000. A new genus and species of phyllotine rodent from Bolivia. *Journal of Mammalogy*, 81:18-36.
- Baker, R.J., Porter, C.A., Patton, J.C., Van Den Bussche, R.A. 2000. Systematics of Bats of the Family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. *Occasional Papers of Texas Tech University Museum* 202:1-16.
- Baker, R.J., Hooper, S.R., Porter, C.A., Van Den Bussche, R.A. 2003. Diversification among New World Leaf-nosed bats: an evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. *Occasional Papers, Museum, Texas Tech University* 23:1-32.
- Bandelt, H.J., Forster, P. and Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16:37-48.
- Barquez, R.M., Giannini, N.P. and Mares, M.A. 1993. Guide to the bats of Argentina. Oklahoma: Oklahoma Museum of Natural History.

- Bradley, R.D. and Baker, R.J. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*,82:960-973.
- Davalos, L.M. 2005. Molecular phylogeny of funnel-eared bats (Chiroptera: Natalidae), with notes on biogeography and conservation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 91-103.
- Davalos, L.M. 2006. The geography of diversification in the mormoopids (Chiroptera: Mormoopidae). *Biological Journal of the Linnean Society*,88:101–118.
- Ditchfield, A.D. and Burns, K. 1998. DNA sequence reveal phylogeographic similarities of neotropical bats and birds. *Journal of Comparative Biology*,3:164-169.
- Ditchfield, A.D. 2000. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraespecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. *Molecular Ecology*,9:1307-1318.
- Ditchfield, A.D. 2003. Filogeografia e a Conservação de Espécies de Morcegos Neotropicais. *Divulgações do Museu de Ciências e Tecnologia UBEA/PUCRS, Publicações Especiais*,2:57.
- Eisenberg, J.F. and Redford, K.H. 1999. *Mammals of the Neotropics*, vol.3. Chicago: University of Chicago Press. 609p.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. and Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*,131:479-491.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. and Bult, C. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics*: 10:315–319.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. and Bult, C. 1995. Constructing a significance test for incongruence. *Systematics Biology*:44:570–572.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Guerrero, J. A., De Luna, E. and Sánchez-Hernández, C. 2003. Morphometrics in the quantification of character state identity for the assessment of primary homology: an analysis of character variation of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 80: 45–55.

- Guerrero, J.A., De Luna, E. González, D. 2004. Taxonomic status of *Artibeus jamaicensis triomylus* inferred from molecular and morphometric data. *Journal of Mammalogy*, 85(5):866–874.
- Guindon, S. and Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematics Biology*, 52:696–704.
- Handley, C.O. Jr, 1987. New species of mammals from Northern South America: fruit-eating bats, genus *Artibeus* Leach. *Fieldiana: Zoology*,39:163-172.
- Hoofer, S.R., Reeder, S.A., Hansen, E.W. and Van Den Bussche, R.A. 2003. Molecular Phylogenetics and taxonomic review of noctilionoid and vesperlilionoid bats (Chiroptera: Yangochiroptera) *Journal of Mammalogy*,84:809-821.
- Huelsenbeck, J and Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Department of Biology, New York: University of Rochester.
- Jones, J.K. Jr and Carter, D.C. 1976. Annotated checklist, with keys to subfamilies and genera. Part I. *In*: Baker, R.J., Jones, J.K. Jr, Carter, D.C *Biology of bats of the New world family Phyllostomatidae*. Special Publications the Museum, Texas Tech University Press:7-38.
- Koopman, K.F. 1993. Chiroptera. *In*: Wilson, D.E. and Reeder, D.M.(ed). *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 2^a ed. Washington: Smithsonian Institution Press, 2651:1-33.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment *Brief Bioinform* 5:150–163.
- Lim, B.K, Engstrom, M.D., Lee, T.E. Jr., Patton, J.C. and Bickham, J.W. 2004. Molecular differentiation of large species of fruit-eating bats (*Artibeus*) and phylogenetic relationships based on the cytochrome *b* gene. *Acta Chiropterologica*, 6:1-12.
- Marques-Aguiar, S.A. 1994. A systematic review of the large species of *Artibeus* Leach, 1821 (Mammalia: Chiroptera), with some phylogenetic inferences. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi (Zool.)*, 10:3-83.

- Medrano, J.F., Aasen, E. and Sharrow, L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*,8:43.
- Nicholas, K.B. and Nicholas, H.B. 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequences alignment. Distributed by author.
- Nixon, K.C. 2002. WinClada, Version 1.00.08. New York: Ithaca: Published by the author.
- Nowak, R.M. 1999. *Walker's Mammals of the World*. 6^a ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press. 1936p.
- Owen, R.D. 1991. The systematics status of *Dermanura concolor* (Peter, 1865) (Chiroptera: Phyllostomidae), with a description of a new genus. In: Griffiths, T.A. and Klingener, eds. *Contributions to Mammalogy in Honor of Karl E. Koopman*. p.18-25.
- Posada, D. and Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*,14:817-818.
- Pumo, D.E., Finamore, P.S., Franek, W.R., Phillips, C.J., Tarzani, S. and Balzarano, D. 1998. Complete mitochondrial genome of a neotropical fruit bat, *Artibeus jamaicensis*, and a new hypothesis of the relationships of bats to other eutherian mammals. *Journal of Molecular Evolution*,47:709-17.
- Rogers, A.R. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, 49: 608–615.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. and Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Rui, A.M. and Fabián, M.E. 1997. Quirópteros de la familia Phyllostomidae (Mammalia, Chiroptera) em selvas del estado de Rio Grande do Sul, Brasil. *Chiroptera Neotropical*, 3: 75-77.
- Rui, A.M. and Drehmer, C.J. 2004. Anomalias e variações fórmula dentária em morcegos do gênero *Artibeus* Leach (Chiroptera, Phyllostomidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 21 (3): 639–648.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 9:945-967.

- Schneider, S., Roessli, D. and Excofier, L. 2000. Arlequin: A software for populations genetics data analysis. Version 2000. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva.
- Simmons, N.B. 2005. Order Chiroptera. In: Wilson DE, Reeder DM, eds. Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference, third edition, vol 1. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 312-529.
- Smith, M. F. and Patton, J.L. 1993. Amazonian Phylogeography: mtDNA sequence variation in arboreal equimyd rodents (Caviomorpha). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2:243-255.
- Swofford, D. L. 2001. PAUP (Phylogenetic analysis using parsimony). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taddei, V.A., Nobile, C.A. Moreille-Versute, E. 1998. Distribuição geográfica e análise morfométrica comparativa em *Artibeus obscurus* (Schinz, 1821) e *Artibeus fimbriatus* Gray, 1838 (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae). *Ensaio: Ciência*, 2:49-70.
- Tavares, V. C., Gregorin, R. and Peracchi. A.L. *in press*. A diversidade de morcegos no Brasil: lista atualizada com comentários sobre distribuição e taxonomia. In: Pacheco, S.M, Marques, R.V., Esbérard. C.E.L. (eds.). *in press*. Morcegos no Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação. Pelotas:USEB.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24:4876-4882.
- Van den Bussche, R.A., Hudgeons, J.L. and Baker, R.J. 1998. Phylogenetic accuracy, stability, and congruence: relationships within and among the New World bat genera *Artibeus*, *Dermanura* and *Koopmania*, p. 59-71. In: T.H. Kunz and Racey P.A. (Eds). *Bat biology and conservation*. Washington, Smithsonian Institution Press, 365p.

- Xia, X and Xie. Z., 2001 DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92:371-373.
- Xiang, Q.-Y., Moody, M. L., Soltis, D. E., Fan, C. and Soltis, P. S. 2002. Relationships within Cornales and circumscription of *Cornaceae-matK* and *rbcL* sequence data and effects of outgroups and long branches. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24:35-57.
- Wetterer, A.L., Rockman, M.V., Simmons, N.B. 2000. Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes and restriction sites. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, New York, 248: 1-200.

APPENDIX

Access numbers (in parenthesis) of sequences corresponding to the voucher number, and next the collection site.

A. fimbriatus: FURB-SLA1104 (**DQ985478**, **DQ985528**), FURB-SLA468 (**DQ985479**, **DQ985510**), FURB-SLA969 (**DQ985477**, **DQ985526**) - Blumenau 26°55'S 49°03'W; FURB-SLA1013 (**DQ985527**), FURB-SLA739 (**DQ903820**, **DQ903835**) - Gaspar 26°55'S 48°57'W; FURB-SLA1580 (**DQ985476**, **DQ985533**) - Indaial 26°53'S 49°13'W; FURB-SLA930 (**DQ985500**, **DQ985525**)- Jacinto Machado 28°59'S 49°45'W; FURB-SLA1482 (**DQ985501**, **DQ985531**) - Jaraguá do Sul 26°29'S 49°04'W.

A. planirostris: AN1882 (**DQ985487**) – Palmeirante 07°51'S 47°55'W; MN36311 (**DQ985489**, **DQ985505**), MN36318 (**DQ985486**, **DQ985506**), MN36380 (**DQ985490**, **DQ985507**) - Colinas do Sul 14°09'S 48°04'W.

A. lituratus: MN36783 (**DQ985491**, **DQ985508**), MN36807 (**DQ985492**, **DQ985509**), MN36827 (**DQ985493**) - Colinas do Sul 14°09'S 48°04'W; FURB-SLA1110 (**DQ985485**, **DQ985529**) - Blumenau 26°55'S 49°03'W; FURB-SLA1575 (**DQ985532**) - Indaial 26°53'S 49°13'W; FURB-SLA581 (**DQ985484**, **DQ985511**), FURB-SLA641 (**DQ985494**, **DQ985512**), FURB-SLA657 (**DQ985495**, **DQ985513**) FURB-SLA754 (**DQ985496**, **DQ985516**), FURB-SLA756 (**DQ985517**) - Florianópolis 27°35'S 48°32'W; FURB-SLA924 (**DQ985499**, **DQ985524**) - Jacinto Machado 28°59'S 49°45'W; FURB-SLA884 (**DQ985483**, **DQ985520**), FURB-SLA889 (**DQ985521**), FURB-SLA890 (**DQ985480**, **DQ985522**) - Nova Veneza 28°38'S 49°29'52W; FURB-SLA822 (**DQ903819**, **DQ903837**); FURB-SLA844 (**DQ985519**) - Porto Belo 27°09'S 48°33'W; FURB-SLA922 (**DQ985523**) - Santa Rosa do Sul 29°08'S 49°42'W; FURB-SLA738 (**DQ985482**, **DQ985515**), FURB-SLA1113 (**DQ985530**) - Santo Amaro da Imperatriz 27°41'S 48°46'W; FURB-SLA658 (**DQ985481**, **DQ985514**) - Treze de Maio 28°33'S 49°08'W.

A. cf. obscurus: MN36263 (**DQ985488**, **DQ985504**), MN36388 (**DQ903818**, **DQ903836**) - Colinas do Sul 14°09'S 48°04'W; FURB-SLA841 (**DQ985498**) - Porto Belo 27°09'S 48°33'W.

Artibeus sp: FURB-SLA775 (**DQ985497**, **DQ985518**) - Gov. Celso Ramos 27°18'S 48°33'W, FURB-SLA1773 (**DQ985502**, **DQ985534**) FURB-SLA1835 (**DQ985503**, **DQ985535**), FURB-SLA1928 (**DQ985536**) FURB-SLA1928 (**DQ985537**) - Blumenau 26°55'S 49°03'W.

Table 1

Species (acronyms), collection sites, morphoclimatic domains, number of individuals, cytochrome *b* haplotypes found in this sample, and GenBank accession numbers of literature

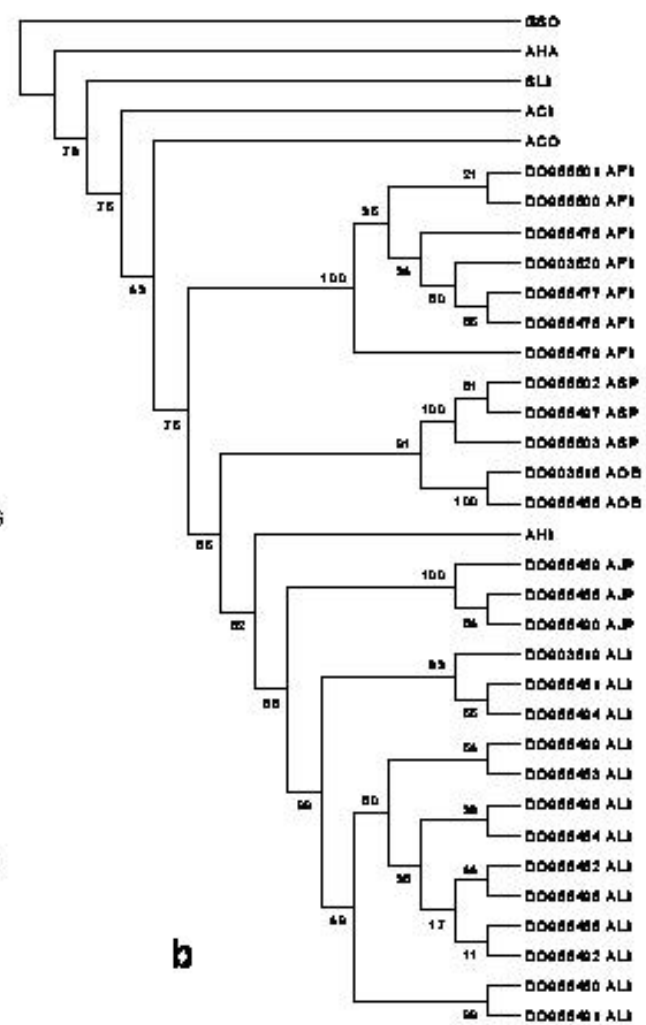
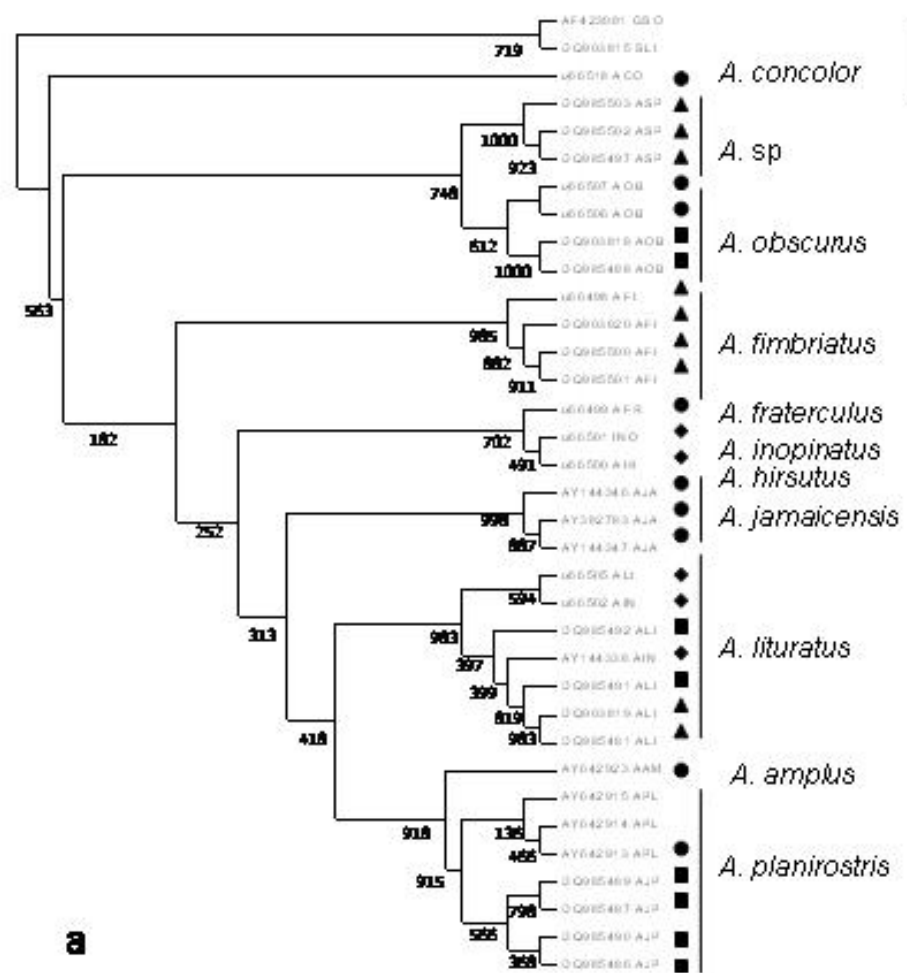
Species	Locality	Biomes	Number of individuals	Cyt <i>b</i> haplotypes
<i>A. fimbriatus</i> (AFI)*	Jaraguá do Sul (3)	Atlantic RF	1	1
<i>A. fimbriatus</i> (AFI)	Indaial (4)	Atlantic RF	1	2
<i>A. fimbriatus</i> (AFI) *	Gaspar (5)	Atlantic RF	2	3, -
<i>A. fimbriatus</i> (AFI)	Blumenau (6)	Atlantic RF	3	4, 5, 6
<i>A. fimbriatus</i> (AFI)*	Jacinto Machado (13)	Atlantic RF	1	7
<i>A. planirostris</i> (APL)*	Palmeirante (1)	Cerrado-Amazon**	1	1
<i>A. planirostris</i> (APL)*	Colinas do Sul (2)	Cerrado	3	2, 3, 4
<i>A. lituratus</i> (ALI)*	Colinas do Sul (2)	Cerrado	3	1, 2, 3
<i>A. lituratus</i> (ALI)	Blumenau (6)	Atlantic RF	1	4
<i>A. lituratus</i> (ALI) *	Porto Belo (7)	Atlantic RF	2	5, -
<i>A. lituratus</i> (ALI)	Florianópolis (9)	Atlantic RF	5	6, 7, 8, 9, -
<i>A. lituratus</i> (ALI)	Sto Amaro da Imperatriz (10)	Atlantic RF	2	2, -
<i>A. lituratus</i> (ALI)*	Treze de Maio (11)	Atlantic RF	1	10
<i>A. lituratus</i> (ALI)	Nova Veneza (12)	Atlantic RF	3	11, 12, 13
<i>A. lituratus</i> (ALI)	Jacinto Machado (13)	Atlantic RF	1	13
<i>A. lituratus</i> (ALI)	Santa Rosa do Sul (14)	Atlantic RF	1	-
<i>A. cf obscurus</i> (AOB)*	Colinas do Sul (2)	Cerrado	2	1, 2
<i>A. obscurus</i> (AOB)	Porto Belo (7)	Atlantic RF	1	3
<i>Artibeus</i> . sp. (ASP)*	Blumenau (6)	Atlantic RF	4	1, 2, -
<i>A. aff jamaicensis</i> (ASP)*	Gov. Celso Ramos (8)	Atlantic RF	1	1
GENBANK				
Species	Locality	GenBank Accession No.		
		Cyt <i>b</i>	RAG2	
<i>A. amplus</i> (AAM) *	Venezuela, Pozon	<u>AY642923^a</u>		
<i>A. concolor</i> (ACO) *	Suriname,	<u>U66518^b</u>		
<i>A. concolor</i> (ACO)			<u>AF316432^a</u>	
<i>A. fimbriatus</i> (AFI) *	Brazil, São Paulo	<u>U66498^b</u>		
<i>A. fraterculus</i> (AFR) *	Peru	<u>U66499^b</u>		
<i>A. hirsutus</i> (AHI) *	Mexico	<u>U66500^b</u>		
<i>A. inopinatus</i> (INO) *	Honduras	<u>U66501^b</u>		
<i>A. intermedius</i> (AIN) *	Mexico	<u>AY144338^c</u>		
<i>A. intermedius</i> (AIN) *	Costa Rica, Guanacaste	<u>U66502^b</u>		
<i>A. jamaicensis</i> (AJA) *		<u>AY144346^c</u>		
<i>A. jamaicensis</i> (AJA) *	Panama	<u>AY144347^c</u>		
<i>A. jamaicensis</i> (AJA) *	Honduras	<u>AY382783^c</u>		
<i>A. lituratus</i> (ALI) *	Trinidad	<u>U66505^b</u>		
<i>A. obscurus</i> (AOB) *	Suriname	<u>U66506^b</u>		
<i>A. obscurus</i> (AOB) *	French Guiana	<u>U66507^b</u>		
<i>A. planirostris</i> (APL) *	Venezuela, Pozon	<u>AY642913^a</u>		
<i>A. planirostris</i> (APL) *		<u>AY642914^a</u>		
<i>A. planirostris</i> (APL) *		<u>AY642915^a</u>		
OUTGROUPS				
<i>Glossophaga soricina</i> (GSO)		<u>AF423081^d</u>		
<i>Glossophaga soricina</i> (GSO)			<u>AF316452ⁱ</u>	
<i>Sturnira lillium</i> (SLI)	Colinas do Sul (2)	<u>DQ903815^e</u>	<u>AF316488ⁱ</u>	
<i>Sturnira tildae</i> (STI)	Sto Amaro da Imperatriz (10)	<u>DQ903816^e</u>	<u>DQ903847^d</u>	
<i>Artibeus (dermanura) cinereus</i> (DCI)		<u>U66511^b</u>	<u>AF316443^f</u>	
<i>Enchisthene hartii</i> (EHA)		<u>U66517^b</u>	<u>AF316449ⁱ</u>	

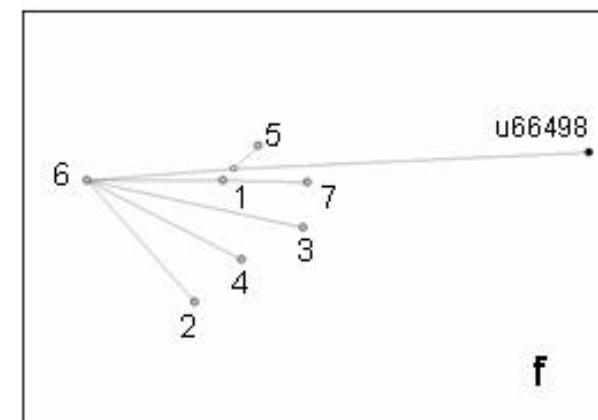
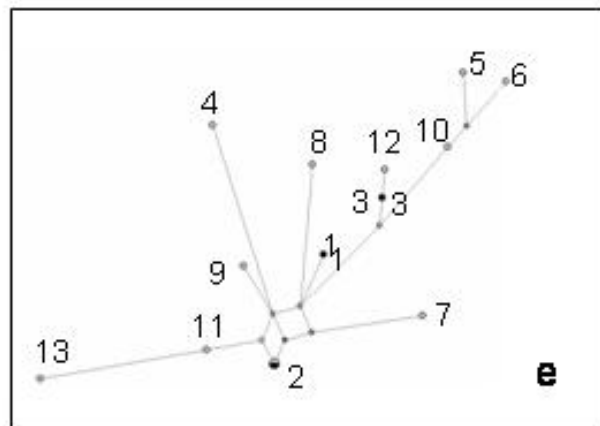
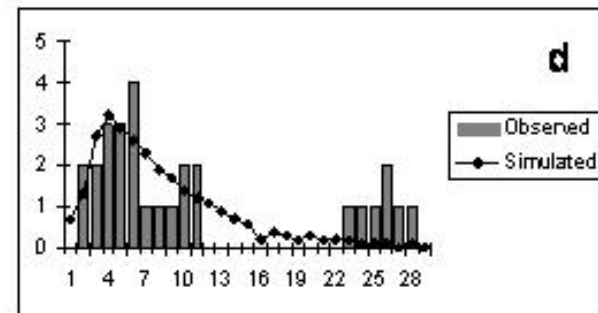
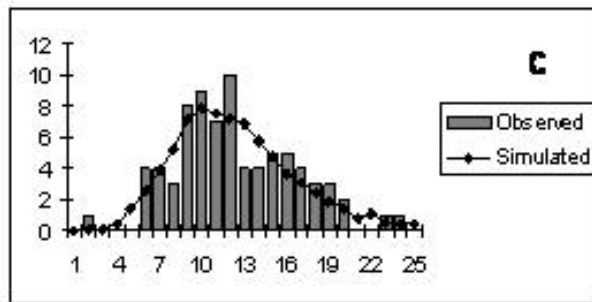
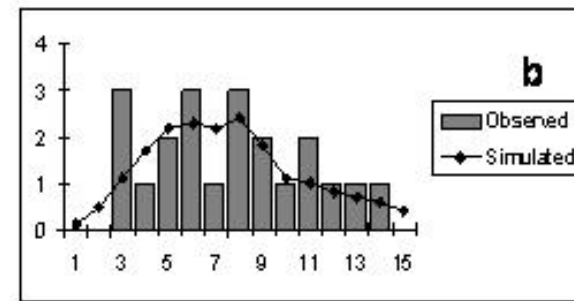
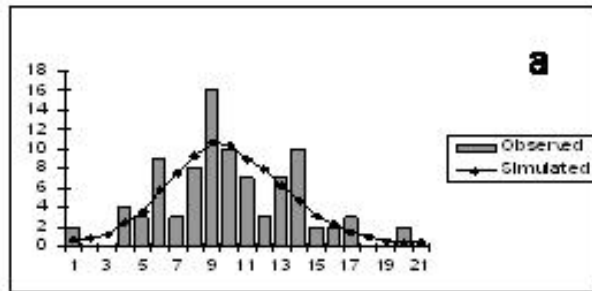
*Individuals included in the phylogenetic analyses with cyt *b*; **Cerrado-Amazon transition; ^aLim *et al.* (2004); ^bVan Den Bussche *et al.*(1998); ^cGuerrero *et al.* (2004); ^dDávalos and Jansa (2004); ^eFreygang *et al.* (unpublished); ^fBaker *et al.*(2000); - Cyt *b* sequence absent.

Figure Legends

Figure 1a: Maximum Likelihood tree for cytochrome b gene. Likelihood settings from best-fit model (TrN+G) selected by hLRT: Lset Base=(0.2908 0.3014 0.1296) Nst=6 Rmat=(1.0000 4.1839 1.0000 1.0000 16.3966) Rates=gamma Shape=0.2132 Pinvar=0. Numbers above branches are bootstraps values. ■ Cerrado ▲ Atlantic Rainforest ● northern South America ◆ Central America. 1b. Neighbor-Joining analysis tree for combined analyses of *cyt b* and RAG2 genes under ML parameters. Likelihood settings from best-fit model (TrN+I+G), gamma shape=1.3359 and Pinvar=0.6767. Numbers above branches are bootstraps values.

Fig 2a: Mismatch distributions of *Artibeus lituratus* of *cyt b* gene. The histogram shows the observed distribution of pairwise differences between the individuals of analysed populations. The line shows the expected distribution for a growing population under the sudden expansion model. The x-axis refers to the number of differences between pairs of haplotypes; the y-axis shows the observed/expected occurrence of each pairwise difference. 2b: Mismatch distributions of *Artibeus lituratus* of *cyt b* + RAG2 genes. 2c: Mismatch distributions of *Artibeus fimbriatus*. 2d: Mismatch distributions of *Artibeus fimbriatus* of *cyt b* + RAG2 genes. 2e: Median-joining network for mitochondrial *cyt b* haplotypes of *Artibeus lituratus*. Gray circles represent Atlantic Forest haplotypes; black circles represent Cerrado haplotypes; hollow circles represent haplotypes not sampled or that have become extinct. Correspond to the haplotypes listed in Table 1. 2f: Median-joining network for mitochondrial *cyt b* haplotypes of *Artibeus fimbriatus*.





Artigo 2

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF STENODERMATINAE BATS FROM
CERRADO AND ATLANTIC RAINFOREST BIOMES BASED ON MITOCHONDRIAL
AND NUCLEAR DNA

Artigo submetido à revista Acta Chiropterologica

Cristina Claumann Freygang¹, Sérgio L. Althoff²; Ana Leticia Pereira³ &
Margarete Suñé Mattevi^{1-3 *}

¹*Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*

²*Universidade Regional de Blumenau. Caixa Postal 1507, CEP 89010971, Blumenau, Santa Catarina, Brazil*

³*Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Av. Farroupilha, nº 8001, CEP 92450-900, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil.*

*Corresponding author: Fax and Phone: 55 (51) 33113386

E-mail address: crisfreygang@yahoo.com.br

Keywords: Chiroptera, Stenodermatinae, phylogeny, cytochrome b; RAG2; Cerrado; Atlantic rainforest

Running Title: DNA PHYLOGENETIC ANALYSIS OF STENODERMATINAE BATS FROM DIFFERENT BIOMES

Abstract

In this article, we investigate the manner in which the different groupings amongst the Stenodermatinae are formed by analyzing the relationships between their genes based on the sequences of the mitochondrial cytochrome b and the nuclear RAG2 of species representative of the Brazilian Atlantic Rainforest and Cerrado biomes, regions which have been but little sampled in other phylogenetic analyses. The study involves the analysis of 27 sequences, 13 of the cytochrome b and 14 of the RAG2 genes in 9 species of 6 genera collected in 6 sites in an area located between 14° to 27°S and 47° to 49°W. These species were grouped with another 32 species obtained from the Genbank. The various analyses performed demonstrated that this sub-family includes bats of the Sturnirini and Stenodermatini tribes and that this, in turn, was subdivided into two sub-groups corresponding to the Stenodermatini (sub-tribe Vampyressina) and to the Mesostenodermatinae tribe. This latter is further sub-divided in two sub-tribes, Artibeina and Stenodermatina. These results indicate that the inclusion of representatives from the South of the Neotropical Region shows the same clades found in the phylograms already described, but the clusters generated do not fall in the same ranks as are proposed in these analyses.

1. Introduction

The subfamily Stenodermatinae belongs to the Phyllostomidae family of Neotropical bats which is found widely distributed from Arizona (USA) and Mexico to Argentina, (Simmons, 2005). The morphological characteristics include small ears, a medium sized nose-leaf and short, broad jaws. Species frequently bear white stripes on the face or on the back. They are fruit eaters and because of their fruit-based diet, the bats of the Stenodermatinae sub-family are considered some of the most important seed dispersers essential for the regeneration of forests and the colonization of new areas by plants (Altringham, 1996).

Cytogenetic studies of the majority of the Stenodermatinae have demonstrated a marked intra and interspecific karyotype stability, and the *Artibeus* (with $2n=30/31$) genus is considered to be the carrier of the primitive karyotype of this sub-family (Silva *et al.*, 2005).

Stenodermatinae comprises 18 genera (Simmons, 2005) grouped at first by Gervais, 1856 within the Stenodermina tribe, and later ranked in the sub-family category (Stenodermatinae) by Miller (1907) (the taxon may also be referred to as Stenoderminae - Vieira, 1942). Some few genera, such as *Artibeus*, *Chiroderma*, *Platyrrhinus*, *Sturnira* and *Vampyressa* comprise almost half the existing species while many other genera are monotypics.

Several of the members of this sub-family are considered problematical and many genera need revision – for example, *Artibeus*, *Dermanura*, *Chiroderma*, *Mesophylla*, *Platyrrhinus* and *Vampyressa*. Also, the relationships between the genera are obscure (Gregorin and Tavares, *in press*). *Sturnira*, for instance, is a problematic taxon that has both been included in its own sub-family, (Sturnirinae, Miller, 1907) or transferred as a tribe into the sub-family Stenodermatinae (Wetterer *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2003).

Based on molecular analyses, Baker *et al.* (2003) demonstrated that the Stenodermatinae is monophyletic. Owen (1987, 1991) and Lim (1993), using craniodental characters, analyzed the phylogenetic relationships amongst the species of the sub-family, emphasizing those between the *Artibeus*, *Dermanura* and *Koopmania* genera. On the other hand, Koopman (1993) in his revision, considered Stenodermatinae as being made up of two tribes, (i) Sturnirini (with the *Corvira* and *Sturnira* genera only) and (ii) Stenodermatini with the remaining 16 genera. Wetterer *et al.* (2000) proposed, within the Stenodermatinae, the same two tribes, (Sturnirini and Stenodermatini) previously described by Koopman (1993), but differently to this author, made a subdivision of this last tribe into 2 sub-tribes, Stenodermina and Ectophyllina, with the first proven to be monophyletic (Wetterer *et al.*, 2000). In turn, Baker *et al.* (2003), using the sequences of the mitochondrial cytochrome b and nuclear RAG2 genes, divide the Stenodermatinae into three tribes, Sturnirini,

Sternodermatini, and Mesostenodermatini (the last including also the Enchisthenina, Ectophyllina, Artibeina and Stenodermatina sub-tribes). Simmons (2005), in a recent revision, considers only two tribes, joining Stenodermatini and Mesostenodermatini in the Sternodermatini tribe, without their subdivisions, which would include the genera *Ametrida*, *Ardops*, *Ariteus*, *Artibeus*, *Centurio*, *Chiroderma*, *Ectophylla*, *Enchistenes*, *Mesophylla*, *Phyllops*, *Platyrrhinus*, *Pygoderma*, *Sphaeronycteris*, *Stenoderma*, *Uroderma*, *Vampyressa*, and *Vampyrodes*.

In this article, we investigate the manner in which the different groupings amongst the Stenodermatinae are formed by analyzing the relationships between their genera based on the sequences of the mitochondrial cytochrome b and the nuclear RAG2 genes of species representative of the Brazilian Atlantic Rainforest and Cerrado biomes, regions which have been but little sampled in other phylogenetic analyses.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

The sample consists of 28 sequences, 13 of *cyt b* gene and 14 of RAG2 gene of 9 species from 6 genera trapped in 6 sites located in an area ranging from 14° to 27°S and 47° to 49°W, in two morphoclimatic domains of the Brazilian territory (Table 1). These species were grouped with other 32 sequences obtained from GenBank. The skins and skulls of these specimens are stored in the Mammals Collection of Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Santa Catarina and Mammals Collection of the Museu Nacional, Rio de Janeiro, Brazil.

Table 1 here

The sequences of two microchiroptera taxa, *Glossophaga soricina* and *Rhinophylla pumilio* were included as outgroups. The choice of the outgroups was based on phylogenetics relationships of these taxa with the sub-family Stenodermatinae, as evidenced in Baker *et al.* (2003).

2.2. Nucleotide acid sequence analysis

DNA was extracted from kidney, liver, heart or muscle (stored at -20°C or in ethanol 70% purity) using the standard protocol described in Medrano *et al.* (1990). The mitochondrial cytochrome *b* gene (hereafter cyt *b*) sequences were isolated via polymerase chain reaction (PCR) using the primers MVZ05, MVZ23 (light-strand), MVZ16 (heavy-strand) suggested by Smith and Patton (1993), and MUS15398 (heavy-strand) suggested by Anderson and Yates (2000). PCR reaction were run in a total volume of 25 μl containing: 10x PCR buffer, 2,6mM of MgCl_2 , 0,56 μM of dNTP, 0,2 μM of each primer, 1 unit of Taq polymerase, and 1-2 μl of template DNA. Reaction conditions were as follows: Initial denaturation (92°C – 5min); followed by 5 cycles in Touchdown (denaturation: 92°C - 1 min; annealing temperature step-downs every cycle 1°C from 50°C to 46°C - 1 min; extension: 72°C - 1 min). The annealing temperature for the final 35 cycles was 46°C with denaturation and extension phases as above. Final extension: 72°C – 10 min. Each round of PCR reactions also included one negative control to check for contamination.

For the amplification of nuclear recombination activating gene (hereafter RAG2), the primers RAG2F1 (light-strand), RAG2F2 (heavy-strand) suggested by Baker *et al.*, (2000) were used. PCR reactions were run in a total volume of 25 μl containing: 10x PCR buffer, 2,6mM of MgCl_2 , 1,12 μM de dNTP, 0,32 μM of each primer, 1 unit of Taq polymerase, and 1-2 μl of template DNA. Reaction conditions were as follows: Initial denaturation (92°C – 5min); followed by 35 cycles (denaturation: 92°C – 60s; annealing temperature 60°C – 45s; extension: 72°C –

90s). Final extension: 72°C – 10 min. Each round of PCR reactions also included one negative control to check for contamination

PCR products were purified with exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase (Amersham Biosciences). All taxa were sequenced directly from purified PCR products using the primers cited above and the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Sequencing of both strands was carried out using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). All sequences are available in GenBank as displayed in Table 1.

2.3. Data analysis

The sequences obtained were read employing the Chromas 1.45 program, aligned using the Clustal X 1.81 program (Thompson *et al.*, 1997) under the default setting costs and manually refined with the aid of the Genedoc (Nicholas and Nicholas, 1997). Saturation plots were obtained with Data Analysis in Molecular Biology and Evolution software (DAMBE; Xia and Xie, 2001). The composition of bases was accomplished by the use of Molecular Evolution Genetics Analysis software -MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004).

The phylogenetic analyses were performed using the maximum parsimony (MP) algorithm obtainable in PAUP*, version 4.0b10 (Swofford, 2001) by heuristic search with tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping, the MULPARS option, and 100 random-addition replicates. Bootstrap statistical support (Felsenstein, 1985) was carried out with 1,000 replications of heuristic search and simple taxon addition, with the all trees saved option.

The ML maximum-likelihood (ML) tree estimation was conducted with PHYML (Guindon and Gascuel, 2003), under appropriate model of nucleotide substitution, determined using the MODELTEST 3.06 program (Posada and Crandall, 1998). Reliability of the trees was tested using 1,000 bootstrap replications.

The neighbor-joining analysis (NJ – Saiton and Nei, 1987) was conducted under a ML model, with parameter settings estimated by MODELTEST, as described by Xiang *et al.* (2002) with 1,000 bootstrap replications.

Bayesian analyses (BI) of the data were performed using MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) to generate a posterior probability distribution using Markov chain Monte Carlo (MCMC) methods following Baker *et al.* (2003). We ran three independent analyses. No a priori assumptions about the topology of the tree were made and all searches were provided with a uniform prior. The models of DNA substitution used were those estimated by MODELTEST and used in the standard ML analyses. The MCMC processes were set so that four chains (one cold and three incrementally heated Markov chains) were run simultaneously for 1 million generations, with trees being sampled every 10 generations. Bayesian likelihoods reached 500,000 generations (burn-in=5000). The values were established by empirical evaluation of tree likelihood scores and following Baker *et al.* (2003). To calculate the posterior probability of each bipartition, a 50% majority-rule consensus tree was constructed from the remaining trees using PAUP*.

To detect the presence of character conflict between *cyt b* and RAG2 genes incongruence length difference (ILD) test was computed as described by Farris *et al.* (1994, 1995) and implemented in WINCLADA version 0.9.9+ (BETA) (Nixon, 2002). A subset of the individuals for which sequences from both data sets were available was combined into a single analysis.

3. Results

3.1. Sequence data

For the *cyt b* gene, 13 individuals were sequenced. To this sample, 15 other selected sequences deposited in GenBank were added plus 3 outgroups, making up the total of 31 specimens analyzed (Table 1). A fragment of 731 bp was chosen for

the analysis. Considering only the ingroup, 289 variable sites were observed, with 50 corresponding to the first codon position, 15 to the second, and 224 to the third position.

In the case of the nuclear RAG2 gene, 791pb were sequenced in 14 samples, together with another 8 from the GenBank plus 2 outgroups (Table 1). In the analysis of the ingroup alone, 113 variable sites were found of which 19 corresponded to the first codon position, 8 to the second, and 86 to the third position.

For both genes, the saturation curve obtained (not shown) indicated that there is no clear evidence of multiple substitution (saturation) in any codon position, and thus there should be no loss of phylogenetic signal among the more divergent taxa in this analysis.

In the combined analysis of the *cyt b* and RAG2 genes, 12 exemplars from 8 species were used, as well as 9 sequences from the GenBank and 2 outgroups.

3.2. *Phylogenetic Analysis*

In the maximum-parsimony (MP) analysis, performed with the mitochondrial gene *cyt b*, the heuristic search resulted in 3 most-parsimonious trees of 1,200 evolutionary steps with a consistency index (CI) of 0.352 and a retention index (RI) of 0.557. In this analysis, 246 sites were informative for parsimony and in the strict-consensus tree (not shown) the bootstrap values varied between 53 and 100, and the tree generated by this analysis presented many polytomies.

For the remaining analyses, the model selected by MODELTEST was GTR+I+G with a gamma shape of 1.0317. The trees resulting from the *cyt b* analysis (not shown) were not well-resolved, presenting contradictory relationships in the different analyses.

Concerning the RAG2, the number of characters that produced information for the parsimony analysis was 54. In the MP analysis, the heuristic search of RAG2 data

resulted in 2 most parsimonious trees with 154 steps, with a CI = 0.792 and an RI = 0.851. K80+G with a gamma shape =0.0845 was the model selected.

In the phylogenetic analysis of the *cyt b* and RAG2 genes combined, the ILD test revealed that the amount of character conflict between both genes is not significant ($P=0.1667$), therefore the combined alignments resulted in 1,502 characters analyzed for the 9 species belonging to our sample, plus 8 from those from the GenBank, in addition to 2 outgroups (listed in Table 1). In the MP analysis, the combined data set generated 7 most-parsimonious trees of 1,073 steps with 271 parsimony-informative characters, a CI of 0,459 and a RI of 0,591. As regards the maximum likelihood analysis, the selected model using the MODELTEST was GTR+I+G with gamma shape parameters estimated as 0.2266.

Both in the RAG2 analysis and in the combined analysis of the two genes, all the trees (not shown) generated (MP, NJ, and BI for RAG2 and MP, NJ, and ML for the concatenated analysis) presented the same topology with high indices of consistency. The trees resulting from the ML analysis of the RAG2 gene and the BI of the concatenated genes are shown in Figure 1A and Figure 1B, respectively. In these figures, a clade can be observed at the base of the tree formed by the species of the *Sturnira* genus (bootstrap of 99.7% – Fig. 1A and posterior probability of 98% - Fig. 1B). Another group follows made up of an assemblage of genera: *Chiroderma*, *Uroderma*, *Platyrrinus* and *Vampiressa* (bootstrap de 76.6% – Fig. 1A, and posterior probability of 100% - Fig. 1B). The *Enchisthenes hartii* species is located in the next branch (94.9% bootstrap – Fig. 1A and 100% posterior probability - Fig. 1B) and, finally, a grouping formed by the species of the genera *Artibeus*, *Ametrida*, *Pygoderma*, *Sphaeronycteris*, *Stenoderma* and *Phyllops* can be observed. In the latter, a subdivision has occurred separating *Artibeus* from the other genera (75.3% bootstrap – see Fig. 1A, and 52% of posterior probability – see Fig. 1B).

Fig. 1 here

4. Discussion

The results obtained by the analyses of the *cyt b* gene did not show a good resolution in the discrimination of the relationships between the taxa studied, probably because of saturation of some types of mutations, a fact that was observed also by Baker *et al.* (2000) in analyses of some genera of Phyllostomidae. RAG2, on the contrary, showed good phylogenetic resolution and for this reason, the discussion of the main findings that we detected in Stenodermatinae will be based on this gene and its combination with *cyt b* gene.

In our data, both the analysis of the RAG2 gene and the concatenate analysis of the *cyt b* and RAG2 genes showed three principal branches (Fig. 1A and Fig. 1B).

One of these branches is characterized by having only one genus - *Sturnira*. These are predominately fruit-eating bats feeding principally on plants of the *Solanum* genus although they will also eat fruit from other genera, such as *Ficus*, *Piper* and *Cecropia* (Müller and Reis, 1992). Their species can be found from Mexico to northern Argentina and Uruguay (Eisenberg and Redford, 1999). *Sturnira* is a polytypic genus, which, in Brazil, presents 4 species (Simmons, 2005; Peracchi *et al.*, 2006). Two of them are included in this analysis - *Sturnira lillium* (E. Geoffroy, 1810) with samples from the Cerrado and Atlantic Rainforest and *Sturnira tildae* de la Torre, 1959, with representatives from Atlantic Rainforest. Analysis of the RAG2 gene alone could not distinguish between the *Sturnira* species but this was not the case in the combined analysis where the *Sturnira lillium* exemplars were grouped in a branch having *Sturnira tildae* as a base.

In the past, the clade grouping the *Sturnira* species has often been re-ranked, (i) in its own sub-family (Sturnirinae, Miller, 1907); (ii) as a member of the Stenodermatini tribe - Sturnirina subtribe (McKenna and Bell, 1997); or (iii) simply as a member of Stenodermatinae (Jones *et al.*, 2002). Our data, by the strong consistency presented (99.7% bootstrap – Fig. 1A, and posterior probability of 98% - Fig. 1B) indicated a tribal status (Sturnirini) within the Stenodermatinae sub-family for this taxon. This position was also found in recent molecular data generated by other

investigators (Wetterer *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2003). It is important to note that, in all the molecular analyses performed to date, *Sturnira* always occupies a basal position in relation to the other Stenodermatinae.

The next clade includes several genera such as *Chiroderma*, *Platyrrhinus*, *Uroderma*, *Vampyressa* and *Vampyrodes* (Fig. 1A and 1B) and is classified by Baker *et al.* (2003) as of the sub-tribe Vampyressina of the Stenodermatini tribe. Vampyressine bats comprise approximately 29 species of the phyllostomid genera *Chiroderma*, *Mesophylla*, *Platyrrhinus*, *Uroderma*, *Vampyressa*, *Vampyriscus*, and *Vampyrodes* (Hofer and Baker, 2006).

The genera of this clade exhibit one white line down the center of the back as the main morphologic characteristic they have in common. Additionally, morphologically, *Ectophylla alba* (not included in this analysis) shares close affinities with *Mesophylla macconnelli*, and also has been recognized as part of the Vampyressines (Wetterer *et al.*, 2000) whereas nearly all molecular studies suggest a sister relationship between *Mesophylla* and *Vampyressa*, and a distant relationship for *Ectophylla* (Porter & Baker, 2004; Hofer and Baker, 2006; Peracchi *et al.*, 2006). Furthermore, questions also exist about the monophyly and rank status of *Vampyressa* and *Vampyriscus*, and their relationships with the remaining species.

Several alternative relationships have been proposed for vampyressine bats (Owen, 1987; Koopman, 1994; Wetterer *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2003), perhaps reflecting a rapid and contemporaneous radiation among these fruit-eating specialists. Comparing the trees generated by the RAG2 gene alone and the combined *cyt b* and RAG2 genes, it can be observed that, in stand-alone RAG2, *Chiroderma* is the most basal taxon while by the combined analysis of the two genes, this position is occupied by *Uroderma*. Only in this analysis also are the *Vampyressa* exemplars discriminated from those of *Platyrrhinus* (with posterior probability of 91% - Fig. 1B).

A branch represented by *Enchisthenes hartii* (Fig. 1A and 1B) follows. This is a monotypic genus considered by Koopman (1993) as a sub-genus of *Artibeus*, but lately treated as a separate genus (Wetterer *et al.*, 2000; Simmons, 2005). Its distribution is limited at North in Tucson, Arizona, USA, being found in Michoacan,

Jalisco, and Tamaulipas in México, to Trinidad, Bolívia and Venezuela (Simmons, 2005). Lately, this species was related in the State of Rondônia, Brazil (Peracchi *et al.*, 2006).

The next clade includes two sister-groups, (denominated in the Baker *et al.*, 2003, classification as sub-tribe Artibeina and sub-tribe Stenodermatina – both belonging to the Mesostenodermatini tribe). The first contains two subgenera, (*Artibeus* and *Dermanura*) belonging to the *Artibeus* genus Leach, 1821, an heterogeneous group of taxa formed by bats which feed preferentially on fruit, but which can also consume pollen, nectar, flower parts and insects (Barquez *et al.*, 1993). The Artibeina spread from Mexico to northern Argentina (Eisenberg and Redford, 1999), and some of the species of this group are among the most common and abundant phyllostomids in Neotropical communities (Rui and Fabián 1997).

The systematic of the *Artibeus* genera still raises much controversy, many times due to a lack of adequate information on the geographic distribution and variation of the different taxa, causing many authors referring exemplars incorrectly classified (Taddei *et al.*, 1998). In this grouping we find *Artibeus* (*Dermanura*) *cinereus* to be the most basal and the species of the sub-genera *Artibeus* (*Artibeus fimbriatus*, *A. cf. obscurus* e *A. lituratus*) as the most derived. Analyzing this sub-genera separately, and taking into account the data obtained with the RAG2 gene only (Fig. 1A), we find that *A. obscurus* is the most basal species, although in the combined gene tree, *A. fimbriatus* takes up the most basal position of the three species (Fig. 1B). This last result is in agreement with the relationships found by Marques-Aguiar (1994), Van den Bussche *et al.* (1998) and Lim *et al.* (2004).

The sister-group includes the stenodermatine frugivorous bats known popularly as "short-faced" due to extreme antero-posterior cranial compression. Included in this assemblage are the monotypic genera *Ametrida centurio*, *Pygoderma bilabiatum*, *Sphaeronycteris toxophyllum* and *Stenoderma rufum* and one genus (*Phyllops*) with two representatives: *P. falcatus* and a fossil species, *P. vetus*. In this clade there is also a subdivision (with 100% bootstrap – Fig. 1A, and 100% of posterior probability – Fig 1B), separating the two genera endemic of the Minor Antilles (*Phyllops* and

Stenoderma) from the other genera having continental distribution, occurring between South and/or Central America. The relationships between the *Ametrida*, *Pygoderma* and *Sphaeronycteris* taxa present differences in the two trees. Very little is known about the natural and evolutionary history of these taxa that only recently were considered, together with *Ardops nichollsi*, *Ariteus flavescens*, and *Centurio senex*, as belonging to the same tribe, based on evidence about the monophyly of the group.

The molecular studies we carried out, which gave greater emphasis to the inclusion of the Stenodermatinae taxa from the Southern portion of the Neotropical Region (scarcely sampled in other analyses), demonstrated that this subfamily groups bats from the Sturnirini (Baker *et al.*, 2003 and Simmons, 2005) and Stenodermatini tribes (Simmons, 2005). This one, in turn, is sub-divided into two sub-groups, corresponding to the Vampyressina sub-tribe, and Mesostenodermatini tribe, Artibeina and Stenodermatina sub-tribes as proposed by Baker *et al.* (2003). These results indicate that the inclusion of representatives from the southern part of the Neotropical Region produces the same clades as were seen in the previous phylograms performed, but that the clusters generated do not fall into the same ranks as are proposed in these analyses.

Acknowledgments

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the Organization of the American States (OAS) have supported this study. The authors are grateful to Drs. Denis Sana, Fernanda Trierveiler, Luiz Flamarion B. Oliveira, and Thales R.O. de Freitas for field work, to Gabriela Camargo, Luciano S. Silva, and Valéria C. Muschner for help in the Lab analysis and to Dr. Loreta B. de Freitas by several facilities provided.

References

- Altringham, J.D. 1996. *Bats. Biology and Behaviour*. New York: Oxford University Press.
- Anderson, S. and Yates, T. 2000. A new genus and species of phyllotine rodent from Bolivia. *Journal of Mammalogy*, 81:18-36.
- Baker, R.J.; Porter, C.A.; Patton, J.C. and Van den Bussche, R.A. 2000. Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. *Occasional papers, Museum of Texas Tech University*, 202:1-16.
- Baker, R.J.; Hooper, S.R.; Porter, C.A. and Van Den Bussche, R.A. 2003. Diversification among New World Leaf-nosed bats: an evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. *Occasional Papers, Museum, Texas Tech University* 23:1-32.
- Barquez, R.M.; Giannini, N.P. and Mares, M.A. 1993. *Guide to the bats of Argentina*. Oklahoma: Oklahoma Museum of Natural History.
- Carstens, B.C.; Sullivan, J.; Davalos, L.M.; Larsen, P.A. and Pedersen, S.C. 2004. Exploring Population Genetic Structure in Three Species of Lesser Antillean Bats. *Journal of Molecular Ecology*, 13 (9): 2557-2566.
- Davalos, L.M. 2004. A New Chocoan Species of *Lonchophylla* (Chiroptera: Phyllostomidae). *American Museum Novitates*, 3426, 1-14.
- Eisenberg, J.F. and Redford, K.H. 1999. *Mammals of the Neotropics*, vol.3. Chicago: University of Chicago Press. 609p.
- Farris, J.S.; Källersjö, M.; Kluge, A.G. and Bult, C. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10:315–319.
- Farris, J.S.; Källersjö, M.; Kluge, A.G. and Bult, C. 1995. Constructing a significance test for incongruence. *Systematics Biology*, 44:570–572.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Gervais, P. 1856. Deuxième mémoire. Documents zoologiques pour servir à la monographie des chéiroptères Sud-Américains. In: Gervais, P. (ed.),

- Mammifères: 25–88. In F. Castelnau (ed.) Animaux nouveaux ou rares recueillis pendant l'expédition dans les parties centrales de l'Amérique du Sud, de Rio de Janeiro à Lima, et de Lima au Para; executé e par ordre du gouvernement français pendant les anne és 1843 à 1847, sous la direction du Comte Francis Castelnau. 1(2): 1–116. Paris: P. Bertran. [dated 1855, but published 1856; see Ann. Mag. Nat. Hist. ser 7, 8: 164.].
- Gregorin, R. and Tavares, V. C. *in press*. A sistemática de morcegos no Brasil: história e perspectivas. In: Pacheco, S.M; Marques, R.V. and Esbérard. C.E.L. (eds.). *in press*. Morcegos no Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação. Pelotas:USEB.
- Guindon, S. and Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematics Biology*, 52:696–704.
- Hoofer, S.R. and Baker, R.J. 2006. Molecular systematics of Vampyressine bats (Phyllostomidae: Stenodermatinae) with comparison of direct and indirect surveys of mitochondrial DNA variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39:424-438.
- Hoffmann, F.G.; Owen, J.G. and Baker, R.J. 2003. mtDNA perspective of chromosomal diversification and hybridization in Peter's tent-making bat (*Uroderma bilobatum*: Phyllostomidae). *Molecular Ecology*, 12:2981-2993.
- Huelsenbeck, J. and Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Department of Biology, New York: University of Rochester.
- Jones KE, Purvis A, Maclarnon A. Bininda-Emonds OR, Simmons, NB. 2002. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). *Biological Reviews* 77:223-259.
- Koopman, K.F. 1993. Chiroptera. In: Wilson, D.E. and Reeder, D.M.(ed). *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 2^a ed. Washington: Smithsonian Institution Press, 2651:1-33.
- Koopman, K.F. 1994. Chiroptera: Systematics. *Handbook of Zoology*. Vol. VIII. Mammalia, part 60. 1-217.

- Kumar, S.; Tamura K. and Nei. M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment Brief Bioinform 5:150–163.
- Lim, B.K. 1993. Cladistic reappraisal of Neotropical stenodermatine bat phylogeny. *Cladistics*, 9: 147-165.
- Lim, B.K., Engstrom, M.D., Lee Jr., T.E., Patton, J.C. and Bickham, J.W. 2004. Molecular differentiation of large species of fruit-eating bats (*Artibeus*) and phylogenetic relationships based on the cytochrome b gene. *Acta Chiropterologica*, 6(1):1-12.
- Marques-Aguiar, S.A. 1994. A systematic review of the large species of *Artibeus* Leach, 1821 (Mammalia: Chiroptera) with some phylogenetic inferences. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Zoológica*, 10:83.
- Mckenna, M.C. & Bell, S.K. 1997. Classification of mammals above the species level. New York: Columbia University Press.
- Medrano, J.F.; Aasen, E. and Sharrow, L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, 8:43.
- Miller, G.S. 1907. The families and genera of bats. *Bulletin U. S. National Museum*, 57: 1-289.
- Müller, M.F. and Reis, N.R. 1992. Partição de recursos entre quatro espécies de morcegos frugívoros (Chiroptera: Phyllostomidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 9:345-355.
- Nicholas K.B and Nicholas H.B. 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequences alignment. Distributed by author.
- Nixon K.C. 2002. WinClada, Version 1.00.08. New York: Ithaca: Published by the author.
- Owen, R.D. 1987. Phylogenetic analyses of the bat subfamily Stenodermatinae (Mammalia: Chiroptera). The Museum Texas Tech University, Special Publications, Lubbock, 26: 1-65.

- Owen, R.D. 1991. The systematics status of *Dermanura concolor* (Peter, 1865) (Chiroptera: Phyllostomidae), with a description of a new genus. In: Bulletin of American Museum Natural History, 206:18–25.
- Peracchi, A.L.; Lima, I.P.; Reis, N.R.; Nogueira, M.R. and Ortêncio Filho, H. 2006. Ordem Chiroptera. In: Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A. & Lima, I.P (eds.). Mamíferos do Brasil. Londrina: SEMA. P.153-23.
- Porter, C. A. and Baker, R. J. 2004. Systematics of *Vampyressa* and related genera of phyllostomid bats as determined by cytochrome-b sequences. Journal of Mammalogy, 85(1):126-132.
- Posada, D., and Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. Bioinformatics,14:817-818.
- Rui, A.M. and Fabián, M.E. 1997. Quirópteros de la familia Phyllostomidae (Mammalia, Chiroptera) em selvas del estado de Rio Grande do Sul, Brasil. Chiroptera Neotropical, 3 (2): 75-77.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 9:945-967.
- Silva, A.M.; Marques-Aguiar, S.A.; Barros, R.M.S.; Nagamachi, C.Y. and Pieczarka, J.C. 2005. Comparative cytogenetic analysis in the species *Uroderma magnirostrum* and *U. bilobatum* (cytotype $2n = 42$) (Phyllostomidae, Stenodermatinae) in the Brazilian Amazon. Genetics and Molecular Biology,28(2): 248-253.
- Simmons N.B. 2005. Order Chiroptera. In: Wilson D.E, Reeder D.M, eds. Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference, third edition, vol 1. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 312-529.
- Smith, M.F. and Patton, J.L. 1993. Amazonian Phylogeography: mtDNA sequence variation in arboreal equimyd rodents (Caviomorpha). Molecular Phylogenetics and Evolution, 2:243-255.
- Swofford, D. L. 2001. PAUP (Phylogenetic analysis using parsimony). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Taddei, V.A.; Nobile, C.A. and Morielle-Versute, E. 1998. Distribuição geográfica e análise morfométrica comparativa em *Artibeus obscurus* (Schinz, 1821) e *Artibeus fimbriatus* Gray, 1838 (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae). *Ensaio: Ciência*, 2:49-70.
- Thompson, J.D.; Gibson T..J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24:4876-4882.
- Van den Bussche, R.A.; J.L. Hudgeons and Baker, R.J. 1998. Phylogenetic accuracy, stability, and congruence: relationships within and among the New World bat genera *Artibeus*, *Dermanura* and *Koopmania*, p. 59-71. In: T.H. Kunz and Racey P.A. (Eds). *Bat biology and conservation*. Washington, Smithsonian Institution Press, 365p.
- Vieira, C.O.C. 1942. Ensaio monográfico sobre os quirópteros do Brasil. *Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo*, 3:219-471.
- Xia, X. and Xie. Z., 2001 DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92:371-373.
- Xiang, Q.-Y., Moody, M. L., Soltis, D. E., Fan, C. and Soltis, P. S. 2002. Relationships within Cornales and circumscription of *Cornaceae-matK* and *rbcl* sequence data and effects of outgroups and long branches. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24:35-57.
- Wetterer, A.L.; Rockman, M.V. and Simmons, N.B. 2000. Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes and restriction sites. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, New York, 248: 1-200.
- Wright, A.J., Van den Bussche R.A., Engstrom, M.D. and Baker, R.J. 1999. Systematics of the genera *Carollia* and *Rhinophylla* based on the cytochrome B gene. *Journal of Mammalogy*, 80(4):1202-1213.

Table 1. Species, morphoclimatic domain of the collect sites, localities, and GenBank accession numbers of specimens analyzed.

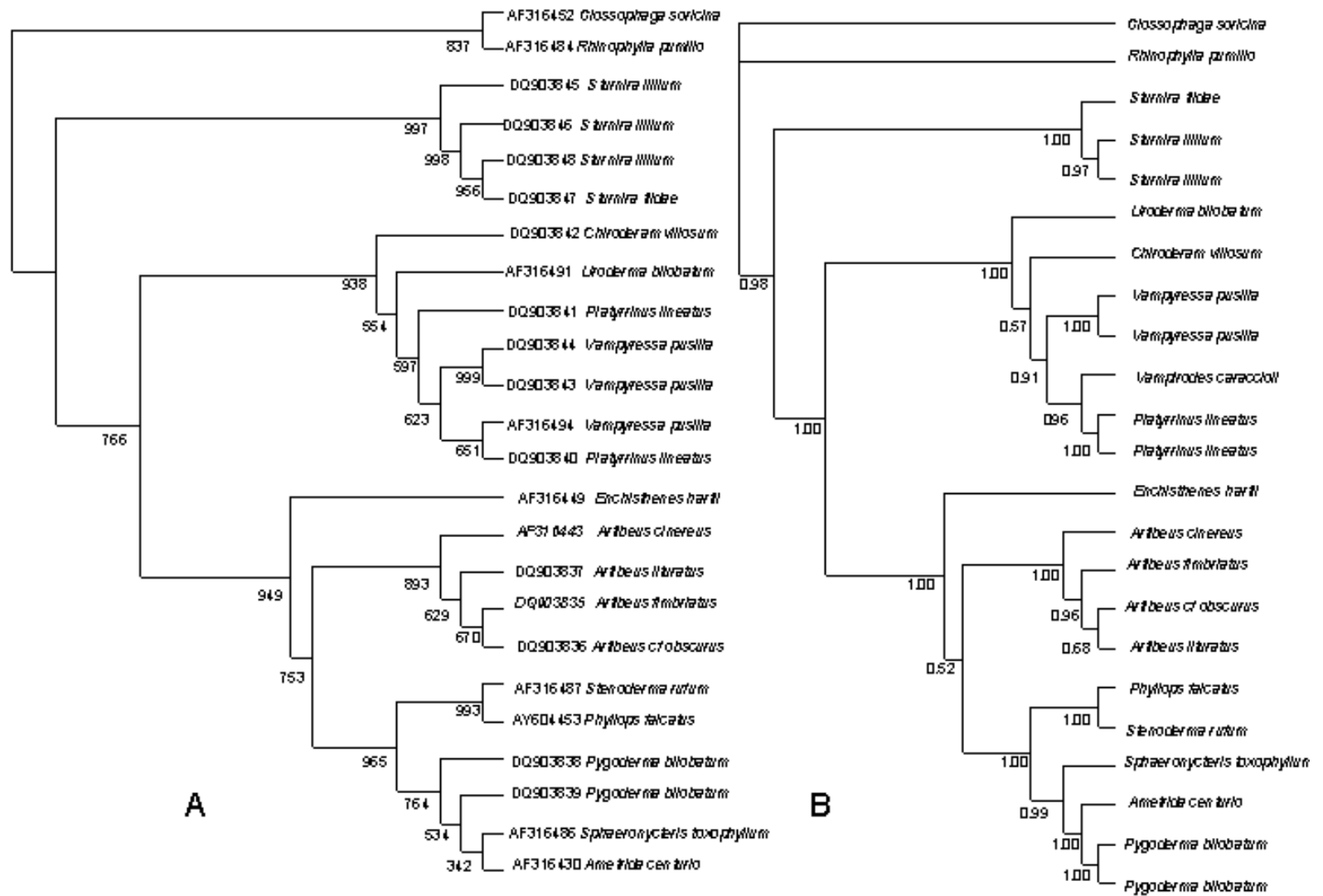
CYTOCROME B				
Species	Biome/Country	Locality	Coordenates	Genbank Acc. N°
<i>Artibeus fimbriatus</i> *	Atlantic RF	Gaspar	26°55'S 48°57'W	DQ903820
<i>Artibeus lituratus</i> *	Atlantic RF	Porto Belo	27°09'S 48°33'W	DQ903819
<i>Artibeus ac. obscurus</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903818
<i>Chiroderma villosum</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903823
<i>Platyrrhynchus lineatus</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903827
	Atlantic RF	Porto Belo	27°09'S 48°33'W	DQ903826
<i>Pygoderma bilobatum</i> *	Atlantic RF	Blumenau	26°55'S 49°03'W	DQ903821
				DQ903822
<i>Sturnira lillium</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903814
				DQ903815
<i>Sturnira tildae</i> *	Atlantic RF	Sto. Amaro da Imperatriz	27°41'S 48°46'W	DQ903816
<i>Vampiressa pusilla</i> *	Atlantic RF	Sto. Amaro da Imperatriz	27°41'S 48°46'W	DQ903825
	Atlantic RF	Gov. Celso Ramos	27°18'S 48°33'W	DQ903824
	Country	Authors	Coordenates	GenBank Acc. N°
<i>Ardops nicholls</i>	Antilhas	Carstens, <i>et al.</i> (2004)	12°15'N 68°45'W	AY572337
<i>Ametrida centurio</i> *	-	Davalos. unpubl. data	-	AY604446
<i>Arteus flavescens</i>	-	Davalos. unpubl. data	-	AY604436
<i>Centurio senex</i>	-	Davalos. unpubl. data	-	AY604444
<i>Chiroderma doriae</i>	Brazil	Hoffmann <i>et al.</i> (2003)	23°32'S 46°37'W	AY169958
<i>Artibeus (dermanura) cinereus</i> *	-	Van Den Bussche <i>et al.</i> (1998)	-	U66511
<i>Enchisthene hartii</i> *	-	Van Den Bussche <i>et al.</i> (1998)	-	U66517
<i>Ectophylla Alba</i>	Panama	Hoofer and Baker (2006)	9°00'N 80°00'W	DQ312401
<i>Erophylla bombifrons</i>	-	Davalos, unpubl. data	-	AY620438
<i>Mesophylla macconnelli</i>	Ecuador	Hoofer and Baker (2006)	2°00'S 77°30'W	DQ312422
<i>Phyllonycteris aphylla</i>	-	Wright <i>et al.</i> (1999)	-	AF187033
<i>Phyllops falcatus</i> *	-	Davalos, unpubl. data	-	AY604450
<i>Platalina genovensium</i>	Peru	Davalos (2004)	10°00'S 76°00'W	AF423101
<i>Platyrrhinus helleri</i>	Bolivia	Hoofer and Baker (2006)	14°37'S 60°45'W	DQ312408
<i>Rhinophylla pumilio</i> *	French Guiana	Hoofer and Baker (2006)	00°N 53°00'W	DQ312397
<i>Sphaeronycteris toxophyllum</i> *	-	Davalos. unpubl. data	-	AY604452
<i>Stenoderma rufum</i> *	Puerto Rico	Hoofer and Baker (2006)	18°15'N 66°30'W	DQ312400
<i>Uroderma bilobatum</i> *	Panama	Hoffmann <i>et al.</i> (2003)	9°00'N 80°00'W	AY169955
<i>Vampyrodes caraccioli</i> *	-	Hoofer and Baker (2006)	-	DQ312407
RAG2				
Species	Biome/Country	Locality	Coordenates	GenBank Acc. N°
<i>Artibeus fimbriatus</i> *	Atlantic RF	Gaspar	26°55'S 48°57'W	DQ903835
<i>Artibeus lituratus</i> *	Atlantic RF	Porto Belo	27°09'S 48°33'W	DQ903837
<i>Artibeus ac. obscurus</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903836
<i>Chiroderma villosum</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903842
<i>Platyrrhynchus lineatus</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903841
	Atlantic RF	Porto Belo	27°09'S 48°33'W	DQ903840
<i>Pygoderma bilobatum</i> *	Atlantic RF	Blumenau	26°55'S 49°03'W	DQ903838
				DQ903839

<i>Sturnira lillium</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903846
*				DQ903848
*	Atlantic RF	Porto Belo	27°09'S 48°33'W	DQ903845
<i>Sturnira tildae</i> *	Atlantic RF	Sto. Amaro da Imperatriz	27°41'S 48°46'W	DQ903847
<i>Vampiressa pusilla</i> *	Atlantic RF	Sto. Amaro da Imperatriz	27°41'S 48°46'W	DQ903844
*	Atlantic RF	Gov. Celso Ramos	27°18'S 48°33'W	DQ903843
Species	Country	Authors	Coordinates	GenBank Acc. N°
<i>Ametrida centurio</i> *	French Guiana	Baker <i>et al.</i> (2000)	00° N, 53° 00'W	AF316430
<i>Artibeus (dermanura) cinereus</i> *	-	Baker <i>et al.</i> (2000)	-	AF316443
<i>Enchisthene hartii</i> *	-	Baker <i>et al.</i> (2000)	-	AF316449
<i>Glossophaga soricina</i> *	Venezuela	Baker <i>et al.</i> (2000)	08°00'N 66°00'W	AF316452
<i>Phylloderma stenops</i>	Suriname	Baker <i>et al.</i> (2000)	04°44'N 56°12'W	AF316480
<i>Phyllops falcatus</i> *	-		-	AY604453
<i>Rhinophylla pumilio</i> *	French Guiana	Baker <i>et al.</i> (2000)	00° N 53° 00'W	AF316484
<i>Sphaeronycteris toxophyllum</i> *	Peru	Baker <i>et al.</i> (2000)	10°00'S 76°00'W	AF316486
<i>Stenoderma rufum</i> *	Puerto Rico	Baker <i>et al.</i> (2000)	18°19'N 65°49'W	AF316487
<i>Uroderma bilobatum</i> *	El Salvador	Baker <i>et al.</i> (2000)	13°50'N 88°55'W	AF316491
<i>Vampyroides caraccioli</i> *	Trinidad	Baker <i>et al.</i> (2000)	11°00'N 61°00'W	AF316494

*specimens utilized in the combined analysis; when the coordinates of the localities of collect of the GenBank sequences were not located, the coordinates of the capital of the country were utilized; Atlantic RF = Atlantic Rain Forest **Cerrado-Amazon transition.

Figure legends

Figure 1: A) Maximum likelihood tree for RAG2 gene. Likelihood settings from best-fit model (K80+G) selected by hLRT Lset Base=equal Nst=2 TRatio=3.0953 Rates=gamma Shape=0.0845 Pinvar=0. Numbers above branches are the bootstraps values. B) Results from Bayesian analysis of concatenated *cyt b* and RAG2 genes. Likelihood settings from best-fit model (GTR+I+G) selected by hLRT. Lset Base=(0.2860 0.2628 0.1885) Nst=6 Rmat=(1.6334 3.7942 0.9114 0.3789 14.5266) Rates=gamma Shape=0.2266 Pinvar=0.3133. Numbers above branches are posterior probabilities values.



Artigo 3

RELATIONSHIPS OF SOUTH AMERICAN PHYLLOSTOMIDS BATS STUDIED WITH
CYTOCHROME B AND RAG2 GENES

Artigo submetido à revista *Zoological Journal of Linnean Society*

CRISTINA CLAUMANN FREYGANG^{1*}, SÉRGIO L. ALTHOFF², ANA LETÍCIA
PEREIRA³ and MARGARETE SUÑÉ MATTEVI^{1,3}

¹*Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*

²*Universidade Regional de Blumenau. Caixa Postal 1507, CEP 89010971, Blumenau, Santa Catarina, Brazil*

³*Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Av. Farroupilha, nº 8001, CEP 92450-900, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil.*

SHORT RUNNING TITLE: Relationships of South American phyllostomids bats

*Corresponding author: E-mail address: crisfreygang@yahoo.com.br

ABSTRACT

Phyllostomidae is the largest bat family of the Neotropical Region, including about 160 species of varied morphology derived from broad-spectrum food habits. This feature hindered the reconstruction of the phylogenetic history of the group, and the investigations carried out have raised conflicting hypotheses about the relationships among members. Another obstacle lies in the fact that the researches made, especially the molecular investigations, employed specimens collected almost exclusively in Central America and North/northeastern South America. The present study describes the analyses of the mitochondrial cytochrome b (cyt b) and the nuclear recombination activator (RAG2) genes in 19 phyllostomid bat species collected south of parallel 07°S in South America. The results obtained from these taxa were analysed together with other 27 GenBank sequences from species outside this region to verify if the inclusion of representatives from the southern of the Neotropical Region alters the phylograms already described without these representatives. The most information-rich result was obtained by the combined analysis of the two genes which showed topologically similar trees that generated nine main clusters (some of them including subgroups) with consistently high bootstrap values. These clusters are in accordance with the main taxonomic classification proposals reported in the literature.

ADDITIONAL KEYWORDS: Chiroptera, Phyllostomidae, phylogeny, mitochondrial DNA, cytochrome - b; nuclear DNA; RAG2

INTRODUCTION

The Chiroptera order represents one of the oldest and most specialized groups among placental mammals (Simmons, 2005a). The group is typically subdivided into two subgroups, Microchiroptera (echolocating bats) and Megachiroptera (Old World fruit bats, which do not echolocate). These subgroups have been considered reciprocally monophyletic and are formally recognized as suborders by most taxonomic classifications. Nevertheless, recent sequence analyses of both nuclear and of mitochondrial genes indicate that Microchiroptera may not be monophyletic (Simmons, 2005a), with this classification already not being adopted by Simmons (2005b). Also, the evolutionary relationships between the families have remained, until recently, only partially cleared (Faria & Morielle-Versute, 2006).

Among the existing Microchiroptera families, Phyllostomidae are the largest endemic family inhabiting the Neotropical Region. The family includes round 160 species, the majority of which adapted to New World tropical and semi-tropical lowlands, spreading from California and Arizona as well as from the coastal plains of Texas, to northern Argentina (Eisenberg & Redford, 1999; Nowak, 1999; Simmons, 2005b).

The main feature used in the identification of this family's bat species is the occurrence of a nose spear, also known as noseleaf, a fleshy and somewhat lanceolate nose protuberance. The protuberance may be quite long, stretching beyond head size in some species, or even only barely perceptible in others (Koopman, 1994).

Phyllostomidae exhibit a significant morphologic diversity, related to the broad-spectrum food habits that include insects, fruit, pollen, nectar, leaves, arthropods, small vertebrates, and the blood of endothermic animals (like birds and mammals). This great variety of habits has become an issue to taxonomists, making it more difficult to recover the phylogenetic history of the group. As a consequence, although

the phylogenetic relationships of the taxon have been studied for over a century, no consensus has yet been reached (Wetterer, Rockman & Simmons, 2000).

Phyllostomidae may be divided into three or else into more than eight subfamilies, paradoxically enough. The monophyly of some of these subfamilies, as well as of a number of many genera — specially *Micronycteris* Gray, 1866; *Mimon* Gray, 1847; *Phyllostomus* Lacépède, 1799; *Artibeus* Leach, 1821; and *Vampyressa* Thomas, 1900 — has been questioned by many authors (Wetterer *et al.*, 2000).

The datasets used to try to solve these taxonomic problems include the results of studies with restriction enzymes, chromosomal morphology, parasite-host associations, immunological-distances, rDNA restriction sites, as well as mitochondrial and nuclear DNA sequences. Among the recent attempts towards solving these issues in Phyllostomidae systematic are, more outstandingly, the studies by Wetterer *et al.* (2000), which investigated a variety of literature data and proposed a novel taxonomy for all current genera, and the research of Jones *et al.* (2002) in which a supertree for the family's taxa was generated by the method known as MRP (Matrix Representation using Parsimony).

Baker *et al.* (2000) analysed the relationship between the Phyllostomidae species carrying out a cladistic analysis with 66 taxa using the nuclear gene RAG2. The authors concluded that the trees constructed based on one single gene are not suitable to distinguish and define the taxonomic relationships between these Phyllostomidae species. Therefore, they suggest that more genes are needed to prove or disprove the contradictory hypotheses put forward. More recently, the same group of researchers (Baker *et al.*, 2003) analysed the phylogenetic relationships between 48 genera using a 2.6-kb fragment from mitochondrial 12S rRNA, tRNA VA1, 16S rRNA genes and an approximately 4.0-kb fragment from the nuclear gene RAG2. Karyotypes, among other kinds of data, were compared also, and a novel classification to the family was proposed based on a dataset the authors understood as more consistent.

All these papers that have employed molecular methods — both in taxonomy and in the investigation of the interspecies relationships in Phyllostomidae bats —

have almost always used samples that included specimens collected in Central America, as well as in North and northeastern South America. In these researches the vast majority of the specimens was collected in sites stretching to 02° latitude south (Baker *et al.*, 2000; Wetterer *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2003). The present study describes the results of the analyses of the mitochondrial cytochrome b (cyt b) and the nuclear recombination activator (RAG2) genes in 22 phyllostomid bat species collected south of parallel 07°S in South America. The results obtained from these taxa were analysed together with other 27 GenBank sequences from species out of this region aiming to verify if the inclusion of representatives from the southern of the Neotropical Region alters or not the phylograms already described in which these representatives are absent

MATERIALS AND METHODS

SPECIES ANALYSED

The sample consists of 25 sequences of 19 species from 14 genera trapped in 8 sites located in an area ranging from 7° to 28°S and 47° to 49°W, in two morphoclimatic domains of South America (Table 1). These species were grouped with other 27 taxa plus *Furipterus horrens*, *Noctilio leporinus* and *Pteronotus personatus* (as outgroup) obtained from GenBank. The choice of outgroups was based on Baker *et al.* (2003) and Simmons (2005a). The skins and skulls of these specimens are stored in the Mammals Collection of the Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Santa Catarina and in the Mammals Collection of the Museu Nacional, Rio de Janeiro, Brazil.

Table 1 here

NUCLEOTIDE ACID SEQUENCE ANALYSIS

DNA was extracted from kidney, liver, heart or muscle (stored at -20°C or in ethanol 70% purity) using the standard protocol described in Medrano, Aasen & Sharrow (1990). The mitochondrial cytochrome *b* gene (hereafter cyt *b*) sequences were isolated via polymerase chain reaction (PCR) using the primers MVZ05, MVZ23 (light-strand), MVZ16 (heavy-strand) suggested by Smith & Patton (1993) and MUS15398 (heavy-strand) suggested by Anderson and Yates (2000). PCR reactions were run in a total volume of 25 μl containing: 10x PCR buffer, 2,6mM of MgCl_2 , 0,56 μM of dNTP, 0,2 μM of each primer, 1 unit of Taq polymerase, and 1-2 μl of template DNA. Reaction conditions were as follows: Initial denaturation (92°C – 5min); followed by 5 cycles in Touchdown (denaturation: 92°C - 1 min; annealing temperature step-downs every cycle 1°C from 50°C to 46°C - 1 min; extension: 72°C - 1 min). The annealing temperature for the final 35 cycles was 46°C with denaturation and extension phases as above. Final extension: 72°C – 10 min. Each round of PCR reactions also included one negative control to check for contamination.

For the amplification of nuclear recombination activating gene (hereafter RAG2), the primers RAG2F1 (light-strand), RAG2F2 (heavy-strand) suggested by Baker *et al.* (2000) were used. PCR reactions were run in a total volume of 25 μl containing: 10x PCR buffer, 2,6mM of MgCl_2 , 1,12 μM de dNTP, 0,32 μM of each primer, 1 unit of Taq polymerase, and 1-2 μl of template DNA. Reaction conditions were as follows: Initial denaturation (92°C – 5min); followed by 35 cycles (denaturation: 92°C – 60s; annealing temperature 60°C – 45s; extension: 72°C – 90s). Final extension: 72°C – 10 min. Each round of PCR reactions also included one negative control to check for contamination

PCR products were purified with exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase (Amersham Biosciences). All taxa were sequenced directly from purified PCR products using the primers cited above and the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Sequencing of both strands was carried out using

an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). All sequences are available in GenBank as displayed in Table 1.

DATA ANALYSIS

The sequences obtained were read employing the Chromas 1.45 program, aligned using the Clustal X 1.81 program (Thompson *et al.*, 1997) under the default setting costs and manually refined with the aid of the Genedoc (Nicholas & Nicholas, 1997). Saturation plots were obtained with Data Analysis in Molecular Biology and Evolution software (DAMBE; Xia & Xie, 2001). The composition of bases was accomplished by the use of Molecular Evolution Genetics Analysis software -MEGA3 (Kumar, Tamura and Nei, 2004).

The phylogenetic analyses were performed using the maximum parsimony (MP) algorithm obtainable in PAUP*, version 4.0b10 (Swofford, 2001) by heuristic search with tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping, the MULPARS option, and 100 random-addition replicates. Bootstrap statistical support (Felsenstein, 1985) was carried out with 1,000 replications of heuristic search and simple taxon addition, with the all trees saved option.

The maximum-likelihood (ML) tree estimation was conducted with PHYML (Guindon & Gascuel, 2003), under the appropriate model of nucleotide substitution, determined using the MODELTEST 3.06 program (Posada and Crandall 1998). Reliability of the trees was tested using 1,000 bootstrap replications.

The neighbor-joining analysis (NJ – Saiton & Nei, 1987) was conducted under a ML model, with parameter settings estimated by MODELTEST, as described by Xiang *et al.* (2002) with 1,000 bootstrap replications.

Bayesian analyses (BI) of the data were performed using MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) to generate a posterior probability distribution using Markov chain Monte Carlo (MCMC) methods following Baker *et al.* (2003). We ran three independent analyses. No a priori assumptions about the topology of the tree were made and all searches were provided with a uniform prior. The models of DNA

substitution used were those estimated by MODELTEST and used in the standard ML analyses. The MCMC processes were set so that four chains (one cold and three incrementally heated Markov chains) were run simultaneously for 1 million generations, with trees being sampled every 10 generations. Bayesian likelihoods reached at 200,000 generations (burn-in=2000) for *cyt b* and RAG2 analysis and after 500,000 generations (burn-in=5000) for combined analysis. The values were established by empirical evaluation of tree likelihood scores and following Baker *et al.* (2003). To calculate the posterior probability of each bipartition, a 50% majority-rule consensus tree was constructed from the remaining trees using PAUP*

We chose Bayesian analysis over Maximum likelihood because it is quick and efficient for large data sets, provides reliable estimates (i.e., branch support) by straightforward posterior probabilities, and utilizes a statistically robust procedure to extract the maximum amount of information from the sequence data (Whelan *et al.*, 2001).

To detect the presence of character conflict between *cyt b* and RAG2 genes incongruence length difference (ILD) test was computed as described by Farris *et al.* (1994, 1995) and implemented in WINCLADA version 0.9.9+ (BETA) (Nixon, 2002). A subset of the individuals for which sequences from both data sets were available was combined into a single analysis.

RESULTS

CYTOCHROME B

One 739-bp fragment was analysed for a total of 49 bats, with 21 specimens belonging to 18 Brazilian species (13 genera) plus 25 Phyllostomidae sequences obtained from GenBank, and 3 outgroups. The sequence analyses revealed a significant guanine deficiency ($P < 0.01$), specially in the third position. The values found (not shown) were similar to those obtained by Pumo *et al.* (1998) in *Artibeus jamaicensis* (Olfers, 1818) and by Ruedi & Mayer (2001) in *Myotis* Kaup 1829, and

are within the expected values for the composition of the mitochondrial DNA bases for mammals in general (Irwin, Kocher & Wilson, 1991).

Taking into account only the sequences belonging to the ingroup, the haplotypes were defined by 371 variable sites (88 of which corresponding to the first codon position, 41 to the second, and 242 to the third), and 306 parsimony-informative sites. In the maximum parsimony analyses, the heuristic search of cyt b data resulted in 1 most parsimonious tree with 2,482 evolutionary steps, with a consistency index (CI) of 0.246 and a retention index (RI) of 0.417.

The selected model for the maximum-likelihood analysis using MODELTEST was GTRI+I+G (see Posada and Crandall, 1998, for details of the models) and the gamma shape parameters of 0.4763.

The topologies of all trees (MP, NJ, ML, and BI) were very similar. Therefore, only selected examples of those obtained by Bayesian analysis will be presented (Fig. 1A). As can be seen, the tree generated shows only one main clade (clustering the Stenodermatinae subfamily members exclusively) and several polytomies. This configuration, therefore, strongly points to cytochrome b gene as unsuitable for discrimination of the relationships and/or affinities between species of phyllostomid bats. Some of these polytomies gather 2 or 3 genera that, in some cases, include related species but in most do not reflect the taxonomic proposals formulated. This is the case of *Micronycteris*, and *Sturnira* Gray, 1842 or *Rhinophyla* Peters, 1865 and *Macrotus* Gray, 1843, for instance.

Fig. 1 here

RAG2

For the RAG2 analyses, a 763-bp fragment was sequenced totaling 21 specimens belonging to 16 species and 11 genera. These sequences were complemented with other 11 sequences deposited in GenBank and three outgroups. RAG2 alleles show an overall even pattern of base composition. Considering only the

ingroup, 216 variable sites were observed, with 39 corresponding to the first codon position, 19 to the second, and 158 to the third position. The number of characters that produced information for the parsimony analysis was 78. In the MP analysis, the heuristic search of RAG2 data resulted in 140 most parsimonious trees with 339 steps, with a CI = 0.711 and an RI = 0.756.

The selected model for the maximum-likelihood analysis using the MODELTEST was K80+G. The gamma shape parameters were estimated as 0.3311.

The topologies of all trees, independently of the types of analyses employed, were very similar; therefore, only the selected examples of those obtained by Bayesian analysis will be presented (Fig. 1B). RAG2 generated one tree with almost no polytomy, with yet high posterior probabilities (17 of the 26 nodes being above 0.95) and the majority of species clusters in accordance with the more modern taxonomic proposals for Phyllostomidae. The arrangement observed shows the genus *Macrotus* at the basis of the tree, and Stenodermatinae as the most derived group.

COMBINED ANALYSES

For both genes, the saturation curve obtained (not shown) indicated that there is no clear evidence of multiple substitution (saturation) in any codon position, and thus there should be no loss of phylogenetic signal among the more divergent taxa (i.e., outgroup – ingroup) in this analysis.

The ILD test revealed that the amount of character conflict between both genes is not significant ($P = 0.1667$), and therefore the combined alignment of cyt b and RAG2 data resulted in 1,502 characters analysed from 14 species belonging to our sample plus 8 from GenBank, and 3 outgroups.

With the combined dataset, 1 most parsimonious tree of 1805 steps and 363 parsimony-informative characters were found (CI = 0.416 and RI = 0.501). The model selected was GTR+I+G, with a gamma shape parameter of 0.4763.

The topologies of all trees (MP, NJ, BI), independently of the types of analysis employed, were very similar; therefore, only selected examples among those obtained by Bayesian will be presented (Fig. 2A).

Fig. 2 here

In the combined analysis, the posterior probabilities values for the majority of the tree branches were consistently high, with 17 of the 24 branches generated presenting posterior probabilities higher than 0.95, and with 15 of the branches exhibiting a probability of 1.00 in the Bayesian analysis. By comparing the combined analysis to the independent analysis for each gene, only 9 clusters observed in the *cyt b* isolated analysis (Fig. 1A) found correspondence in the two-gene combined analysis (Fig. 2A). As regards the RAG2 analysis, 11 of the 24 nodes observed in the isolated analysis (Fig. 1B) are present in the combined analysis (Fig. 2A). This number rises to 13 in the tree obtained by Baker *et al.* (2003). These data indicate that there is a greater consistency between gene RAG 2 and the combined analysis of the two genes, as opposed to isolated *cyt b* gene analysis.

In turn, the comparison between the combined analyses of our data and of those by Baker *et al.* (2003) shows a good consistency of results, with the nodes, here called A-N (Fig. 2A) corresponding, respectively, to nodes 1, 3, 5, 6, 9, 10, 11, 14, 16, 22, 24, 25 and 42 in Baker *et al.* (2003).

DISCUSSION

The present study analysed the mitochondrial *cyt b* and RAG2 genes in the Phyllostomidae taxa collected in Brazil, together with the specimens retrieved from GenBank. As regards the studies carried out with *cyt b* gene, all the analyses conducted (MP, ML, NJ, and BI) were able to cluster only the members of the Stenodermatinae family and some closer taxa, with the remaining taxa appearing as polytomies.

This suggests that the evolution of the *cyt b* gene in Phyllostomidae could be more appropriate to clarify the relationships on the genus level, but is more limited in terms of resolution when higher taxonomic levels are studied.

In turn, the trees generated by isolated analyses of the RAG2 gene or RAG2 + *cyt b* combined analysis were much more informative, giving taxonomic arrangements which tally better with the literature proposals and/or with the biogeography of the species. Although in this study, in the combined analyses the mitochondrial *cyt b* gene was employed instead of the 12sRNA, tRNA and 16sRNA as used by Baker *et al.* (2003), the trees generated in the two searches were essentially similar. This may be explained by the fact that all mitochondrial genes are connected and, thus, present inform the same phylogenetic history.

By observing the tree resulting from the combined analysis (Fig. 2A), the genus *Macrotus* (node A) is found on its base. This genus has only two species recognized, distributed in North and Central America. Both species are of average size and morphologically similar to the members of the *Micronycteris* genus. This basal position is found also in the Baker *et al.* (2003) analysis, which proposes this genus to constitute a sub-family – Macrotinae. Simmons (2005b), on the other hand, placed *Macrotus* as belonging to Phyllostominae, in spite of the fact that the genus' inclusion in Macrotinae is more logical, as this is the taxonomic position it was given in the two molecular investigations carried out (the present study and that of Baker *et al.*, 2003), as well as in the cytogenetic study by Patton and Baker (1978), which considered the karyotype as being the most basal among Phyllostomidae. Additionally, according to the proposal by Simmons (2005b), which includes *Macrotus* in Phyllostominae, there would have been one cluster which joining two subfamilies (Phyllostominae + Desmondontinae).

Next, there is a clade formed by *Diphylla* Spix, 1823 and *Desmodus* Wied-Neuwied, 1826. This clade is recognized, as Desmondontinae by Baker *et al.* (2003), and considered by Wetterer *et al.* (2000) and Simmons *et al.* (2005b) as the most basal branch of the Phyllostomidae family. Nevertheless, Wetterer *et al.* (2000) suggested that the basal branching pattern of the family may change in future

analyses, as additional characters are added to the data matrix. Thus, they believe it would not be prudent to give a name to this group until basal relationships among phyllostomids are better supported. These two species (*Diphylla* and *Desmodus*) are widely distributed, specialized in feeding on blood of warm-blooded vertebrates (mammals to *Desmodus* and birds to *Diphylla*) with total body size varying between 65 and 90 mm, incisive and canine teeth specialized in slashing, which are employed to bite the prey, and presenting no tail and a small noseleaf (Eisenberg & Redford, 1999). This arrangement (Desmondontinae = *Desmodus* + *Diphylla*) was one of the few to be present both in the combined and individual gene analyses.

The next clade (node N) joins two species - *Tonatia silvicola* (d'Orbigny, 1836) and *Trachops cirrhosus* (Spix, 1823), ranked as Phyllostominae both by Baker *et al.* (2003) and Simmons (2005b). These authors include *Mimon crenulatum* (E. Geoffroy, 1810) and *Phylloderma stenops* Peters 1865 in this subfamily. We did not carry out the combined *cyt b* and RAG2 analysis for these two species: only the RAG2 gene analysis was conducted. Considering the tree obtained, it is observed that these two species may be added to this sub-family. These 4 species, which resort to insects as the staple article in their diets, are formed by medium-sized animals which preferably inhabit multistratal tropical evergreen forests, and may generally be found at over altitudes 400 m (Eisenberg & Redford, 1999).

The next node (D) separates the species *Glossophaga soricina* Pallas, 1766 from the other taxa. This arrangement was also observed in the molecular analysis by Baker *et al.* (2003), which resulted in the clustering, also, of the following genera forming the sub-family Glossophaginae: *Anoura* Gray, 1838; *Hylonycteris* Thomas, 1903; *Choeroniscus* Thomas, 1928; *Choeronycteris* Tschudi, 1844; *Musonycteris* Schaldach & McLaughlin, 1960; *Erophylla* Miller, 1908; *Brachyphylla* Gray, 1834; *Monophyllus* Leach, 1821; *Leptonycteris* Lydekker, 1891; and *Glossophaga* E. Geoffroy, 1818. The RAG2 data obtained in the present study revealed that the species *Anoura geoffroyi* Gray, 1838 also clusters under this clade. *Glossophaga* and *Anoura* are two genera that have already been included in the subfamily Glossophaginae in previous classifications, as that by Eisenberg & Redford (1999).

Both are genera of relatively small bats, of very similar morphology with small or virtually absent interfemoral membrane and primitive tail. These bats may feed on fruit, nectar, pollen and insects, and live preferably in humid zones.

Rhinophyla pumilio Peters, 1865 branches out in the following node (E). This species belongs to a frugivorous genus, which prefers multistratal tropical evergreen forests. Traditionally, the genus is ranked under the sub-family Carrollinae (Eisenberg & Redford, 1999; Simmons, 2005b), being very similar in morphology to *Carollia* Gray, 1838, yet distinguished from the genus mentioned by the absence of a tail. Thus, according to Baker *et al.* (2003), the genus comprises one single sub-family, Rhinophyllinae. As in the present study the genus *Carollia* was not analysed for combined *cyt b* and RAG2, it is not possible to ascertain whether the two genera would have clustered under the same sub-family, in our sample. Both genera were studied only for *cyt b*, but the results obtained were inconclusive.

Node F includes Stenodermatinae. This subfamily is ranked by Baker *et al.* (2003) under three tribes: Sturnirini, Sternodermatini, and Mesostenodermatini (which includes subdivisions), while Simmons (2005b) considers only two tribes, joining Stenodermatini and Mesostenodermatini in the Sternodermatini tribe. In our data, we observed three branches, markedly due to the presence of node F, which separates Sturnirini tribe from the other two, and of node G, which separates Sternodermatini from Mesostenodermatini. The clade formed by node H includes two sister-groups, one of them containing only the *Artibeus* Leach, 1821 species and the other clustering the taxa having round eyes of the genera *Phyllops* Peters, 1865, *Stenoderma* E.Geoffroy & St. Hilaire, 1818; *Sphaeronycteris* Peters, 1882; *Ametrida* Gray, 1847; and *Pygoderma* Peters, 1863. The genes we analysed showed the same arrangement proposed by Baker *et al.* (2003), although with species from other places in the Neotropical Region.

As regards the intra-tribe clusters, tribe Sturnirini (separated by node F), formed by only one genus, branching out to many frugivorous bat species that may also resort to pollen and nectar to feed. These species spread from Mexico to northern Argentina and Uruguay (Eisenberg & Redford, 1999). In the past, this genus

has often been re-ranked (Koopman, 1993; McKenna and Bell, 1997; Jones *et al.*, 2002), but the recent molecular data have clearly indicated the tribal status.

The tribe Stenodermatini (node J), in turn, includes several specimens as *Chiroderma* Peters, 1860, *Vampiressa* Thomas, 1900, *Uroderma* Peters, 1866 and *Platyrrhinus* Saussure, 1860, which exhibit the presence of one white line down the center of the back as the main morphologic characteristic in common.

In Mesostenodermatini (node H), apart from the “round-eyed” group, one other cluster occurred, formed by *Phyllops* that, independently of the gene investigated, behaved as a sister-taxon to *Stenoderma* (100% posterior probability). In the present study, *Phyllops* is for the first time analysed simultaneously for *cyt b* and RAG2, but the cluster that this species formed with *Stenoderma* had already been suggested via morphologic comparisons by Novak (1999), who propose that *Ardops* Miller, 1906 and *Ariteus* Gray, 1838 are species closely related also to *Phyllops* and *Stenoderma*. This group would have a white spot on both shoulders as the common characteristic. These last two species (*Ardops* and *Ariteus*) were included in Mesostenodermatini by Baker *et al.* (2003). When our dataset is analysed, *Phyllops* is also included in this tribe, and Baker *et al.* (2003) enclose this assemblage of genera under the name of Stenodermatina. The sister-group to Stenodermatina subtribe is formed by the species of the *Artibeus* genus, an heterogeneous group of taxa formed by bats that which feed on fruit and spread from Mexico to northern Argentina.

In recent years, the classic taxonomy of Phyllostomidae has been revised by Wetterer *et al.* (2000), who took into account morphologic, chromosomal and restriction enzyme data to re-classify Phyllostomidae. Baker *et al.* (2003), in turn, constructed trees based on mitochondrial and nuclear genes, whereas Simmons (2005b) summarized all these findings in the classification proposed by her. These three taxonomic revisions, though having many proposals in common, present also significant differences.

These differences in the taxonomy of Phyllostomidae are visible, in like manner, in the analyses of the phylogenetic relationships between its taxa. The molecular data analysed in this study and in other studies published have, however,

apparently been able to underline this kind of relationship. It seems that, even when the target species are from very geographically distant locations, similar phylograms are often generated when the investigation focuses on the appropriate genes. More specifically in this study, in which the aim was to investigate Phyllostomidae representatives collected south of the Equator (such species as had not been targeted by phylogenetic studies in the literature), no significantly different results were observed. The phylogenetic trees generated with Central American and North of South American representatives, and those trees constructed with data from specimens collected in the southern Neotropical region showed very similar phylletic groups. It is possible that, in the case of bats, this similarity is the result of a genetic “homogenization” — a consequence of the migration possibilities afforded by flight. This genetic cohesion may also be imputed to the recent origin of bat species. Nevertheless, these are hypotheses that invite more study to be validated.

ACKNOWLEDGEMENTS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the Organization of the American States (OAS) have supported this study. The authors are grateful to Drs. Denis Sana, Fernanda Trierveiler, Luiz Flamarion B. Oliveira, and Thales R.O. de Freitas for field work, to Gabriela Camargo, Luciano S. Silva, and Valéria C. Muschner for help in the Lab analysis and to Dr. Loreta B. de Freitas by several facilities provided.

REFERENCES

Anderson S, Yates T. 2000. A new genus and species of phyllotine rodent from Bolivia. *Journal of Mammalogy* **81**: 18-36.

- Baker RJ, Porter CA, Patton JC, Van Den Bussche, RA. 2000.** Systematics of Bats of the Family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. *Occasional Papers of Texas Tech University Museum* **202**:1-16.
- Baker RJ, Hooper SR, Porter CA, Van Den Bussche RA. 2003.** Diversification among New World Leaf-nosed bats: an evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. *Occasional Papers, Museum, Texas Tech University* **23**:1-32.
- Carstens BC, Sullivan J, Davalos LM, Larsen PA, Pedersen SC. 2004.** Exploring Population Genetic Structure in Three Species of Lesser Antillean Bats. *Journal of Molecular Ecology* **13** (9): 2557-2566.
- Davalos LM. 2004.** A New Chocoan Species of Lonchophylla (Chiroptera: Phyllostomidae) *American Museum Novitates* **3426**, 1-14.
- Davalos LM. 2005.** Molecular phylogeny of funnel-eared bats (Chiroptera: Natalidae), with notes on biogeography and conservation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37** (1): 91-103.
- Eisenberg JF, Redford KH. 1999.** *Mammals of the Neotropics, vol.3*. Chicago: University of Chicago Press.
- Faria KC, Morielle-Versute E. 2006.** Genetic relationships between Brazilian species of Molossidae and Phyllostomidae (Chiroptera, Mammalia). *Genetica* **126**:215–225.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C. 1994.** Testing significance of incongruence. *Cladistics* **10**:315–319.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C. 1995.** Constructing a significance test for incongruence. *Systematics Biology* **44**:570–572.
- Felsenstein J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
- Fonseca RM, Hooper SR, Porter CA, Cline CA, Parish DA, Hoffmann FG, Baker RJ. 2006. In press.** Morphological and molecular variation within little big-eared bats of the genus *Micronycteris* (Phyllostomidae: Micronycterinae) from San Lorenzo, Ecuador In: Kelt DA, Lessa E, Salazar-Bravo A, Patton JL, eds. *The*

Quintessential Naturalist: Honoring The Life and Legacy of Oliver P. Pearson.
Berkeley: University of California Press.

- Guindon S, Gascuel O. 2003.** A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematics Biology* **52**(5):696–704.
- Hoffmann FG, Baker RJ. 2001.** Systematics of bats of the genus *Glossophaga* (Chiroptera: Phyllostomidae) and phylogeography in *G. soricina* based on the cytochrome b gene. *Journal of Mammalogy* **82** (4): 1092-1101.
- Hoffmann FG, Owen JG, Baker RJ. 2003.** mtDNA perspective of chromosomal diversification and hybridization in Peters' tent-making bat (*Uroderma bilobatum*: Phyllostomidae) *Molecular Ecology* **12** (11):, 2981-2993.
- Hooper SR, Reeder SA, Hansen EW, Van Den Bussche RA. 2003.** Molecular Phylogenetics and Taxonomic Review of Noctilionoid and Vespertilionoid Bats (Chiroptera: Yangochiroptera). *Journal of Mammalogy* **84** (3): 809-821 (2003)
- Hooper SR, Baker RJ. 2006.** Molecular systematics of Vampyressine bats (Phyllostomidae: Stenodermatinae) with comparison of direct and indirect surveys of mitochondrial DNA variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **39** (2): 424-438.
- Huelsenbeck J, Ronquist, F. 2001.** MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Department of Biology, New York: University of Rochester.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. 1991.** Evolution of the cytochrome b gene in mammals. *Journal of Molecular Evolution* **32**: 128-144.
- Jones KE, Purvis A, Maclarnon A, Bininda-Emonds OR, Simmons, NB. 2002.** A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). *Biological Reviews* **77**:223-259.
- Koopman KF. 1993.** Chiroptera. In: Wilson DE, Reeder DM, eds. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* 2^a ed. Washington: Smithsonian Institution Press, 2651:1-33.
- Koopman KF. 1994.** Chiroptera: Systematics. Handbook of Zoology. Vol. VIII. *Mammalia*, part 60. 1-217.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004.** MEGA3: Integrated software for Molecular

Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment *Brief Bioinform* **5**:150–163.

Lewis-Oritt N, Van Den Bussche RA, Baker RJ. 2001a. Molecular evidence for evolution of piscivory in *Noctilio* (Chiroptera: Noctilionidae). *Journal of Mammalogy* **82** (3): 748-759.

Lewis-Oritt N, Porter CA, Baker RJ. 2001b. Molecular systematics of the family Mormoopidae (Chiroptera) based on cytochrome b and recombination activating gene 2 sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **20** (3), 426-436.

McKenna MC, Bell SK. 1997. *Classification of mammals above the species level*. New York: Columbia University Press.

Medrano JF, Aasen E, Sharrow L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* **8**:43.

Nicholas KB, Nicholas HB. 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequences alignment. Distributed by author.

Nixon KC. 2002. WinClada, Version 1.00.08. New York: Ithaca: Published by the author.

Nowak RM. 1999. *Walkers Mammals of the World. 6^a ed.* Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press.

Patton JC, Baker RJ. 1978. Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoid bats. *Systematic Zoology* **27**:449-469.

Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**:817-818.

Pumo DE, Finamore PS, Franek, WR, Phillips, CJ, Tarzani S, Balzarano D. 1998. Complete Mitochondrial genome of a Neotropical Fruit Bat, *Artibeus jamaicensis*, and a new hypothesis of the relationships of bats to other eutherian mammals. *Journal of Molecular evolution* **47**:709-17.

Ruedi M, Mayer F. 2001. Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**:436-448.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for

reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **9**:945-967.

Simmons NB. 2005a. Chiroptera. In: Rose KD, Archibald D, eds. *The rise of placental mammals*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 159-174p.

Simmons NB. 2005b. Order Chiroptera. In: Wilson DE, Reeder DM, eds. *Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference, third edition, vol 1*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 312-529

Smith MF, Patton JL. 1993. Amazonian Phylogeography: mtDNA sequence variation in arboreal equimyd rodent (Caviomorpha). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **2**:243-255.

Swofford, DL. 2001. *PAUP (Phylogenetic analysis using parsimony)*. Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**:4876-4882.

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

Xiang QY, Moody ML, Soltis DE, Fan C, Soltis, P S. 2002. Relationships within Cornales and circumscription of Cornaceae-matK and rbcL sequence data and effects of outgroups and long branches. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **24**:35-57.

Wetterer AL, Rockman MV, Simmons NB. 2000. Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes and restriction sites. *Bulletin of the American Museum of Natural History, New York*, **248**: 1-200.

Whelan S, Liò P, Goldman N. 2001 Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *Trend in Genetics* **17**:262-272.

Wright AJ, Van Den Bussche RA, Engstrom MD, Baker RJ. 1999. Systematics of the genera *Carollia* and *Rhinophylla* based on the cytochrome B gene. *Journal of Mammalogy* **80**(4):1202-1213.

Table 1. Species, morphoclimatic domains of the collect sites, localities, and GenBank accession numbers of specimens analysed.

Species	Biome/Country	Locality	Coordinates	Genbank Acc. N°
<i>Artibeus fimbriatus</i> *	Atlantic RF	Gaspar	26°55'S 48°57'W	DQ903820
<i>Artibeus lituratus</i> *	Atlantic RF	Porto Belo	27°09'S 48°33'W	DQ903819
<i>Artibeus ac. obscurus</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903818
<i>Chiroderma villosum</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903823
<i>Desmodus rotundus</i> *	Atlantic RF	Itaiópolis	26°20'S 49°54'W	DQ903817
<i>Diphylla ecaudata</i> *	Atlantic RF	Blumenau	26°55'S 49°03'W	DQ903813
<i>Glossophaga soricina</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903831
<i>Micronycteris megalotis</i>	Atlantic RF	Gov. Celso Ramos	27°18'S 48°33'W	DQ903812
<i>Mimon benneti</i>	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903832
<i>Platyrrhinus lineatus</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903827
	Atlantic RF	Porto Belo	27°09'S 48°33'W	DQ903826
<i>Pygoderma bilobatum</i> *	Atlantic RF	Blumenau	26°55'S 49°03'W	DQ903821
	Atlantic RF	Blumenau	26°55'S 49°03'W	DQ903822
<i>Sturnira lillium</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903814
	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903815
<i>Sturnira tildae</i> *	Atlantic RF	Sto. Amaro da Imperatriz	27°41'S 48°46'W	DQ903816
<i>Tonatia bidens</i>	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903829
<i>Tonatia silvicola</i> *	Cerrado-Amazon **	Palmeirante	07°51'S 47°55'W	DQ903830
<i>Trachops cirrosus</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903828
<i>Vampyressa pusilla</i> *	Atlantic RF	Sto. Amaro da Imperatriz	27°41'S 48°46'W	DQ903825
	Atlantic RF	Gov. Celso Ramos	27°18'S 48°33'W	DQ903824
	Country	Authors	Coordinates	GenBank Acc. N°
<i>Ardops nicholls</i>	Antilhas	Carstens, BC. <i>et al.</i> (2004)	12°15'N 68°45'W	AY572337
<i>Ametrida centurio</i> *	-	Davalos LM. unpubl. data	-	AY604446
<i>Ariteus flavescens</i>	-	Davalos LM. unpubl. data	-	AY604436
<i>Brachyphylla pumila</i>	-	Davalos LM. unpubl. data	-	AY620450
<i>Carollia perspicillata</i>	-	Baker RJ & Hoffman BC. unpubl. data	-	AF511984
<i>Centurio senex</i>	-	Davalos LM. unpubl. data	-	AY604444
<i>Chiroderma doriae</i>	Brazil	Hoffmann <i>et al.</i> (2003)	23°32'S 46°37'W	AY169958
<i>Ectophylla alba</i>	Panama	Hoofer and Baker (2006)	9°00'N 80°00'W	DQ312401
<i>Erophylla bombifrons</i>	-	Davalos LM, unpubl. data	-	AY620438
<i>Lionycteris spurrelli</i>	-	Davalos (2004)	-	AF423100
<i>Lonchophylla mordax</i>	-	Davalos (2004)	-	AF423095
<i>Macrotus waterhousii</i> *	-	Porter <i>et al.</i> , unpubl. data	-	AY380745

<i>Mesophylla macconnelli</i>	Ecuador	Hoofer and Baker (2006)	2°00'S 77°30'W	DQ312422
<i>Monophyllus redmani</i>	-	Hoffmann and Baker (2001)	-	AF382888
<i>Phyllonycteris aphylla</i>	-	Wright <i>et al.</i> (1999)	-	AF187033
<i>Phyllops falcatus</i> *	-	Davalos, unpubl. data	-	AY604450
<i>Platalina genovensium</i>	Peru	Davalos (2004)	10°00'S 76°00'W	AF423101
<i>Platyrrhinus helleri</i>	Bolívia	Hoofer and Baker (2006)	14°37'S 60°45'W	DQ312408
<i>Rhinophylla pumilio</i> *	French Guiana	Hoofer and Baker (2006)	00°N 53°00'W	DQ312397
<i>Sphaeronycteris toxophyllum</i> *	-	Davalos LM. unpubl. data	-	AY604452
<i>Stenoderma rufum</i> *	Puerto Rico	Hoofer and Baker (2006)	18°15'N 66°30'W	DQ312400
<i>Trachops cirrhosus</i>	Ecuador	Fonseca <i>et al.</i> , in press	2°00'S 77°30'W	DQ233669
<i>Uroderma bilobatum</i> *	Panama	Hoffmann <i>et al.</i> (2003)	9°00'N 80°00'W	AY169955
<i>Vampyroides caraccioli</i> *	-	Hoofer and Baker (2006)	-	DQ312407
<i>Furipterus horrens</i> *	-	Davalos, 2005	-	AY621004

<i>Noctilio leporinus</i> *	Mexico	Lewis-Oritt <i>et al</i> (2001a)	19°25'N 99°10'W	AF330801
<i>Pteronotus personatus</i> *	Mexico	Lewis-Oritt <i>et al</i> (2001b)	19°25'N 99°10'W	AF338680
Species	Biome/Country	Locality	Coordinates	GenBank Acc. Nº
<i>Artibeus fimbriatus</i> *	Atlantic RF	Gaspar	26°55'S 48°57'W	DQ903835
<i>Artibeus lituratus</i> *	Atlantic RF	Porto Belo	27°09'S 48°33'W	DQ903837
<i>Artibeus ac. obscurus</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903836
<i>Chiroderma villosum</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903842
<i>Chrotopterus auritus</i>	Atlantic RF	Blumenau	26°55'S 49°03'W	DQ903851
<i>Desmodus rotundus</i> *	Atlantic RF	Itaiópolis	26°20'S 49°54'W	DQ903833
<i>Diphylla ecaudata</i> *	Atlantic RF	Blumenau	26°55'S 49°03'W	DQ903834
<i>Mimon crenulatum</i>	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903850
<i>Platyrrhinus lineatus</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903841
	Atlantic RF	Porto Belo	27°09'S 48°33'W	DQ903840
<i>Pygoderma bilobatum</i> *	Atlantic RF	Blumenau	26°55'S 49°03'W	DQ903838
	Atlantic RF	Blumenau	26°55'S 49°03'W	DQ903839
<i>Sturnira lillium</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903846
	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903848
	Atlantic RF	Porto Belo	27°09'S 48°33'W	DQ903845
<i>Sturnira tildae</i> *	Atlantic RF	Sto. Amaro da Imperatriz	27°41'S 48°46'W	DQ903847
<i>Tonatia silvicola</i> *	Cerrado-Amazon **	Palmeirante	07°51'S 47°55' W	DQ903849
<i>Trachops cirrosus</i> *	Cerrado	Colinas do Sul	14°09'S 48°04'W	DQ903852
<i>Vampyressa pusilla</i> *	Atlantic RF	Sto. Amaro da Imperatriz	27°41'S 48°46'W	DQ903844
	Atlantic RF	Gov. Celso Ramos	27°18'S 48°33'W	DQ903843
Species	Country	Authors	Coordinates	GenBank Acc. Nº
<i>Ametrida centurio</i> *	French Guiana	Baker <i>et al.</i> (2000)	00° N, 53° 00'W	AF316430
<i>Anoura geoffroyi</i>	El Salvador	Baker <i>et al.</i> (2000)	13°50'N 88°55'W	AF316431
<i>Glossophaga soricina</i> *	Venezuela	Baker <i>et al.</i> (2000)	8°00'N 66°00'W	AF316452
<i>Macrotus waterhousii</i> *	Cuba	Baker <i>et al.</i> (2000)	21°30'N 80° 00'W	AF316461
<i>Phylloderma stenops</i>	Suriname	Baker <i>et al.</i> (2000)	04° 44'N 56°12'W	AF316480
<i>Phyllops falcatus</i> *	-	-	-	AY604453
<i>Rhinophylla pumilio</i> *	French Guiana	Baker <i>et al.</i> (2000)	00° N 53° 00'W	AF316484
<i>Sphaeronycteris toxophyllum</i> *	Peru	Baker <i>et al.</i> (2000)	10°00'S 76°00'W	AF316486
<i>Stenoderma rufum</i> *	Puerto Rico	Baker <i>et al.</i> (2000)	18° 19'N 65°49'W	AF316487
<i>Uroderma bilobatum</i> *	El Salvador	Baker <i>et al.</i> (2000)	13°50'N 88°55'W	AF316491
<i>Vampyrodes caraccioli</i> *	Trinidad	Baker <i>et al.</i> (2000)	11°00'N 61°00'W	AF316494
<i>Furipterus horrens</i> *	-	Hoofer <i>et al</i> (2003)	-	AY141016
<i>Noctilio leporinus</i> *	Mexico	Lewis-Oritt <i>et al</i> (2001a)	19°25'N 99°10'W	AF330814
<i>Pteronotus personatus</i> *	Mexico	Lewis-Oritt <i>et al</i> (2001b)	19°25'N 99°10'W	AF338699

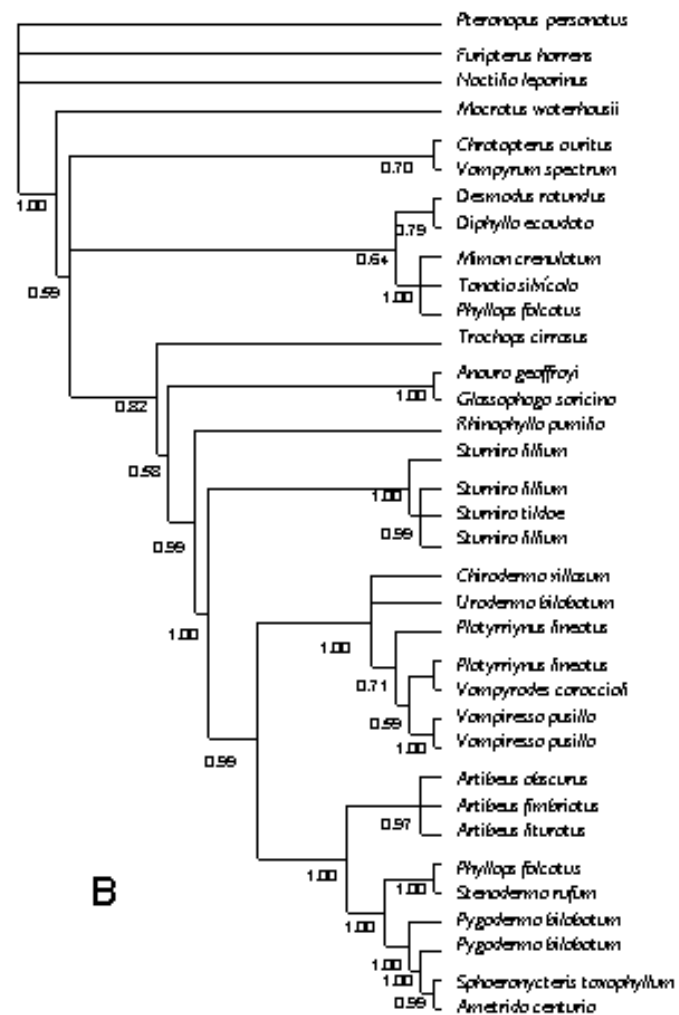
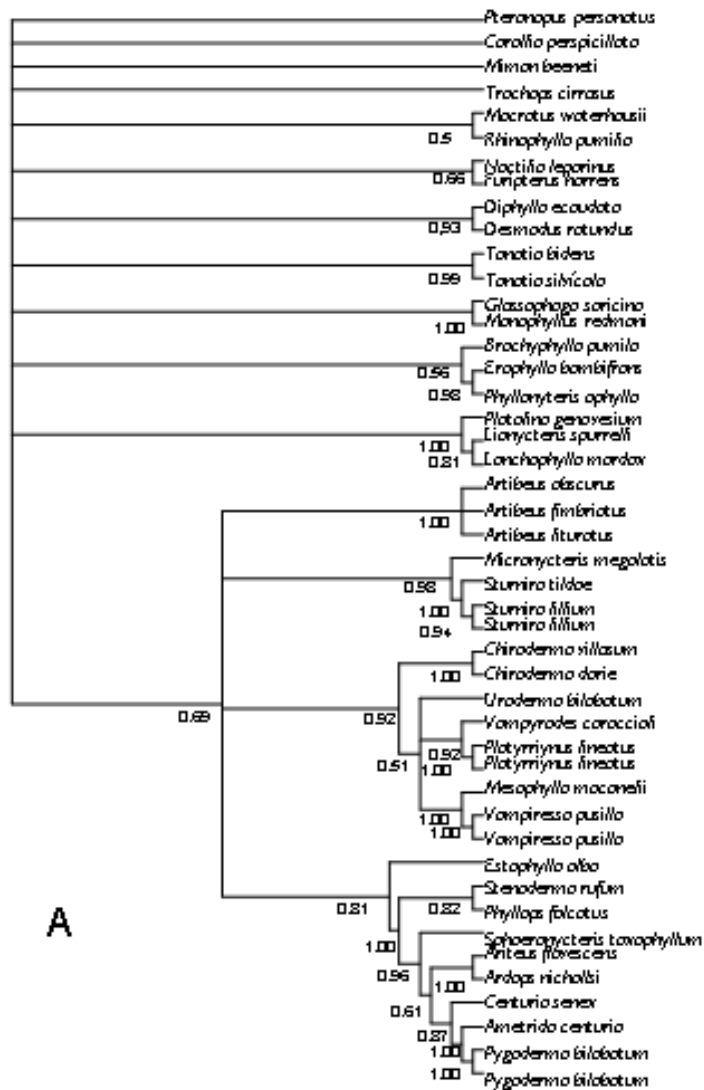
*specimens utilized in the combined analysis; when the coordinates of the localities of collect of the GenBank sequences were not located, the coordinates of the capital of the country were utilized; Atlantic RF = Atlantic Rain Forest **Cerrado-Amazon transition.

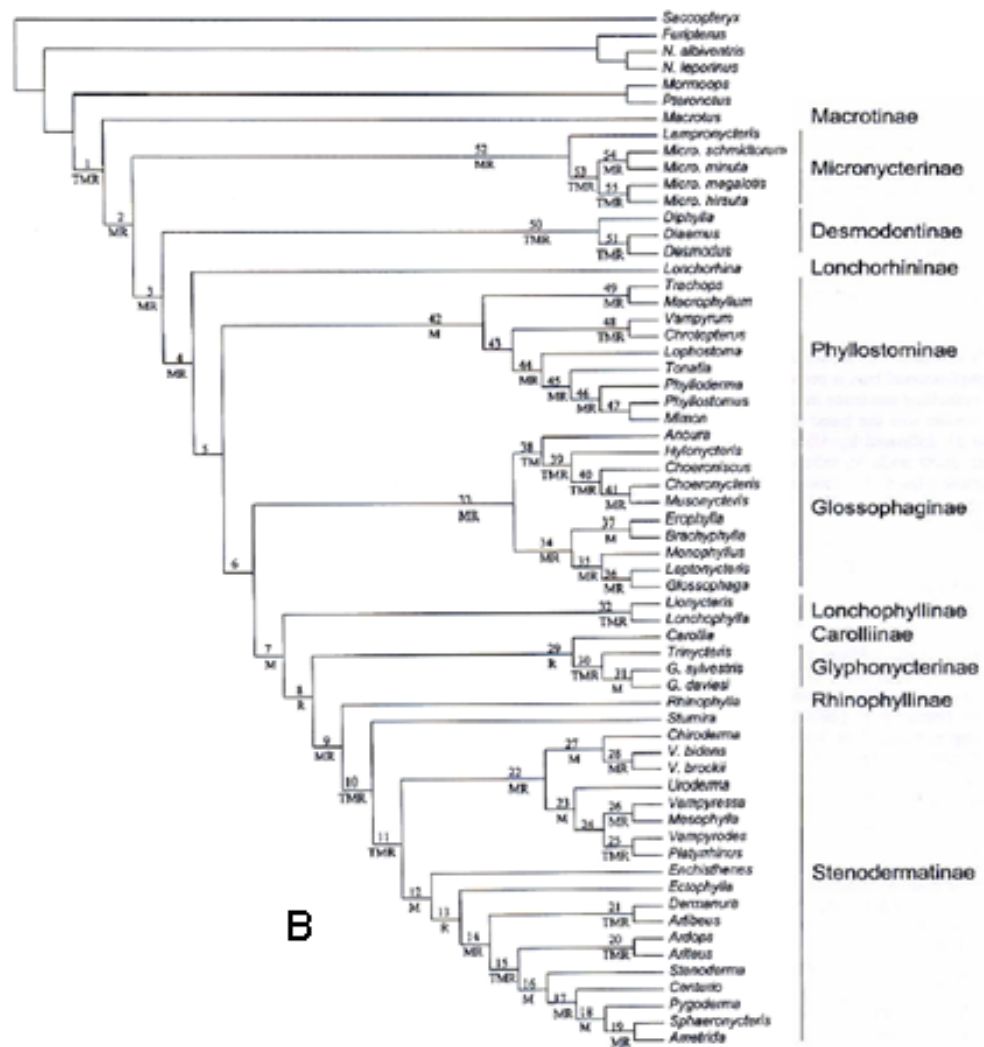
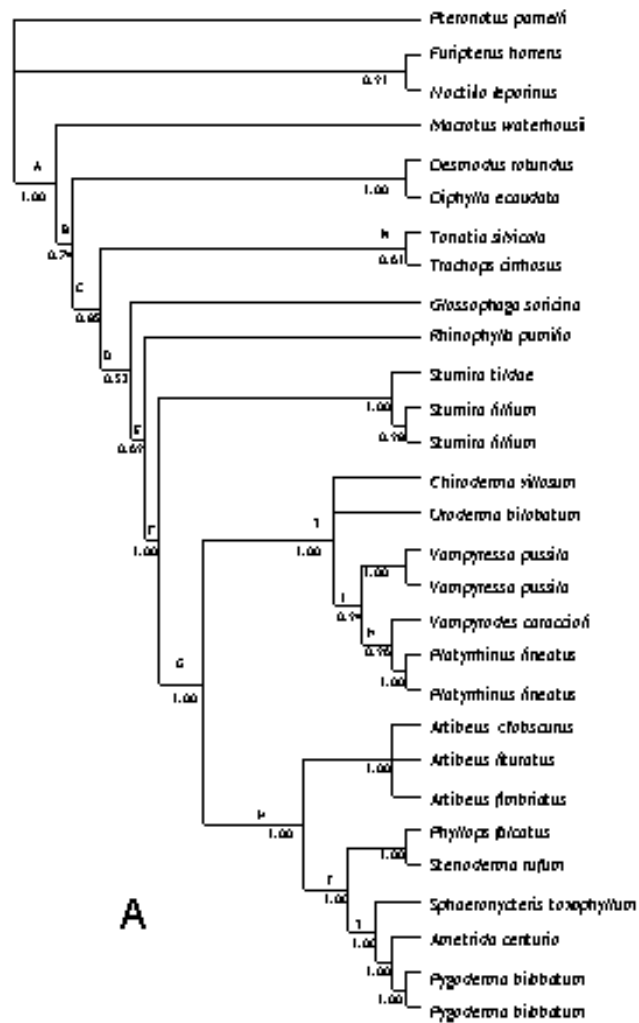
***Porter CA, Hoofer SR, Cline CA, Hoffmann FG, Baker RJ. Unpublished

FIGURE LEGENDS

Figure 1: A) Bayesian analysis tree for cytochrome *b* gene. Likelihood settings from best-fit model (GTR+I+G) selected by hLRT: Lset Base=(0.3837 0.3647 0.0620) Nst=6 Rmat=(0.2724 5.4353 0.5994 0.3884 10.7232) Rates=gamma Shape=0.4763 Pinvar=0.4352. Numbers above branches are posterior probabilities values. B) Bayesian analysis tree for RAG2 gene. Likelihood settings from best-fit model (K80+G) selected by hLRT (Lset Base=equal Nst=2 TRatio=3.0666 Rates=gamma Shape=0.3396 Pinvar=0). Numbers above branches are posterior probabilities values.

Figure 2: A) Results from Bayesian analysis of concatenated *cyt b* and RAG2 genes. Likelihood settings from best-fit model (GTR+I+G) selected by hLRT. Lset Base=(0.2980 0.2885 0.1806) Nst=6 Rmat=(2.2294 3.8488 1.0797 0.4228 14.8018) Rates=gamma Shape=0.4488 Pinvar=0.4149. Numbers above branches are posterior probabilities values. B) Figure adapted from Fig. 5A and 5B from Baker *et al.* (2003).





- Macrotinae
- Micronycterinae
- Desmodontinae
- Lonchorhininae
- Phyllostominae
- Glossophaginae
- Lonchophyllinae
- Carollinae
- Glyphonycterinae
- Rhinophyllinae
- Stenodermatinae

DISCUSSÃO

A família Phyllostomidae, cujo primeiro gênero reconhecido foi *Phyllostomus* por LACÉPÈLE (1799) é a mais diversificada dos morcegos neotropicais, com mais de 160 espécies, apresentando, como uma característica marcante a presença de um apêndice nasal, conhecido também como “folha nasal” (NOWAK, 1999). Este clado também é extremamente diverso em termos de adaptações morfológicas correlacionadas aos hábitos alimentares

Além de várias questões taxonômicas para Phyllostomidae, as relações evolutivas dentro da família têm sido extensivamente discutidas na literatura, sendo que um breve resumo dos mesmos será descrito a seguir.

Os primeiros trabalhos que visavam tentar esclarecer estas relações foram baseados em caracteres morfológicos, destacando-se o trabalho de MILLER (1907), um dos primeiros estudos sobre as relações entre subfamílias. Este autor incluiu, por exemplo, Mormoopidae (então Chilonycterinae) dentro de Phyllostomidae e considerou Desmodontidae como uma família à parte. A seguir, DE LA TORRE (1961), baseado em caracteres cranianos e morfológicos, descreve extensivamente as relações dentro dos Phyllostomidae, sugerindo que Phyllostominae representaria o ramo mais basal da família. Já SLAUGHTER (1970) propõe, baseado na evolução dos caracteres dentais, entre outras relações, que *Brachyphylla* e *Sturnira* são os gêneros que apresentam as características mais primitivas. Também reconhece duas linhagens dentais entre os Desmodontinae: *Diphylla* (a mais basal) e *Desmodus* (a mais derivada). SMITH (1976) analisa dados já publicados de caracteres dentais, imunológicos, cariológicos, pós-cranianos e parasitológicos em uma tentativa de

montar um cladograma para Phyllostomidae, no qual as subfamílias Phyllostominae e Glossophaginae não se apresentaram monofiléticas.

MACDANIEL (1976) trabalhando com anatomia cerebral, reconhece Phyllostomatinae como a subfamília mais basal.

OWEN (1987, 1991), utilizando caracteres discretos e contínuos de medidas craniodentais e caracteres externos, apresentou uma chamada “melhor hipótese filogenética” para os stenodermatíneos enfatizando o gênero *Artibeus*, que considera como não monofilético e sugerindo que os pequenos *Artibeus* fossem agrupados em um gênero próprio – *Dermanura*. Além disso, propõe que *Enchisthenes* seja considerado um gênero próprio e que *Dermanura concolor* seja colocado em um novo gênero - *Koopmania*. Em uma re-análise dos dados de OWEN (1991), LIM (1993) obtém uma árvore muito diferente das do trabalho original, sugerindo que estes resultados devem ser vistos com muito cuidado.

Já há bastante tempo outras ferramentas foram empregadas para o esclarecimento das relações filogenéticas dentro da família. GERBER e LEONE (1971), utilizando comparações imunológicas, obtiveram, assim, entre outras conclusões, que os Desmodontinae representavam uma subfamília de filostomídeos e *Sturnira* pertenceria à Stenodermatinae. Já STRANEY *et al.* (1979) usam dados de alozimas para produzir o que chamam de “estimativa filogenética” das relações entre vários gêneros (*Ametrida*, *Anoura*, *Artibeus* (*Dermanura*) *cinereus*, *Artibeus jamaicensis*, *A. lituratus*, *Carollia*, *Chiroderma*, *Desmodus*, *Glossophaga*, *Phyllostomus*, *Sturnira*, *Uroderma* e *Vampirops* [= *Platyrrinus*]). HONEYCUTT e SARICH (1987) utilizando dados imunológicos da albumina encontraram que *Macrotus* é o Phyllostominae mais divergente e, associado com os Desmodontinae, forma a linhagem mais basal dos Phyllostomidae.

A partir da década de 1960, o avanço metodológico por meio de preparações de medula e cultura de células e o desenvolvimento de técnicas de bandamento nos anos 70 permitiram a marcação diferencial de regiões cromossômicas. Com a descoberta que as diferenças encontradas quanto à quantidade e distribuição dos rearranjos cromossômicos entre diferentes táxons, bem como os diferentes padrões

encontrados em determinados grupos podem ser traçados e utilizados para auxiliar a interpretação dos relacionamentos entre espécies (QUIMISIYEH & BAKER, 1988), a ferramenta empregada passa a ser a análise cromossômica.

Assim, em 1973 BAKER *et al.* utilizam a morfologia cromossômica para resolver as relações entre os Stenodermatinae, propondo que o cariótipo primitivo para estes morcegos seria similar ao de *Artibeus*, *Sturnira*, *Vampyrodes* e *Vampyrops* (= *Platyrrinus*). GARDNER (1977a) apresenta uma árvore “arbitrariamente derivada” para os filostomídeos baseada em similaridades cromossômicas e hipotetiza que Desmodontinae, Phyllostominae, Carolinae e Stenodermatinae são taxa monofiléticos. Além destes, surgem os trabalhos de SMITH (1976) e o estudo de PATTON e BAKER (1978) que, utilizando bandeamento G, propõem que o cariótipo de *Macrotus waterhousii* seria o primitivo dos Phyllostomidae.

Já BAKER *et al.* (1989), incorporando aos dados cromossômicos, dados prévios de imunologia e morfológicos, excluíram os mormopídeos de Phyllostomidae, incluíram Desmodontinae e propuseram, também, o reconhecimento das subfamílias Vampyrinae e Phyllostominae. Neste mesmo trabalho, os gêneros *Macrotus* e *Micronycteris* (sensu lato) foram excluídos de Phyllostominae e transpostos para *incertae sedis*.

Atualmente, técnicas moleculares como hibridização *in situ*, destacando-se a técnica de hibridização fluorescente *in situ* transformaram-se em ferramenta importante para a análise não apenas estrutural e funcional, mas também evolucionária dos cromossomos (MANDRIOLI *et al.*, 1999). Surgem então trabalhos como o de PIECZARKA *et al.* (2005) que produziram sondas específicas para duas espécies brasileiras *Phyllostomus hastatus* e *Carollia brevicauda*, utilizando então pinturas cromossômicas recíprocas, concluindo que esta técnica é muito útil para estudar relações filogenéticas entre Phyllostomidae e FARIA & MORIELLE-VERSUTE (2006) utilizando bandas G e ZOO-FISH estudaram sete espécies de Chiroptera pertencentes às famílias Phyllostomidae e Mollossidae concluindo que as homologias e rearranjos cromossômicos observados reforçam a hipótese da monofilia do grupo. Os mesmos autores concluem também que a técnica de ZOO-

FISH falha em detectar diferenças intracromossômicas entre as espécies estudadas, mas confirma a conservação do DNA durante a evolução cromossômica.

O surgimento, a partir da década de 70 do século XX, de metodologias capazes de decifrar as seqüências de DNA, como eletroforese, reações de hibridação e seqüenciamento, aliado à implantação da técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase) disponibilizou um potente arsenal tecnológico para poder utilizar as variações das seqüências de DNA do núcleo ou de organelas como marcadores informativos para os mais diversos estudos (MATTEVI, 2003), permitindo assim que na década de 90 surgissem as primeiras análises empregando ferramentas moleculares.

VAN DEN BUSSCHE (1991) analisou dados de sítios de restrição do DNA ribossômico, mas encontrou poucos caracteres informativos e a grande quantidade de homoplasia observada impediu de construir uma hipótese de relações baseada nestes dados, acabando por incluir em sua análise dados de filogenias anteriores.

Já WETTERER *et al.* (2000), utilizou dados morfológicos, cromossômicos e de sítios de restrição, totalizando 150 caracteres para montar sua árvore de “evidência total”. Seus resultados indicaram que todas as subfamílias tradicionalmente reconhecidas são monofiléticas e que a maioria dos taxa que compartilham hábitos alimentares agrupam-se em clados. Este trabalho propõe, ainda, entre outras conclusões, que se redefina Glossophaginae, a inclusão de Glossophagini e Lonchophyllini nesta subfamília, divida-se os Phyllostominae em tribos (Lonchorrhinini, Micronycterini, Phyllostomini e Vampyrini) e reconheça-se formalmente, dentro dos Stenodermatinae, a tribo Stenodermatini, já proposta anteriormente por vários autores. A novidade da subdivisão desta última em duas subtribos, Stenodermatina (“short-faced”) e Ectophyllina (“long-faced”). Além disso, propõe que a afirmação de que *Macrotus* apresenta o cariótipo primitivo para os Phyllostomidae deva ser revisada.

BAKER *et al.* (2000) utilizam dados de seqüências do gene nuclear RAG2 para discutir a filogenia do grupo, encontrando algumas pequenas discrepâncias entre seus resultados e os da literatura. Concluíram que, apesar de RAG2 ser um

bom marcador para o estudo de relações filogenéticas dos Phyllostomidae por sua função na resposta imunológica não se encontrar ligada às feições morfológicas relacionadas aos hábitos alimentares, podendo mascarar algumas destas relações, a utilização de apenas um gene para propor mudanças taxonômicas pode ser inapropriada.

BAKER *et al.* (2003), por sua vez, em uma análise concatenada dos genes mitocondrial citocromo b e RAG2 e por meio de inferência Bayesiana, propuseram inúmeras novas categorias (muitas não nomeadas) e subcategorias (p. ex. subtribos) para refletir as relações filogenéticas encontradas por eles, dividindo, por exemplo, a família em 11 subfamílias (Macrotinae, Micronycterinae, Desmodontinae, Lonchorhininae, Carollinae, Glyphonycterinae, Rhynophyllinae e Stenodermatinae). Esta classificação, no entanto, é considerada por GREGORIN e TAVARES (*in press*) precipitada e não necessariamente reflete resultados filogenéticos.

Existem, ainda, trabalhos específicos para determinadas subfamílias e tribos, dentre eles os recentes trabalhos de PORTER & BAKER (2004) que analisa as relações entre as espécies de *Vampyressa* com outros gêneros relacionados utilizando o gene citocromo b; DAVALOS & JANSA (2004) que utilizam 150 caracteres gerados a partir de marcadores morfológicos, cromossômicos e moleculares analisando as relações dentro da tribo Lonchophyllinae; e o de HOOFER e BAKER (2006) que investigam as relações entre os membros da tribo Vampyressina (Stenodermatinae), utilizando para isso seqüências dos genes citocromo b e ND3-ND4.

Especificamente com o gênero *Artibeus*, gênero este investigado nesta tese, MARQUES-AGUIAR (1994) realizou uma extensa revisão sistemática com inferências filogenéticas em espécies de grandes *Artibeus* e VAN DEN BUSSCHE *et al.* (1998) examinou seqüências completas do gene do citocromo b em 26 espécies de *Artibeus* e, entre outras conclusões, concorda com o reconhecimento de *Enchisthenes* como gênero distinto.

Apesar do enorme volume de trabalhos gerados utilizando os mais diversos marcadores, estes estudos não têm alcançado um consenso quanto às relações de

parentesco em vários níveis (desde o subfamiliar ao genérico) com conseqüente variação nos arranjos classificatórios e a monofilia de algumas dessas subfamílias, bem como a monofilia de muitos gêneros, especialmente *Micronycteris*, *Mimon*, *Phyllostomus*, *Artibeus* e *Vampyressa* (WETTERER *et al.*, 2000). O único consenso parece ser com relação ao monofiletismo da família em si, consensualmente evidenciado por vários estudos. Além disso, estes trabalhos concentram suas amostras em regiões da América Central e Norte da América do Sul, ficando as demais regiões da distribuição de muitas espécies, sub-amostradas.

Este trabalho visou melhorar a representatividade destes estudos, incluindo morcegos brasileiros até então praticamente ausentes nestas análises moleculares, enfocando as relações entre espécies de morcegos pertencentes à família Phyllostomidae (Anexo 1), utilizando seqüências dos genes mitocondrial citocromo b e nuclear RAG2. O foco desta tese foi testar se a inclusão destas espécies de morcegos, coletadas ao sul do paralelo 07°S na região Neotropical, alteram ou não as relações descritas para esta família, para a subfamília Stenodermatinae e, especificamente para o gênero *Artibeus*, quando comparadas aos estudos que analisam apenas representantes da América Central ou porção Norte da América do Sul. Além disso, visou também estudar a variação genética e possível estruturação geográfica de algumas espécies estudadas.

Inicialmente estudamos 25 seqüências de 19 espécies pertencentes a 14 gêneros de filostomídeos, obtidos em 8 pontos de coleta distintos e analisadas junto com 27 seqüências da literatura, além de 2 outgroups (Capítulo V). No geral, os resultados obtidos com a análise combinada dos dois genes seqüenciados apresentou a melhor resolução filogenética, discutindo-se agora, então, apenas estes resultados.

Na base da árvore situou-se o gênero *Macrotus*. Esta posição basal já foi descrita por inúmeros autores com os mais diversos marcadores (veja revisão em WETTERER *et al.*, 2000).

A seguir encontra-se o clado formado por *Diphylla* e *Desmodus*. Este clado é reconhecido como Desmodontinae por BAKER *et al.* (2003) e considerado por

WETTERER *et al.* (2000) e SIMMONS *et al.* (2005b) como o ramo mais basal da família Phyllostomidae.

O próximo clado une duas espécies - *Tonatia silvcola* e *Trachops cirrhosus*, e, logo a seguir, no próximo nodo coloca-se a espécie *Glossophaga soricina*, que, na análise realizada apenas com o gene RAG2 agrupou-se ainda com *Anoura geoffroyi*.

No próximo ramo situou-se *Rhinophyla pumilio* e, na seqüência, um clado formado pelos representantes da subfamília Stenodermatinae.

As relações dentro da subfamília Stenodermatinae foram descritas mais detalhadamente no capítulo V desta tese. Neste artigo testamos as diferentes hipóteses de agrupamento dentro dos Stenodermatinae pela análise das relações entre 10 espécies e 7 gêneros, tendo por base 28 seqüências, 13 de citocromo b e 14 de RAG2 oriundos de seis pontos de coleta distintos, representando os biomas brasileiros Mata Atlântica e Cerrado, regiões sub-amostradas em outras análises filogenéticas.

Nesta análise, pode-se observar a existência de três clados. O primeiro, mais basal, agrupa apenas espécies do gênero *Sturnira* (*S. lillium* e *S. tildae*).

O segundo clado inclui os gêneros *Chiroderma*, *Vampyressa*, *Uroderma*, *Vampyrodes* e *Platyrrhinus*.

O último clado apresenta um ramo representado por *Enchisthenes hartii* e, então, se divide em dois grupos-irmãos, o primeiro incluindo os gêneros *Ametrida*, *Pygoderma*, *Sphaeronycteris*, *Stenoderma* e *Phyllops*. Neste grupo há ainda uma subdivisão, separando os gêneros *Phyllops* e *Stenoderma* dos demais gêneros.

O grupo irmão é formado por dois subgêneros (*Artibeus* e *Dermanura*), pertencentes ao gênero *Artibeus* Leach, 1821, um grupo heterogêneo de espécies, melhor discutido no capítulo III, onde analisamos o gene mitocondrial citocromo b e o nuclear RAG2 de 39 espécimes pertencentes a 5 espécies de *Artibeus*: *A. fimbriatus*, *A. lituratus*, *A. planirostris*, *A. obscurus* e *Artibeus sp*, obtidos em 14 pontos de coleta do território brasileiro de dois biomas diferentes (Cerrado e Mata Atlântica) além de 18 representantes de 6 espécies de *Artibeus* do GenBank pertencentes a 10 localidades diversas da América do Sul e 4 outgroups.

Nestas análises, a espécie *A. concolor* que, para a maioria dos autores, não pertence aos “grandes” *Artibeus*, mas classificada por LIM *et al.* (2004) como pertencente a este grupo, sendo por isso acrescentada nesta análise, ocupou a posição mais basal, seguido por um clado formado por *A. obscurus* e seu grupo irmão *Artibeus* sp.

A seguir um clado formado por *A. hirsutus*, *A. inopinatus* e *A. fraterculus* e no próximo ramo encontra-se *A. fimbriatus*, e, logo após, *A. jamaicensis* que se pode dizer que ocupa uma posição intermediária, também observada nos estudos de VAN DEN BUSSCHE *et al.* (1998), LIM *et al.* (2004) e GUERRERO *et al.* (2004).

Já *A. lituratus*, *A. amplus* e *A. planirostris* estão entre as espécies mais derivadas.

Em resumo, os clados e as relações obtidas pela análise combinada de citocromo b e RAG2 estão de acordo com o trabalho de BAKER *et al.* (2003) e também, no geral, com a classificação mais recente proposta por SIMMONS (2005b). Diverge desta última, sobretudo no que concerne à inclusão de *Macrotus* como Phyllostominae, já que isto exigiria que considerássemos esta subfamília como não monofilética.

As relações entre os Desmodontinae, Phyllostominae (se não considerarmos *Macrotus*) e Glossophaginae também estão de acordo com a literatura.

No que se refere a *Rhinophylla pumilio*, a ausência de gêneros como *Carollia* em nossa análise nos impedem de inferir mais profundamente sobre seu status taxonômico.

Dentro dos Stenodermatinae, as espécies do gênero *Sturnira* representam a linhagem mais basal. Sua classificação taxômica foi muitas vezes revisada, mas em estudos recentes existe um consenso de que sejam colocadas em uma tribo própria, Sturnirini, o que é corroborado por nossos dados.

Nossas análises indicaram, também, que os morcegos denominados de “short-faced” (devido à extrema compressão antero-posterior do crânio) formam um grupo distinto sendo incluídos neste grupo estão os gêneros *Ametrida*, *Pygoderma*, *Sphaeronycteris*, *Stenoderma* e *Phyllops*. Neste grupo há ainda uma subdivisão,

separando os dois gêneros endêmicos de ilhas nas Antilhas menores (*Phyllops* e *Stenoderma*) dos demais gêneros *Sphaeronycteris*, *Pygoderma* e *Ametrida*, que apresentam distribuições continentais, com ocorrência entre as Américas do Sul e/ou Central. Além disso, *Phyllops* e *Stenoderma* encontraram-se sempre associados, independente da análise realizada, enquanto os taxa *Sphaeronycteris*, *Pygoderma* e *Ametrida*, no entanto, apresentaram diferenças entre as árvores geradas.

No que se refere ao outro grupo encontrado para os Stenodermatinae (o grupo dos *Artibeus*), as relações encontradas estão de acordo com a maioria dos trabalhos que discutem a filogenia de *Artibeus* como o de MARQUES-AGUIAR (1994) e o de VAN DEN BUSSCHE *et al.* (1998). Vale a pena destacar, no entanto, a posição basal observada para *A. obscurus*, que diverge da encontrada em outras análises filogenéticas feitas nas quais *A. obscurus* apresenta-se como um taxon mais derivado de *Artibeus* (MARQUES-AGUIAR, 1994; VAN DEN BUSSCHE *et al.*, 1998; GUERRERO *et al.*, 2003, 2004; LIM *et al.*, 2004). Aparentemente, com a inclusão na análise filogenética que fizemos de exemplares representantes do sul da distribuição da espécie, a presença de *Artibeus* sp parece modificar as relações de *A. obscurus* com as outras espécies do gênero.

Além disso, nossos resultados indicam que *Artibeus* sp, possa ser uma nova espécie, já que formou um agrupamento próprio e com uma divergência genética relativamente alta. Para maiores conclusões, no entanto, são necessários mais estudos de morfologia e um aumento no número de amostras, mas, independente do status taxonômico, é provável que *Artibeus* sp represente uma diferenciação regional recente dentro do limite sul da área de distribuição de *A. obscurus*.

Destaca-se também o fato de que *Artibeus planirostris* e *A. jamaicensis* colocarem-se em posições distintas da árvore, o que reforça os últimos trabalhos que descrevem *A. planirostris* como uma espécie plena e não uma subespécie de *A. jamaicensis*, como se acreditava até recentemente. Notar que os espécimes coletados no Cerrado pertencem à espécie *A. planirostris*.

Quanto à diversidade genética e a possível estruturação geográfica das populações de *A. lituratus* e *A. fimbriatus*, ambas apresentaram grande variabilidade

genética e baixa divergência entre as seqüências, diferindo, no entanto, quanto aos possíveis padrões de estruturação.

Em *A. lituratus*, praticamente todos os indivíduos estudados apresentaram haplótipos distintos, com exceção de um único haplótipo compartilhado entre espécimes da Mata Atlântica e do Cerrado, sendo que os resultados das análises de mismatch, teste de neutralidade de Tajima, AMOVA e a conformação do network sugerem que, provavelmente, este haplótipo compartilhado seja resultado da expansão de suas populações.

Já para *A. fimbriatus*, a análise também indica expansão populacional, mas a adição na análise de um indivíduo de São Paulo parece sugerir um padrão de estruturação geográfica para esta espécie dentro da Mata Atlântica. Divergência geográfica já foi também relatada em outras espécies de filostomídeos por DITCHFIELD (2000). No caso de *A. fimbriatus* é necessário, no entanto, um aumento no número amostral para que este padrão populacional possa ser afirmado com segurança.

No que se refere especificamente aos marcadores utilizados, podemos observar que o gene mitocondrial citocromo b foi bastante eficiente para detectar relações filogenéticas no nível intragenérico como se pode observar nas árvores geradas para as análises realizadas no gênero *Artibeus*. Para análises em níveis taxonômicos mais elevados, como a realizada com a família Phyllostomidae, no entanto, este marcador só foi capaz de diferenciar a subfamília Stenodermatinae, mesmo assim, com relações controversas. Isto sugere que este marcador seja limitado em termos de resolução para estudos de níveis taxonômicos superiores, provavelmente pela saturação de alguns tipos de mutações, fato este, observado também, por BAKER *et al.* (2000).

Já o gene nuclear RAG2 apresentou uma resolução muito boa para o estudo dos Phyllostomidae, provavelmente por evoluir mais lentamente que o citocromo b e por sua função na resposta imunológica provavelmente não estar ligada às feições morfológicas que freqüentemente são critérios diagnósticos para a taxonomia do grupo. Provavelmente pelo mesmo motivo, este marcador demonstrou-se ineficaz na

tentativa de desvendar as relações genéticas entre as espécies de morcegos do gênero *Artibeus* possivelmente pelo surgimento relativamente recente do gênero.

Neste trabalho, pudemos concluir que, ao compararmos os trabalhos realizados com espécies de Phyllostomidae e Stenodermatinae coletadas, em geral, na América Central e norte da América do Sul, com espécies provenientes do território brasileiro, utilizando-se para isso os mesmos marcadores, não se observa diferenças significativas.

Especificamente em relação aos Stenodermatinae, os estudos moleculares que realizamos, mostraram que esta subfamília agrupa os morcegos das tribos Sturnirini (BAKER *et al.*, 2003 e SIMMONS, 2005b) e Stenodermatini (SIMMONS, 2005), que, por sua vez subdividiram-se em dois subgrupos, correspondentes à tribo Stenodermatini - sub-tribo Vampyressina e à tribo Mesosternodermatinae, sub-tribo Artibeina e sub-tribo Stenodermatina de BAKER *et al.* (2003), indicando que, apesar da presença dos clados descritos em outros trabalhos, estes não parecem estar nas mesmas categorias taxonômicas propostas por estas análises.

Além disso, nossos dados sobre o gênero *Artibeus* parecem corroborar os de DITCHFIELD (2000) que demonstram que em morcegos brasileiros a estruturação filogeográfica dentro das espécies é baixa, existindo alguma estrutura intra-específica em espécies como *Artibeus obscurus*. Algumas destas espécies também mostram, contudo, uma estruturação geográfica numa escala maior, o que pode indicar que os morcegos, devido a sua capacidade de voar, produzem um efeito de homogeneização que previne a existência de uma forte estruturação geográfica devido a altos níveis de fluxo gênico, como já foi observado nos estudos de DITCHFIELD & BURNS (1998).

ANEXO 1

**NÚMEROS DE COLEÇÃO, NÚMEROS DE ACESSO
(ENTRE PARÊNTESES) E LOCAL DE COLETA**

A. fimbriatus: FURB-SLA1104 (**DQ985478**, **DQ985528**), FURB-SLA468 (**DQ985479**, **DQ985510**), FURB-SLA969 (**DQ985477**, **DQ985526**) - Blumenau 26°55'S 49°03'W; FURB-SLA1013 (**DQ985527**), FURB-SLA739 (**DQ903820**, **DQ903835**) - Gaspar 26°55'S 48°57'W; FURB-SLA1580 (**DQ985476**, **DQ985533**) - Indaial 26°53'S 49°13'W; FURB-SLA930 (**DQ985500**, **DQ985525**)- Jacinto Machado 28°59'S 49°45'W; FURB-SLA1482 (**DQ985501**, **DQ985531**) - Jaraguá do Sul 26°29'S 49°04'W.

A. planirostris: AN1882 (**DQ985487**) – Palmeirante 07°51'S 47°55'W; MN36311 (**DQ985489**, **DQ985505**), MN36318 (**DQ985486**, **DQ985506**), MN36380 (**DQ985490**, **DQ985507**) - Colinas do Sul 14°09'S 48°04'W.

A. lituratus: MN36783 (**DQ985491**, **DQ985508**), MN36807 (**DQ985492**, **DQ985509**), MN36827 (**DQ985493**) - Colinas do Sul 14°09'S 48°04'W; FURB-SLA1110 (**DQ985485**, **DQ985529**) - Blumenau 26°55'S 49°03'W; FURB-SLA1575 (**DQ985532**) - Indaial 26°53'S 49°13'W; FURB-SLA581 (**DQ985484**, **DQ985511**), FURB-SLA641 (**DQ985494**, **DQ985512**), FURB-SLA657 (**DQ985495**, **DQ985513**) FURB-SLA754 (**DQ985496**, **DQ985516**), FURB-SLA756 (**DQ985517**) - Florianópolis 27°35'S 48°32'W; FURB-SLA924 (**DQ985499**, **DQ985524**) - Jacinto Machado 28°59'S 49°45'W; FURB-SLA884 (**DQ985483**, **DQ985520**), FURB-SLA889 (**DQ985521**), FURB-SLA890 (**DQ985480**, **DQ985522**) - Nova Veneza 28°38'S 49°29'52W; FURB-SLA822 (**DQ903819**, **DQ903837**); FURB-SLA844 (**DQ985519**) - Porto Belo 27°09'S 48°33'W; FURB-SLA922 (**DQ985523**) - Santa Rosa do Sul 29°08'S 49°42'W; FURB-SLA738 (**DQ985482**, **DQ985515**), FURB-SLA1113 (**DQ985530**) - Santo Amaro da Imperatriz 27°41'S 48°46'W; FURB-SLA658 (**DQ985481**, **DQ985514**) - Treze de Maio 28°33'S 49°08'W.

A. cf. obscurus: MN36263 (DQ985488, DQ985504), MN36388 (DQ903818, DQ903836) - Colinas do Sul 14°09'S 48°04'W; FURB-SLA841 (DQ985498) - Porto Belo 27°09'S 48°33'W.

Artibeus sp: FURB-SLA775 (DQ985497, DQ985518) - Gov. Celso Ramos 27°18'S 48°33'W, FURB-SLA1773 (DQ985502, DQ985534) FURB-SLA1835 (DQ985503, DQ985535), FURB-SLA1928 (DQ985536) FURB-SLA1928 (DQ985537) - Blumenau 26°55'S 49°03'W.

Chiroderma villosum: MN36375 (DQ903823, DQ903842) - Colinas do Sul 14°09'S 48°04'W.

Chrotopterus auritus : FURB-SLA1799 (DQ903851) - Blumenau 26°55'S 49°03'W.

Desmodus rotundus: FURB-SLA1355 (DQ903817, DQ903833) – Itaiópolis 26°20'S 49°54'W.

Diphylla ecaudata: FURB-SLA1298 (DQ903813, DQ903834) - Blumenau 26°55'S 49°03'W.

Glossophaga soricina: MN36857 (DQ903831) - Colinas do Sul 14°09'S 48°04'W.

Micronycteris megalotis: FURB-SLA809 (DQ903812) - Gov. Celso Ramos 27°18'S 48°33'W.

Mimon benneti: MN36387 (DQ903832) - Colinas do Sul 14°09'S 48°04'W.

Mimon crenulatum: MN36684 (DQ903850) - Colinas do Sul 14°09'S 48°04'W.

Platyrhynchus lineatus: MN36260 (DQ903827, DQ903841) - Colinas do Sul 14°09'S 48°04'W; FURB-SLA835 (DQ903826, DQ903840) - Porto Belo 27°09'S 48°33'W.

Pygoderma bilobatum: FURB-SLA964 (DQ903821, DQ903838); FURB-SLA965 (DQ903822, DQ903839) - Blumenau 26°55'S 49°03'W.

Sturnira lillium: MN36638 (DQ903814, DQ903846), MN36314 (DQ903815, DQ903848) - Colinas do Sul 14°09'S 48°04'W; FURB-SLA820 (DQ903845) - Porto Belo 27°09'S 48°33'W

Sturnira tildae: FURB-SLA1120 (DQ903816, DQ903847) - Sto. Amaro da Imperatriz 27°41'S 48°46'W.

Tonatia bidens: MN37301(DQ903829) - Colinas do Sul 14°09'S 48°04'W.

Tonatia silvicola: AN1918 (DQ903830, DQ903849) – Palmeirante 07°51'S 47°55'W

Trachops cirrosus: MN36720 (DQ903828, DQ903852) - Colinas do Sul 14°09'S 48°04'W.

Vampiressa pusilla: FURB-SLA1116 (DQ903825, DQ903844) - Sto. Amaro da Imperatriz 27°41'S 48°46'W; FURB-SLA777(DQ903824, DQ903843) - Gov. Celso Ramos 27°18'S 48°33'W.

ANEXO 2

DESCRIÇÃO DETALHADA DA METODOLOGIA EMPREGADA

✓ Extração de DNA

O DNA foi extraído de tecidos congelados ou preservados em etanol, usando, em princípio, o método de extração por sal, sem fenol-clorofórmio (MEDRANO *et al.*, 1990).

O protocolo de extração encontra-se resumido a seguir:

- Cortar o tecido e lavar com tampão STE. Adicionar o tampão de lise e a proteinase K. Levar ao banho-maria a 37°C por 12 horas.
- 1 hora antes de retirar os tubos do banho-maria, colocar RNase. Adicionar NaCl 4M e centrifugar por 30 minutos. Adicionar etanol absoluto e deixar 12 horas na geladeira (4°C).
- Centrifugar por 30 minutos e adicionar álcool 70%. Centrifugar por 5 minutos.
- Deitar fora o sobrenadante, secar na estufa a 37°C e adicionar TE e levar ao banho-maria a 37°C por cerca de 1 hora. Guardar na geladeira.

✓ Amplificação

A dupla-fita foi amplificada por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) seguindo o método de SAIKI *et al.* (1988), de acordo com as condições específicas descritas a seguir. Cada reação de PCR incluiu, também, um controle negativo para checagem de possíveis contaminações.

Citocromo b:

Para a amplificação do gene do citocromo b, utilizou-se os primers MVZ05 (5'-CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G -3'), MVZ16 (5'-AAA TAG GAA

RTA TCA YTC TGG TTT RAT-3'), MVZ23 (5'-TAC TCT TCC TCC ACG AAA CJG GNT C-3') descritos por SMITH & PATTON (1993) e MUS15398 (5'-GAA TAT CAG CTT TGG GTG TTG RTG-3') descritos por ANDERSON & YATES (2000). A localização dos primer em relação no citocromo b está descrito na figura 4.

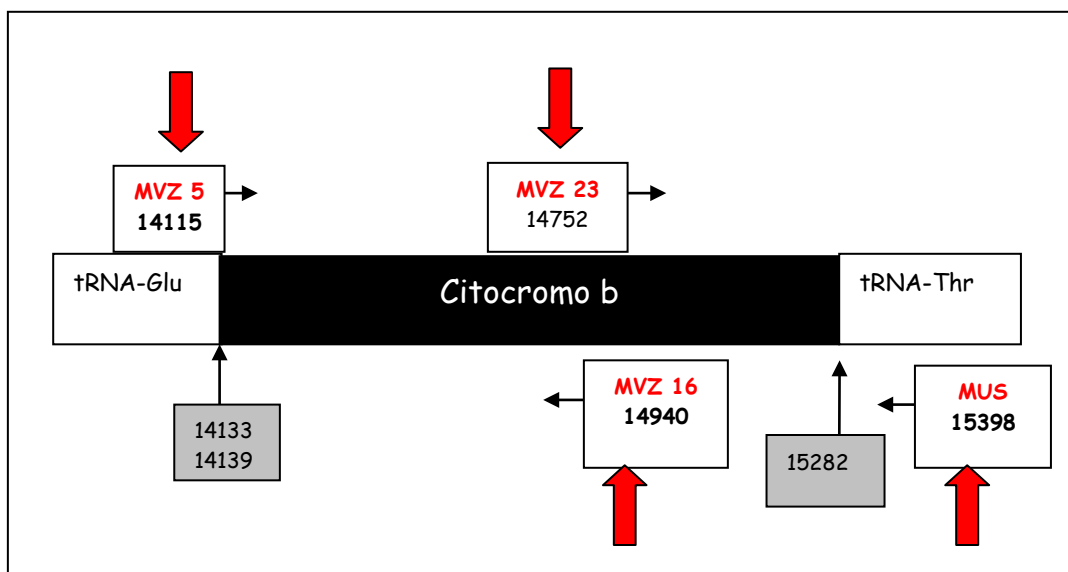


Figura 4: Representação parcial da mitocôndria mostrando os genes tRNA-Glu, citocromo b e tRNA-Thr. Nas caixas cinzas se apresenta a posição de início e fim do gene cit b e as caixas brancas os “primers” e suas posições segundo a seqüência da mitocôndria de *Mus musculus*. Setas vermelhas indicam os primers utilizados.

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25µl contendo: 2,5µl de tampão de PCR 10x; 2,6mM de MgCl₂, 0,56µM de dNTP; 0,2µM de cada primer, 1 unidade de Taq polimerase, 1-2ul of DNA molde e água para completar o volume total. As condições de amplificação foram as seguintes: Desnaturação inicial (92°C – 5min) seguido de 05 ciclos em Touchdown (desnaturação: 92°C - 1 min; temperatura de anelamento decaindo 1°C a cada ciclo, começando em 50°C até 46°C - 1 min; extensão: 72°C - 1 min). A temperatura de anelamento dos 35 ciclos seguintes foi de 46°C com as fases de extensão e desnaturação como as descritas para o touchdown e extensão final a 72°C – 10 min.

RAG2

Para a amplificação do gene nuclear RAG2 foram utilizados os primers RAG2F1 (5'- GGC YGG CCC AAR AGA TCC TG -3'), RAG2R1 (5'- AAC YTG YTT ATT GTC TCC TGG TAT GC -3'), RAG2F2 (5'- TTT GTT ATT GTT GGT GGC TAT CAG -3') e RAG2R2 (5'- GRA AGG ATT TCT TGG CAG GAG T -3') sugeridos por BAKER *et al.* (2000). Sua localização no gene está representada na figura 5.

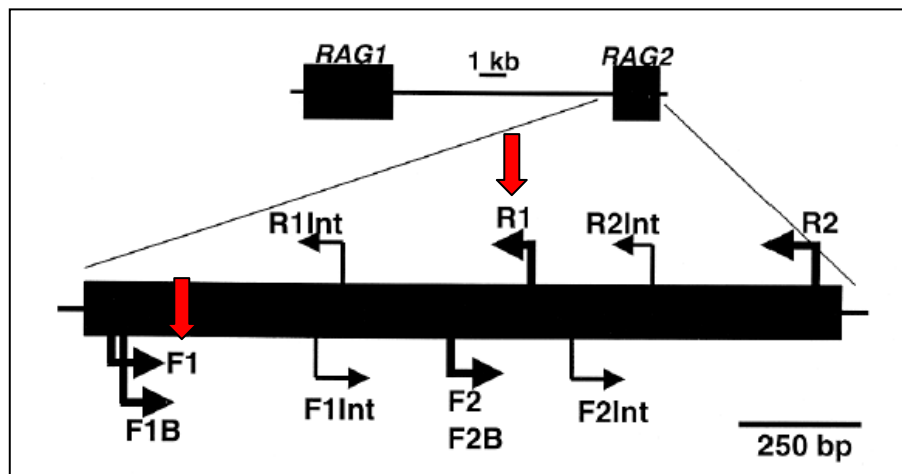


Figura 5: Diagrama representando os genes RAG, mostrando os sítios de anelamento, com destaque para os primers utilizados. Figura retirada de BAKER *et al.* (2000).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25µl contendo: 2,5µl de tampão PCR 10x; 2,6mM de MgCl₂, 1,12µM de dNTP; 0,32µM de cada primer, 1 unidade de Taq polimerase, 1-2ul of DNA molde e água para completar o volume total. As condições de amplificação foram as seguintes: Desnaturação inicial (92°C – 5min), seguido por 35 ciclos (desnaturação: 92°C – 60s; temperatura de anelamento 60°C – 45s e extensão de 72°C – 90s). Extensão final a 72°C – 10 min.

Para ambos os genes, as reações de PCR incluíram um controle negativo para verificar possíveis contaminações.

✓ Verificação

As extrações de DNA e os produtos de amplificação foram testados por eletroforese em gel de agarose, 1,4% em tampão TBE 1x, a 80V por 30 minutos, aplicando-se as amostras juntamente com azul de bromo-fenol. A coloração foi feita com brometo de etídio e a visualização em transluminador ultravioleta.

A quantificação dos produtos de amplificação foi realizada por meio de comparação com marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder – Gibco).

✓ Purificação dos fragmentos amplificados

Os produtos de PCR devidamente quantificados foram purificados utilizando-se o kit enzimático de pré-seqüenciamento da Amersham Pharmacia (US 70995), onde duas enzimas, a exonuclease I e a fosfatase alcalina, degradam os resíduos de primers e dNTPs formado pelas reações de PCR utilizando para isso 0,33 μ L de EXO (3,3U), 0,33 μ L de SAP (0,66U); 0,34 μ L de água e 6 μ L de produto de PCR em uma reação no termociclador de 30 min – 37 °C e 15 min – 80 °C ou então o protocolo de purificação por PEG (Polietilenoglicol) 8000, descrito a seguir:

✓ Seqüenciamento

Após a etapa de purificação, foi realizada a reação de seqüenciamento (SANGER *et al.*, 1977), utilizando o seqüenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30 a 45ng) foram marcados por PCR utilizando-se 3,2pmol dos primers envolvidos e 2mL do

reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) em um volume final de 10mL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 5 °C por 5 seg e 60°C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10mL de formamida, desnaturados a 95°C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no seqüenciador automático. Os dados de seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set "Z"; Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"; BioLIMS Project "3100_Project1"; Run Module 1 "StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100"; e Analysis Module 1 "BC-3100SR_Seq_FASTA.saz".

✓ Amostras

As amostras foram obtidas preferencialmente a partir de material depositado em coleções zoológicas ou coletadas com o auxílio de redes do tipo "mistnets" e consistiram em 103 seqüências (49 do gene mitocondrial citocromo b e 54 do gene nuclear RAG2) de 21 espécies de 14 gêneros (Anexo 1 e 3) coletados em 15 pontos de amostragem (Fig.6) abrangendo dois biomas brasileiros (Cerrado e Mata Atlântica, Anexo 4) entre as coordenadas 7° to 28°S and 47° to 49°W além de 27 de citocromo B e 20 seqüências de RAG2 depositadas no GenBank.

As seqüências geradas foram depositadas no GenBank sob os seguintes números de acesso: DQ903812 – DQ903852 e DQ985476 - DQ985537 (ver Tabela 1 – capítulo 2, apêndice – capítulo 3 e Anexo 1).

Os crânios e peles dos exemplares utilizados encontram-se depositados na coleção de morcegos da Universidade Regional de Blumenau (FURB) e na coleção de Mamíferos do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ).

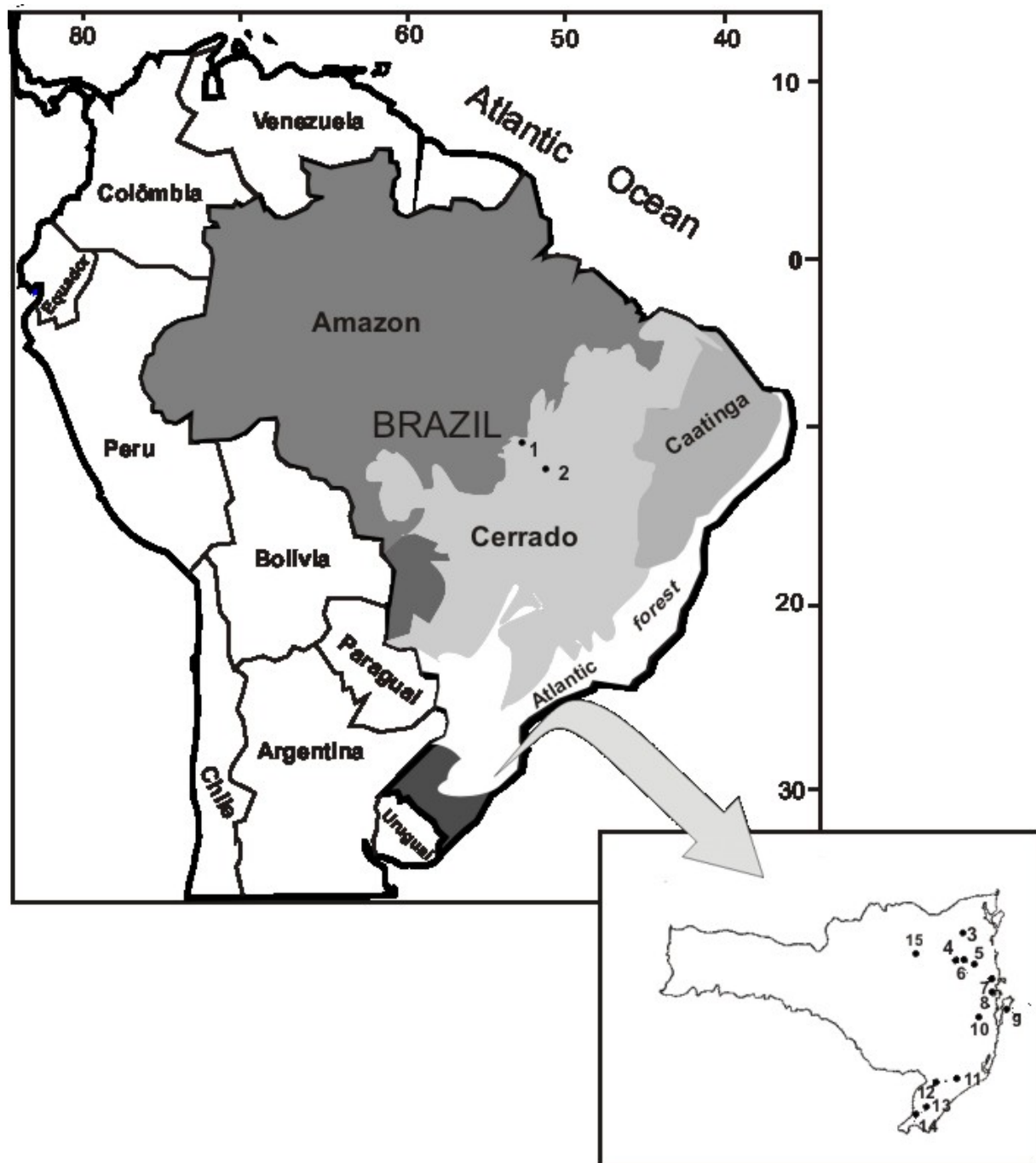


Figura 6: Pontos de coleta das amostras utilizadas neste estudo (1) Palmeirante, (2) Colinas do Sul, (3) Jaraguá do Sul, (4) Indaial, (5) Gaspar, (6) Blumenau, (7) Porto Belo, (8) Gov. Celso Ramos, (9) Florianópolis, (10) Sto Amaro da Imperatriz, (11) Treze de Maio, (12) Nova Veneza, (13) Jacinto Machado, (14) Santa Rosa do Sul (15) Itaiópolis.

ANEXO 3

BREVE DESCRIÇÃO DAS ESPECIES AMOSTRADAS



Artibeus fimbriatus Gray, 1938

Morcego de tamanho médio em relação às outras espécies. As faixas faciais estão ausentes ou tênues. As pontas das asas apresentam em geral, um padrão de coloração negra. A cor da pelagem do dorso apresenta grande variação, com a maioria tendendo ao castanho escuro. A pelagem do ventre também apresenta grande variação (ALTHOFF, 1996). São essencialmente frugívoros (BARQUEZ *et al.*, 1993). Possui $2n=30,XX$ (SANTOS *et al.*, 2002).

Distribuição: nordeste ao sul do Brasil (da Bahia até Santa Catarina), estendendo-se ao nordeste do Paraguai (KOOPMAN, 1993; MARQUES-AGUIAR, 1994; FABIÁN *et al.*, 1999) e ao norte da Argentina (BARQUEZ *et al.*, 1993; DIAZ & OJEDA, 2000).



Artibeus lituratus (Olfers, 1818)

Folha nasal curta, larga e em forma de ferradura. O lábio superior apresenta pequenas verrugas marginais e o inferior uma grande verruga central, circundada por verrugas menores. As faixas faciais são, na maioria, bem evidentes, mas podem chegar a estar ausentes em alguns casos. Na maioria das vezes a ponta das asas é creme. A membrana interfemural (uropatágio) é profundamente sulcada, apresentando diversos graus de pilosidade. A cor da pelagem apresenta grande variação (ALTHOFF, 1996).

Possui $2n=30/31,XY1Y2$ (ALTHOFF, 1996; SANTOS *et al.*, 2002).

Distribuição: desde a região central do México, passando pela América Central até a região sul do Brasil, Norte da Argentina e Paraguai (KOOPMAN, 1993; MARQUES-AGUIAR, 1994; CIMARDI, 1996; FABIÁN *et al.*, 1999; DIAZ & OJEDA, 2000).



Artibeus jamaicensis Leach, 1821

Apresenta alta variabilidade morfológica entre populações o que leva a ao reconhecimento de várias subespécies que diferem primariamente em caracteres como tamanho, cor e número de molares, sendo que os limites geográficos e morfométricos destas subespécies nunca foram muito claros e o status de muitas dessas subespécies vem sendo também questionadas (GUERRERO *et al.*, 2004). Possui $2n=30/31,XY1Y2$ (SANTOS *et al.*,2002).

Distribuição: Apresenta-se distribuída do México até o sul do Brasil (MARQUES-AGUIAR, 1994), mais precisamente, até Santa Catarina (ALTHOFF, 1996).



Artibeus obscurus Schinz, 1821

Espécie considerada pequena em relação às demais. As faixas faciais também se encontram ausentes ou tênues. As pontas das asas são negras. A cor pode apresentar-se sob três tonalidades: castanha-escura, castanha-clara e negra. A pelagem do ventre apresenta-se também três variações na tonalidade, sendo a maioria, cinza-escura (ALTHOFF, 1996).

Distribuição: Pode ser encontrada desde a Colômbia, Venezuela, Guianas, Equador, Peru, Bolívia e Brasil (KOOPMAN, 1993), distribuindo-se inclusive nos estados do Paraná e Santa Catarina (ALTHOFF, 1996).



Artibeus planirostris

Esta espécie é considerada por autores como Handley (1987) e Marques-Aguiar (1994) como sinônimo de *Artibeus jamaicensis*, sendo esta última o sinônimo-sênior. Outros autores, como Lim et al. (2004) consideram estas duas como espécies distintas, com *A. planirostris* ocorrendo desde o sul do Rio Orinoco até o sudeste da América do Sul.



Chiroderma doriae Thomas, 1891

Este é um morcego de tamanho médio, pesando cerca de 25 a 30g, medindo de 50 a 75mm de cabeça-corpo e 48 a 56mm de antebraço. A coloração é cinzenta, sendo dorsalmente mais claro. Apresenta folha nasal e faixas brancas na face e também no dorso, que se estendem até metade do corpo. Pode ser confundido com as espécies do gênero *Platyrrhinus*, distinguindo-se destes especialmente pela extensão da listra dorsal e pela ausência do osso nasal. Está sempre associado a ambientes florestais. É noturno e gregário, deslocando-se pelo dossel inferior e médio da floresta. Apresenta reprodução sazonal associada ao início do período chuvoso e em geral produz apenas um filhote; os demais aspectos da sua reprodução são desconhecidos (MIKICH & BÉRNILS, 2004).

Chiroderma doriae apresenta dieta frugívora pouco diversificada e tem sido capturada em áreas com intensa atividade antrópica, como no Rio de Janeiro. A área de vida é desconhecida e a variação populacional ocorre de acordo com a disponibilidade de seu alimento principal (*Ficus* spp.). A abundância desse recurso é muito baixa em áreas de Floresta Ombrófila Mista e esse pode ser o principal motivo para *C. doriae* não ocorrer nesse bioma (MIKICH & BÉRNILS, 2004).

Distribuição: ocorre na região Sudeste do Brasil até o Paraná (MIKICH & BÉRNILS, 2004).



Chiroderma villosum Peters, 1860

Trata-se de um morcego de tamanho médio com 18 a 23g de peso, 42 a 46mm de antebraço e 60 a 70mm de cabeça e corpo. A folha nasal está presente e sua coloração é levemente marrom, sem distinção entre o dorso e o ventre. As faixas faciais, que são bem marcantes em *Chiroderma doriae*, são pouco visíveis ou ausentes em *C. villosum*. Este morcego pode ser confundido com as espécies do gênero *Platyrrhinus*, distinguindo-se destes especialmente na extensão da listra dorsal e na ausência do osso nasal. Noturna e gregária, esta espécie está sempre associada a ambientes florestais, deslocando-se pelo dossel inferior e médio da floresta. Apresenta reprodução sazonal, geralmente associada ao início do período chuvoso (EISENBERG & REDFORD, 1999; NOWAK, 1999).

É frugívora, de dieta pouco diversificada, incluindo especialmente *Ficus* spp. (Moraceae). Sua área de vida é desconhecida e os dados populacionais são insuficientes para uma análise confiável. Contudo, aparenta ser mais comum que *C. doriae* (MIKICH & BÉRNILS, 2004).

Distribuição: Bolívia, Brasil, Belize, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru, Suriname, El Salvador, Trinidad e Tobago e Venezuela (KOOPMAN, 1993; NOWAK, 1999). No Brasil a distribuição deste morcego é ampla, sendo citado da região Norte até o Paraná, que aparenta ser o seu limite meridional (MIKICH & BÉRNILS, 2004).



Chrotopterus auritus (Peters, 1856)

Este é um dos cinco maiores morcegos do Brasil. O corpo mede entre 100 e 112mm, e o antebraço entre 75 e 87mm. A coloração dorsal é escura, pardo-acinzentada e o ventre é acinzentado. As membranas das asas são largas e escuras,

com as pontas esbranquiçadas. As orelhas são muito grandes e separadas entre si; quando dobradas, ultrapassam as narinas. A folha nasal é bem desenvolvida, assim como a membrana interfemural que se apresenta larga, formando pregas e dobras quando o animal está em repouso. A cauda é rudimentar. Esta é uma espécie encontrada em cavernas, túneis, ocos de árvores e habitações humanas, de vários tipos de ambiente (NOWAK,1999).

É noturna e gregária, formando grupos que podem ter até sete indivíduos. Fêmeas grávidas foram capturadas em abril e julho. O período de gestação é de 99 dias, após o qual nasce apenas um filhote. Carnívoro, alimenta-se de pequenos vertebrados como aves, répteis, morcegos e roedores, embora alguns autores tenham relatado a presença de insetos e frutos na sua dieta. Nada se sabe sobre sua capacidade de adaptação, como também são poucas as informações sobre sua área de vida. As taxas de captura desta espécie são baixas, o que resulta em uma deficiência dessas informações (MIKICH & BÉRNILS, 2004).

Distribuição: do sul do México até Paraguai e norte da Argentina (NOWAK,1999). No Brasil esta espécie encontra-se amplamente distribuída (MIKICH & BÉRNILS, 2004).



Desmodus rotundus Geoffroy, 1810

Apenas esta espécie é descrita para o gênero atualmente. Espécies como *D. stocki* e *D. draculae* são descritas para o Pleistoceno (NOWAK,1999).

D. rotundus é considerada de médio à grande porte, com corpo medindo entre 70 e 90mm, antebraço entre 50-63mm e cauda ausente (NOWAK,1999). Alimenta-se de sangue de mamíferos ou ocasionalmente de aves, para o que está perfeitamente adaptado, tendo se aprimorado anatômica e comportamentalmente para a retirada de sangue de suas presas (RUSCHI, 1951; BREDT & SILVA, 1996). Possui $2n= 28$ (EISENBERG & REDFORD, 1999).

Habita tanto áreas áridas quanto úmidas em regiões tropicais e subtropicais. Geralmente utiliza cavernas como abrigo, mas podem também ocupar buracos de árvores, minas antigas e prédios abandonados e pode ser encontrado sozinho, em pequenos grupos ou em colônias de mais de 2.000 indivíduos (NOWAK,1999).

São considerados poliétricos (NOWAK,1999) e um dos únicos grupos que possuem altruísmo recíproco (WILKINSON,1990)

Suas populações têm crescido com a oferta de alimento proporcionada pelo desenvolvimento da pecuária na América do Sul e Central, regiões de sua distribuição.

Distribuição: América do Sul, desde a Colômbia, Venezuela e Guianas até Valparaíso no Chile, Córdoba e o Norte de Santa Fé na Argentina (KOOPMAN, 1993; NOWAK, 1999).



Diphylla ecaudata Spix, 1823

Única espécie descrita para este gênero. Este é um morcego de tamanho médio, com peso variando entre 23 e 30g e medindo entre 50 e 55mm de antebraço e de 65 a 90mm de cabeça e corpo. A coloração é marrom escura ou mesmo avermelhada. A membrana interfemural é densamente pilosa. Tem 26 dentes, enquanto que os demais gêneros de morcegos-vampiros, *Diaemus* e *Desmodus*, têm, respectivamente, 22 e 20 dentes. Habita ocos de árvores, habitações humanas e cavernas. É noturno e não gregário. A fêmea pode parir duas vezes por ano, sempre um filhote. É uma espécie hematófaga, alimentando-se de sangue de vertebrados, principalmente aves. Sua plasticidade é desconhecida (NOWAK,1999; MIKICH & BÉRNILS, 2004).

Distribuição: Sul do Texas e leste do México até o norte da Bolívia (NOWAK,1999). No Brasil esta espécie está distribuída em todos os estados (MIKICH & BÉRNILS, 2004).



Glossophaga soricina (Pallas, 1766).

É um morcego pequeno (comprimento do corpo em média de 53,9mm para machos e 54,9mm para fêmeas). Apresenta um focinho comprido, língua extensível, orelhas pequenas, triangulares com a ponta arredondada. O uropatágio é bem desenvolvido, com cauda na parte dorsal e sem pêlos na borda. O trago comprido e pontiagudo e a folha nasal pequena (EISENBERG & REDFORD,1999). Possui $2n=32$ (EISENBERG & REDFORD,1999; SANTOS *et al.*,2002).

Prefere ambientes úmidos, sendo raramente encontrado em lugares secos. Pode viver em ambientes alterados pelo homem, mas em ambientes naturais prefere florestas bem preservadas, com vários extratos arbóreos (EISENBERG & REDFORD,1999).

Animal crepuscular noturno. Alimenta-se principalmente de néctar, mas também de pólen, flores, frutos e insetos. Solitários ou coloniais. Forma colônias maternais em cavernas e ocos de árvores. Podem reunir-se várias centenas de fêmeas e seus filhotes. Fêmeas apresentam ciclo de reprodução poliestro, tendo duas a três ninhadas por ano, sempre com um filhote por ninhada (EISENBERG & REDFORD,1999).

Distribuição: México ao nordeste da Argentina e sudeste do Brasil (EISENBERG e REDFORD,1999).



Micronycteris megalotis (Gray, 1842)

Apresenta comprimento de corpo médio de 43,8mm para machos e 44,6mm para fêmeas. Possui número cromossômico $2n=40$ (EISENBERG & REDFORD,1999).

Esta espécie é tolerante a ambiente de florestas perenes multiestratificadas. Pouco se sabe sobre a história natural das espécies de *Micronycteris*, em grande

parte pelo fato das mesmas não serem comumente capturados por redes de neblina, o método de coleta de morcegos preferido entre os mastozoólogos neotropicais, mas, apesar de raramente serem capturados em grandes números, estudos indicam que as espécies de *Micronycteris* constituem uma grande fração da fauna de morcegos insetívoros das florestas úmidas neotropicais, onde muitas espécies podem ocorrer simpatricamente (SIMMONS *et al.*, 2002).

Abrigam-se em ocos de árvores, cavernas, em grupos de até 12 indivíduos (EISENBERG & REDFORD, 1999).

Distribuição: sudeste do México e sul do Peru, leste da Colômbia, Venezuela, Guiana Francesa até o sul do Brasil (EISENBERG & REDFORD, 1999).



Mimon bennettii (Gray, 1838)

Trata-se de um morcego de tamanho pequeno, com 20 a 25g e 85 a 95mm de cabeça e corpo. Sua coloração é marrom claro, esmaecida no dorso. É uma espécie florestal que utiliza cavernas como abrigo. Noturno e gregário, este morcego vive em pequenos grupos de dois a quatro indivíduos. Ao final de cada gestação nasce apenas um filhote, estando o período de nascimento relacionado ao início do período chuvoso. Alimentam-se de insetos, pequenos vertebrados e frutos (MIKICH & BÉRNILS, 2004).

Distribuição: Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Suriname, Venezuela (KOOPMAN, 1993; NOWAK, 1999), no Brasil esta espécie ocorre em áreas florestais do Amazonas ao Rio Grande do Sul (MIKICH & BÉRNILS, 2004).



Mimon crenulatum (E. Geoffroy, 1810)

Mimon crenulatum é localmente rara, porém ocorre amplamente dentro dos limites de distribuição do gênero (CAMARGO & FISCHER, 2005). Pode ser

encontrada em florestas decíduas, mas prefere florestas perenes multiestratificadas. Alimentam-se de insetos e frutas. Possui $2n=32$ (EISENBERG & REDFORD, 1999).

Distribuição: Bolívia, Brasil, Belize, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago, Venezuela (KOOPMAN, 1993; EISENBERG & REDFORD, 1999; NOWAK,1999).



Platyrrhinus lineatus (Geoffroy, 1810)

É um morcego pequeno. Possui uma listra clara, branca ou cinza, que se estende desde as orelhas até o início do uropatágio, podendo estar pouco evidente. Quatro linhas faciais claras no rosto, duas infra e duas supra orbitais, podendo estar pouco aparentes. Possui uma franja de pêlos bastante visíveis que reveste a borda do uropatágio que é reduzido. Folha nasal bem desenvolvida (EISENBERG & REDFORD, 1999; NOWAK,1999). Possui $2n=30,XY$ (SANTOS *et al.*,2002)

São frugívoros, podendo alimentar-se também de insetos e néctar. Forrageiam em grandes grupos, mas descansam durante o dia formando pequenos haréns com um macho e de sete a quinze fêmeas (EISENBERG & REDFORD, 1999).

Distribuição: Colômbia, Guiana Francesa, Brasil, Argentina (NOWAK,1999).



Pygoderma bilabiatum (Wagner, 1843)

É considerado um morcego pequeno. Apresentam uma mancha branca em cada ombro próximo a asa. Os machos tem um grande glândula subdermal ao redor do olho e a borda das orelhas e do trago são amarelados. O número cromossômico é de $2n = 30-31$ (EISENBERG & REDFORD, 1999).

Distribuição: Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai, Suriname (NOWAK,1999).



Sturnira lilium Geoffroy, 1810

Morcego de tamanho médio, com antebraço medindo entre 37 e 44mm, é pardo-amarelado na parte superior do corpo. São desprovidos de membrana interfemural e cauda (SILVA, 1994). Possui $2n=30,XY$ (SANTOS *et al*, 2002)

Alimenta-se principalmente de frutos, mas pode também utilizar insetos e pólen (GARDNER,1977b). Como outros morcegos frugívoros, esta espécie tem grande potencial para ser dispersora de sementes.

São encontrados em uma variedade de habitats, com exceção de grandes elevações (acima de 1000m) e regiões secas (HANDLEY, 1976).

Quanto à reprodução esses morcegos apresentam dois picos anuais, um entre março e abril e outro entre julho e agosto (REIS,1982).

Distribuição: Amplamente distribuída desde do México até o Norte da Argentina (EISENBERG & REDFORD, 1999).



Sturnira tilda de la Torre, 1959

Trata-se de um morcego de tamanho médio, com 24 a 28g de peso, 46 a 48mm de antebraço e 67 a 70 mm de cabeça e corpo. Suas orelhas são largas e a base dos pêlos dorsais é mais clara que a ponta, que é marrom, dando um efeito de variação entre o marrom e o branco, enquanto o ventre é marrom-claro. *Sturnira tilda* é uma espécie florestal e gregária que apresenta atividade noturna. Nasce um filhote a cada gestação, que parece ser anual. Outros dados reprodutivos são desconhecidos, mas ao que tudo indica há uma variação no seu período de prenhez de acordo com a latitude. É uma espécie frugívora que demonstra preferência por plantas pioneiras, mas a sua plasticidade é desconhecida e os registros desta

espécie geralmente estão associados a áreas com bom grau de preservação (MIKICH & BÉRNILS, 2004).

Distribuição: Norte e centro da América do Sul (NOWAK, 1999). É citado para todo o Brasil (MIKICH & BÉRNILS, 2004).



Tonatia bidens (Spix, 1823)

Este é um morcego de tamanho médio a grande, com 35 a 45g, 56 a 60mm de antebraço e 90 a 100mm de comprimento total. Apresenta coloração dorsal cinzenta e região ventral mais clara e amarelada. As orelhas são bem desenvolvidas e separadas, com as bordas internas com pêlos claros. Apresenta folha nasal e pequenas papilas sob o lábio. É uma espécie florestal e noturna que pode ser gregária, formando grupos de poucos indivíduos, ou solitária. É onívora, com dieta baseada principalmente em insetos, pequenos vertebrados e frutos. Nada se sabe sobre os seus aspectos reprodutivos e sobre sua capacidade adaptativa (NOWAK, 1999; MIKICH & BÉRNILS, 2004; ESBÉRARD & BERGALLO, 2004). Apresenta $2n=16,XY$ (SANTOS *et al.*, 2002).

Distribuição: É amplamente distribuída, ocorrendo desde o sudeste da Guatemala até o sudoeste do Brasil (EISENBERG & REDFORD, 1999). Ocorre em todo o Brasil, exceto no Rio Grande do Sul (MIKICH & BÉRNILS, 2004).



Tonatia silvicola (d'Orbigny, 1836)

Comprimento total em média de 73,3mm para machos e 71,5 para fêmeas. Esta espécie ocorre desde Honduras até sul da Bolívia e Brasil. Apesar de ser coletado algumas vezes em florestas decíduas próximos a rios, muitos espécimes são coletados em florestas perenes multiestratificadas. Ocasionalmente se abrigam

em ninhos de térmitas e na caatinga brasileira esta espécie é um insetívoro catador. Possui $2n=34$ (EISENBERG & REDFORD,1999).

Distribuição: Leste de Honduras até a Bolívia e norte da Argentina (NOWAK,1999).



Trachops cirrhosus (Spix, 1823)

A espécie *Trachops cirrhosus* é o único membro do gênero (NOWAK,1999). É um morcego de tamanho médio, com comprimento de antebraço de 57-64mm, comprimento do corpo de 76-88mm e comprimento de cauda de 12-21mm. A pelagem varia do preto ou castanho-avermelhado até cinamomo com as partes inferiores acinzentadas (NOWAK,1999). Apresenta $2n=30,XY$ (SANTOS *et al.*,2002).

É uma das quatro espécies carnívoras na família Phyllostomidae. Alimentam-se de insetos, pequenos vertebrados e algumas frutas. A seletividade nos hábitos alimentares ainda é debatida, mas o hábito de se alimentar do sapo Tungara - *Physalaemus pustulosus*, tem merecido considerável atenção. A variação encontrada nos trabalhos sobre reprodução sugere que a estação de reprodução de *Trachops* pode variar geograficamente e até dentro de uma localidade em particular. Podem ser encontrados habitando ocos de árvores, cavernas, túneis abandonados, bueiros e prédios (GOROG, 1999).

É fortemente associado com florestas tropicais multiestratificadas, mas ocorre em regiões de floresta decídua, próximo a habitats úmidos (EISENBERG & REDFORD,1999).

Distribuição: Bolívia, Brasil, Belize, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru, Suriname, El Salvador, Trinidad e Tobago, Venezuela (KOOPMAN, 1993; NOWAK,1999).



Vampyressa pusilla (Wagner, 1843)

São inteiramente frugívoros e são descritos como comum figo-especialistas. São fortemente associados a habitats úmidos e florestas perenes multiestratificadas. Possuem número cromossômico variável sendo o $2n=18,24$ (EISENBERG & REDFORD, 1999)

Distribuição: México, Peru, Paraguai, Brasil, Guiana Francesa (NOWAK, 1999).

ANEXO 4

BREVE DESCRIÇÃO DOS AMBIENTES AMOSTRADOS

Mata Atlântica

A Floresta Atlântica ou Mata Atlântica se estende ao longo da costa brasileira desde o norte do estado do Rio Grande do Norte a até o sul do Rio Grande do Sul. Ela se estende do interior para o leste do Paraguai, província das Misiones, no nordeste da Argentina e por uma estreita faixa ao longo da costa do Uruguai. Também estão inclusos neste bioma a vegetação do arquipélago de Fernando de Noronha e muitas outras ilhas da costa brasileira (MITTERMEIER *et al.*, 2005).

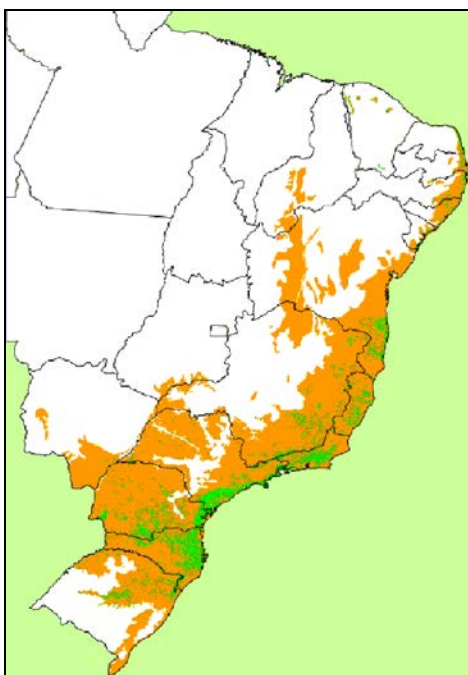


Figura 7: Mapa de cobertura da vegetação nativa da Mata Atlântica. Em laranja, área de cobertura original e em verde, áreas remanescentes. Retirado de HERINGER & MONTENEGRO (2000).

Em termos gerais, a Mata Atlântica pode ser vista como um mosaico diversificado de ecossistemas, apresentando estruturas e composições florísticas diferenciadas, em função de diferenças de solo, relevo e características climáticas existentes na ampla área de ocorrência desse bioma no Brasil (JOLY *et al.*, 1999; COSTA, 2003).

Estende-se cerca de 500-600km para o interior e vai deste o nível do mar até cerca de 2.000m de altitude. A altitude determina pelo menos três tipos de vegetação na Mata Atlântica. As florestas da planície costeira, as florestas de “montanha” e os campos de altitude ou campos rupestres (MITTERMEIER *et al.*, 2005).

A Mata Atlântica e seus ecossistemas associados cobriam, à época do descobrimento 1.360.000km² (HERINGER & MONTENEGRO, 2000). Atualmente, apenas 8% da área do bioma preserva suas características bióticas originais. Apesar da devastação a que foi submetido, abriga ainda altíssimos níveis de riqueza biológica e de endemismos, como é exemplo o recorde mundial de diversidade de plantas lenhosas encontradas – 458 espécies – em um único hectare no sul da Bahia, sendo inclusive identificada como a quinta área mais ameaçada e rica em espécies endêmicas do mundo (HERINGER & MONTENEGRO, 2000; MITTERMEIER *et al.*, 2005) e o segundo bioma brasileiro em termos de diversidade de mamíferos, mas possuindo um número significativamente maior de espécies (total e endêmicas) do que o esperado dado sua área (COSTA *et al.*, 2005).

A riqueza específica de morcegos dentro da Mata Atlântica apresenta um gradiente latitudinal do sudeste para o sul do Brasil, com, por exemplo, 67 espécies ocorrendo no Espírito Santo e 28 no Rio Grande do Sul (MARINHO-FILHO, 1996a).

Cerrado

O Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade com a presença de diversos ecossistemas. A área nuclear encontra-se distribuída pelo Planalto Central Brasileiro nos Estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, parte de Minas Gerais, Bahia e Distrito Federal, abrangendo originalmente cerca de 2.031.990km². É o segundo maior bioma brasileiro, depois da Amazônia, sendo a mais extensiva região de savana da América do Sul (MITTERMEIER *et al.*, 2005).



Figura 8: Área de cobertura do bioma Cerrado em vermelho. Figura retirada da home-page da Conservation International.

O clima é tropical, com chuvas concentradas no período de abril a outubro. A estação da seca é bem definida, provocando, em algumas áreas, falta de água. Muitas das espécies de plantas típicas do Cerrado são próprias de região seca. As queimadas, tanto as naturais quanto as provocadas pelo homem, são uma característica importante da ecologia do Cerrado. A flora mostra um grupo de adaptações ao fogo, inclusive cascas de árvore grossas, folhas resistentes e uma capacidade de regeneração rápida (MITTERMEIER *et al.*, 2005).

O Cerrado típico é constituído por árvores relativamente baixas (até vinte metros), esparsas, disseminadas em meio a arbustos, subarbustos e uma vegetação baixa constituída, em geral, por gramíneas. A típica vegetação que ocorre no Cerrado possui troncos tortuosos, de baixo porte, ramos retorcidos, cascas espessas e folhas grossas (JOLY *et al.*, 1999), o que favorece a presença de espécies de morcegos de áreas abertas, como os vespertilionidae e embalunoridae (MARINHO-FILHO, 1996b).

As formações abertas predominam no Cerrado, porém formações florestais como as florestas de galeria e florestas mesofíticas, geralmente associadas a formações cársticas e cavernas podem explicar a predominância de Phyllostomidae

em alguns trabalhos, como os de TRIERVEILER (1998) que registrou cerca de 95,31% de sua amostra como pertencente a essa família. Essa variedade de habitats parece desempenhar importante papel na manutenção das populações de quirópteros, que representam nesta região cerca de 40% do total de espécies de mamíferos (MARINHO-FILHO, 1996b).

Referências Bibliográficas

- AGUIAR, L.M.S. & TADDEI, V.A. 1995. Workshop sobre a conservação dos morcegos brasileiros. **Chiroptera Neotropical**,1(2):14-19.
- ALTHOFF, S.L. 1996. **Estudos taxonômicos e citogenéticos das espécies pertencentes ao gênero Artibeus (Mammalia, Chiroptera), ocorrentes na porção oriental da região sul do Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná - UFPR.126p.
- ALTRINGHAN, J.D. 1996. **Bats. Biology and Behaviour**. New York: Oxford University Press.
- ANDERSON, S. & YATES, T. 2000. A new genus and species of phyllotine rodent from Bolivia. **Journal of Mammalogy** **81**: 18-36.
- AVISE, J.C. 1994. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman e Hall.511p.
- BAKER, R. J., GENOWAYS, H.H. BLEIER, W. J & WARNER, J.W. 1973. Cytotypes and morphometrics of two phyllostomatid bats, *Micronycteris hirsute* and *Vampyressa pusilla*. **Occasional Papers of Museum Texas Tech University**,17: 1-10.
- BAKER, R.J., HOOD, C.S. & HONEYCUTT, R.L. 1989. Phylogenetic relationships and classification of the higher categories of the New World bat family Phyllostomidae. **Systematics Zoology**,38: 228–238.
- BAKER, R.J.; PORTER, C.A.; PATTON, J.C. & VAN DEN BUSSCHE, R.A. 2000. Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. **Occasional pappers, Museum of Texas Tech University**, **202**:1-16.
- BAKER, R.J.; HOOFER, S.R.; PORTER, C.A.; & VAN DEN BUSSCHE, R.A. 2003. Diversification among New World Leaf-nosed bats: an evolutionary hipótesis

and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence.

Occasional Papers Museum Texas Tech University, 23:1-32.

- BANDELT, H.J.; FORSTER, P. & RÖHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution, 16:37-48.**
- BARQUEZ, R.M.; GIANNINI, N.P. & MARES, M.A. 1993. Guide to the bats of Argentina. Oklahoma: Oklahoma Museum of Natural History.
- BRADLEY, R.D. and BAKER, R.J. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. **Journal of Mammalogy, 82(4):960-973.**
- BREDT, A. & SILVA, D.M. 1996. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: Manual de manejo e controle.** Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 117 p.
- BREDT, A.; UIEDA, W. & MAGALHÃES, E.D. 1999. Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, centro-oeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). **Revista Brasileira de Zoologia, 16(3):731-770.**
- BREDT, A.; CAETANO JUNIOR, J. & MAGALHÃES, E.D. 2002. **Chave visual para identificação de morcegos do Brasil.** CD-rom. Brasília: Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal.
- BROWN, W.M.; GEORGE, M.J.R. & WILSON, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 76:1967-1971.**
- BURLAND, T.M. & WILMER, J.W. 2001. Seeing in the dark: molecular approaches to the study of bat populations. **Biological Reviews, 76:389-409.**
- CAMARGO, G. & ERICH FISCHER, E. 2005. Primeiro registro do morcego *Mimon crenulatum* (Phyllostomidae) no Pantanal, sudoeste do Brasil. **Biota Neotropica, 5(1):1-4.**
- CARSTENS B.C., SULLIVAN J, DAVALOS L.M., LARSEN P.A., PEDERSEN S.C. 2004. Exploring Population Genetic Structure in Three Species of Lesser Antillean Bats. **Journal of Molecular Ecology, 13(9): 2557-2566.**
- CIMARDI, A.V. 1996. **Mamíferos de Santa Catarina.** Florianópolis: FATMA. 302p.

- COOPER, S.J.B.; DAY, P.R.; REARDON, T.B. & SCHULZ, M. 2001 Assessment of species boundaries in Australian *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae) using mitochondrial DNA. **Journal of Mammalogy**, **83**:328-338.
- COSTA, L.P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, **30**, 71–86.
- COSTA, L.P.; LEITE, Y.L.R.; MENDES, S.L. e DITCHFIELD, A.D. 2005. Conservação de mamíferos no Brasil. **Megadiversidade**, **1**(1):104-112.
- CRESPO, J.A.; VANELLA, J.M.; BLOOD, B.D. & CARLO, J.M. 1961. Observaciones ecologicas del vampiro *Desmodus rotundus* (Geoffroy) en el norte de Cordoba. **Rev. del Museo Argentino de Ciências Naturales “ Bernardino Rivadavia” – Ciências Zoológicas**, **6**:133-60.
- DAVALOS L.M. 2004. A New Chocoan Species of *Lonchophylla* (Chiroptera: Phyllostomidae). **American Museum Novitates**, **3426**, 1-14.
- DAVALOS, L.M. & JANSA, S.A. 2004. Phylogeny of the Lonchophyllini (Chiroptera: Phyllostomidae). **Journal of Mammalogy**, **85**(3):404–413.
- DAVALOS L.M. 2005. Molecular phylogeny of funnel-eared bats (Chiroptera: Natalidae), with notes on biogeography and conservation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **37** (1): 91-103.
- DAVALOS L.M. 2006. The geography of diversification in the mormoopids (Chiroptera: Mormoopidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, **88**, 101-118.
- DE LA TORRE, L. 1961. The evolution, variation, and systematics of the neotropical bats of the genus *Sturnira*. **Ph.D. diss.**, University of Illinois, Urbana.
- DÍAZ, G.B. & OJEDA, R.A. (eds.). 2000. **Libro rojo de mamíferos amenazados de la Argentina**. Buenos Aires: SAREM. 106p.
- DINIZ FILHO, J.A.F. 2000. **Métodos filogenéticos comparativos**. Ribeirão Preto: Holos. 162p.

- DITCHFIELD, A.D. & BURNS, K. 1998. DNA sequence reveal phylogeographic similarities of neotropical bats and birds. **Journal of Comparative Biology**,3(2):164-169.
- DITCHFIELD, A.D. 2000. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraespecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. **Molecular Ecology**,9:1307-1318.
- DITCHFIELD, A.D. 2003. Filogeografia e a Conservação de Espécies de Morcegos Neotropicais. **Divulgações do Museu de Ciências e Tecnologia UBEA/PUCRS, Publicações Especiais**,2:57.
- DITCHFIELD, A.D.; MARTINS, F.M.; SANTOS, F.R. & REDONDO, R.A.F. *in press*. Filogeografia e filogenia de Chiroptera na região neotropical. In: PACHECO, S.M; MARQUES, R.V. AND ESBÉRARD. C.E.L. (eds.). **Morcegos no Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação**. Pelotas:USEB.
- EISENBERG, J.F. & REDFORD, K.H. 1999. **Mammals of the Neotropics, vol.3**. Chicago: University of Chicago Press. 609p.
- ESBÉRARD, C., 2000. Morcegos. Os formadores de florestas. **Revista Ecologia & desenvolvimento**, **82**. http://www2.uol.com.br/ecologia/pesquisa-public/ecologia/ecologia_82_1.htm
- ESBÉRARD, C.E.L. & BERGALLO, H.C. 2004. Aspectos sobre a biologia de *Tonatia bidens* (Spix) no estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, **21**(2):253-259.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E., & QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**,**131**: 479-491.
- FABIÁN, M.E.; RUI, A.M. & OLIVEIRA, K.P. de. 1999. Distribuição geográfica de morcegos Phyllostomidae (Mammalia: Chiroptera) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Zoológica**,**87**:143-156.
- FARIA K. C. & MORIELLE-VERSUTE, E. 2006. Genetic relationships between Brazilian species of Molossidae and Phyllostomidae (Chiroptera, Mammalia). **Genetica** **126**:215–225.

- FARRIS J.S., KÄLLERSJÖ M, KLUGE A.G. & BULT C. 1994. Testing significance of incongruence. **Cladistics**,**10**:315–319.
- FARRIS J.S., KÄLLERSJÖ M, KLUGE A.G. & BULT C. 1995. Constructing a significance test for incongruence. *Systematics Biology* **44**:570–572.
- FELSENSTEIN J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**,**39**:783-791.
- FENTON, M.B.; ACHARYA, L.; AUDET, D.; HICKEY, M.B.C.; MERRIMAN, C. OBRIST, M.K.; SYME, D.M. & ADKINS, B. 1992. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. **Biotropica**,**24**:440-446.
- FINDLEY, J.S. 1993 Bats. **A Community Perspective**. Cambridge: Cambridge University Press.
- FONSECA R.M., HOOFFER S.R., PORTER C.A., CLINE C.A., PARISH D.A., HOFFMANN F.G. & BAKER R.J. 2006. *In press*. Morphological and molecular variation within little big-eared bats of the genus *Micronycteris* (Phyllostomidae: Micronycterinae) from San Lorenzo, Ecuador In: KELT D.A., LESSA E., SALAZAR-BRAVO A., PATTON J.L., eds. *The Quintessential Naturalist: Honoring The Life and Legacy of Oliver P. Pearson*. Berkeley: University of California Press.
- FUTUYMA, D.J. 1992. **Biologia evolutiva** 2^a ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq. 646p.
- GARDNER, A. L. 1977a. Chromosomal variation in *Vampyressa* and a review of chromosomal evolution in the Phyllostomidae (Chiroptera). **Systematics Zoology**,**26**:300-318.
- GARDNER, A. 1977b. Feeding habitats. In: BAKER, R.J.; JONES Jr.,K. & CARTER, D.C. (eds). **Biology of bats of New World family Phyllostomidae, part II**. Special Publications of the Museum 13. Lubbock: Texas Tech Press. pp.293-350.
- GERBER, J. D. & LEONE, C.A. 1971. Immunologic comparisons of the sera of certain phyllostomatid bats. **Systematics Zoology**,**20**:160-166.

- GERVAIS, P. 1856. Deuxième mémoire. Documents zoologiques pour servir à la monographie des chéiroptères Sud–Américains. In: Gervais, P. (ed.), Mammifères: 25–88. *In*: CASTELNAU, F. (ed.) Animaux nouveaux ou rares recueillis pendant l'expédition dans les parties centrales de l'Amérique du Sud, de Rio de Janeiro à Lima, et de Lima au Para; exécuté e par ordre du gouvernement français pendant les années 1843 à 1847, sous la direction du Comte Francis Castelnau. 1(2): 1–116. Paris: P. Bertran. [dated 1855, but published 1856; see Ann. Mag. Nat. Hist. ser 7, 8: 164.].
- GOROG, A. 1999. "*Trachops cirrhosus*" (On-line), Animal Diversity Web. Accessed April 13, 2006 at http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Trachops_cirrhosus.html.
- GREGORIN, R. & TAVARES, V. C. *in press*. A sistemática de morcegos no Brasil: história e perspectivas. In: PACHECO, S.M; MARQUES, R.V. & ESBÉRARD, C.E.L. (eds.). *in press*. **Morcegos no Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação**. Pelotas:USEB.
- GUERRERO, J. A., DE LUNA, E. & SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, C. 2003. Morphometrics in the quantification of character state identity for the assessment of primary homology: an analysis of character variation of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, **80**: 45–55.
- GUERRERO, J.A., DE LUNA, E. & GONZÁLEZ, D. 2004. Taxonomic status of *Artibeus jamaicensis triomylus* inferred from molecular and morphometric data. **Journal of Mammalogy**, **85**(5):866–874.
- GUINDON, S & GASCUEL, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematics Biology**, **52**(5):696–704.
- HANDLEY Jr., C.O. 1976. Mammals of the Smithsonian Venezuelan Project. **Science Bulletin Biological series**,**20**(5).
- HANDLEY,C.O. JR, 1987. New species of mammals from Northern South America: fruit-eating bats, genus *Artibeus* Leach. **Fieldiana: Zoology**,**39**:163-172.

- HERINGER, H. & MONTENEGRO, M.M. (eds.). 2000. **Avaliação de ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.
- HEDRICK, P.W. 2001. Conservation genetics: where are we now? **Trends in Ecology and Evolution**,**16**:629-636.
- HOFFMANN, F.G. & BAKER, R.J. 2000. Systematics of bats of the genus *Glossophaga* (Chiroptera: Phyllostomidae) and phylogeography in *G. soricina* based on the cytochrome-b. **Journal of Mammalogy**,**82**:1092-1101.
- HOFFMANN, F.G. & BAKER, R.J. 2003. Comparative phylogeography of short-tailed bats (*Carollia*: Phyllostomidae). **Molecular Ecology**, **12**:3403-3414.
- HOFFMANN, F.G.; OWEN, J.G. & BAKER, R.J. 2003. mtDNA perspective of chromosomal diversification and hybridization in Peter's tent-making bat (*Uroderma bilobatum*: Phyllostomidae). **Molecular Ecology**, **12**:2981-2993.
- HONEYCUTT, R.L., & SARICH, V.M. 1987. Albumin evolution and subfamilial relationships among New World leafnosed bats (family Phyllostomidae). **Journal of Mammalogy**,**68**: 508-517.
- HOOFER, S.R., REEDER, S.A., HANSEN, E.W. & VAN DEN BUSSCHE, R.A. 2003. Molecular Phylogenetics and taxonomic review of noctilionoid and vesperilionoid bats (Chiroptera: Yangochiroptera) **Journal of Mammalogy**,**84**(3):809-821.
- HOOFER, S.R. & VAN DEN BUSSCHE, R.A. 2003. Molecular phylogenetics of the chiropteran family Vespertilionidae. **Acta Chiropterologica**,**5**:1-59. suppl.S.
- HOOFER, S.R. & BAKER, R.J. 2006. Molecular systematics of Vampyressine bats (Phyllostomidae: Stenodermatinae) with comparison of direct and indirect surveys of mitochondrial DNA variation. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **39** (2): 424-438.
- HUELSENBECK, J. P. & RONQUIST, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. New York: Department of Biology, University of Rochester, Rochester.

- HULVA, P. & HORACEK, I. 2002. *Craseonycteris thonglongyai* (Chiroptera: Phyllostomidae) is a rhinolophoid: Molecular evidence from cytrchorme *b*. **Acta Chiropterologica**,4(2):107-120.
- HUMPHREY, R.R. & BONACCORSO, F.J. 1979. Population and community ecology. In: BAKER, R.J. (ed.). Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae. **Special Publications of Museum Texas Technology University**,16:409-441.
- IRWIN, D. M.; KOCHER, T.D. & WILSON, A.C. 1991. Evolution of the cytochrome b gene in mammals. **Journal of Molecular Evolution**, **32**: 128-144.
- JEPSEN, G.L. 1970. Bat origin and evolution. In: WIMSATT, W.A. (ed.). **Biology of the Bats – vol.1**. New York: Academic. 1970. p.1-65.
- JOLY, C.A., AIDAR, M.P.M., KLINK, C.A., MCGRATH, D.G., MOREIRA, A.G., MOUTINHO, P., NEPSTAD, D.C., OLIVEIRA, A.A., POTT,A., RODAL, M.J.N. & SAMPAIO, E.V.S.B. 1999. Evolution of the Brazilian phytogeography classification systems: implications for biodiversity conservation. **Ciência e Cultura**,51:331-348.
- JONES, J.K Jr. & CARTER, D.C. 1976. Annotated checklist, with keys to subfamilies and genera. In: Biology of Bats of the New World family Phyllostomatidae. Part I. **Special Publications of the Museum Texas Tech University**,10:7-38.
- JONES, K.E. Chiroptera. 2002. **Encyclopedia of Life Sciences**. Macmillan Publishers Ltda, Nature Publishing Group. Disponível em <<http://www.els.net> > acesso em: 12/09/2003.
- JONES, K.E., PURVIS, A.; MacLARNON, A.; BININDA-EMONDS, O.R. & SIMMONS, N.B. 2002. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera) **Biological Reviews**,77:223-259.
- KAGEYAMA, P.Y. 1996. Conservação “IN SITU” de recursos genéticos de plantas. **IPEE, Piracicaba**, 35:7-37.
- KLEIN, J. 2004. Did Viruses Play a Part in the Origin of the Adaptative Immune System? **Folia Biologica**, 50:87-92.

- KOOPMAN, K.F. 1993. Chiroptera. In: WILSON, D.E. & REEDER, D.M. (eds). **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. 2^a ed. Washington: Smithsonian Institution Press, 2651:1-33.
- KOOPMAN, K.F. 1994. Chiroptera: Systematics. Handbook of Zoology. Vol. VIII. **Mammalia**, part 60. 1-217.
- KUMAR, S., TAMURA, K. & NEI, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Brief Bioinform** 5:150–163.
- LACEPEDE, B. G. 1799. **Tableau des divisions, sous-divisions, ordres, et genres des mammifères. Tabl. Div. Subd. Order Genres Mammifères**. Paris: Chez Plasson.
- LEE, T.E., STEVEN, R., HOOFER, B. & VAN DEN BUSSCHE, R.A. 2002. Molecular phylogenetics and taxonomic revision of the genus *Tonatia* (Chiroptera: Phyllostomidae) **Journal of Mammalogy**, 83(1) :49-57.
- LEWIS-ORITT, N.; VAN DEN BUSSCHE, R.A. & BAKER, R.J. 2001a. Molecular evidence for evolution of piscivory in *Noctilio* (Chiroptera: Noctilionidae). **Journal of Mammalogy**, 82(3):748-759.
- LEWIS-ORITT, N., PORTER, C.A. & BAKER, R.J. 2001b. Molecular systematics of the family Mormoopidae (Chiroptera) based on cytochrome b and recombination activating gene 2 sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 20(3):426-436.
- LI, W.H. 1997. **Molecular evolution**. Sunderland: Sinauer Associates. 284p.
- LIM, B. K. 1993. Cladistic reappraisal of Neotropical stenodermatine bat phylogeny. **Cladistics**, 9:147-165.
- LIM, B.K., ENGSTROM, M.D., LEE JR., T.E., PATTON, J.C. & BICKHAM, J.W. 2004. Molecular differentiation of large species of fruit-eating bats (*Artibeus*) and phylogenetic relationships based on the cytochrome b gene. **Acta Chiropterologica**, 6(1):1-12.
- MANDRIOLI, M., BIZZARRO, D., MANICARDI, G.C., GIONGHI, D., BASSOLI, L. & BIANCHI, U. 1999. Cytogenetic and molecular characterization of a highly

repeated DNA sequence in the peach potato *Myzus persicae*. **Chromosoma**,**108**(7):426-435.

- MCKENNA MC, BELL SK. 1997. **Classification of mammals above the species level**. New York: Columbia University Press.
- MCDANIEL, V. R. 1976. Brain Anatomy. *In*: BAKER, R. J.; JONES JR., J. K. & CARTER, D. C. (eds.), *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae*, p. 1. **Special Publications of Museum Texas Tech University**. **10**:147-200.
- MARINHO-FILHO, J. 1985. **Padrões de atividades e utilização de recursos alimentares por seis espécies de Filostomídeos na Serra do Japi, Jundiá - São Paulo**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Campinas. 77p.
- MARINHO-FILHO, J. 1996a. Distribution of bat diversity in the southern and southeastern Brazilian Atlantic Forest. **Chiroptera Neotropical**,**2**(2):51-54.
- MARINHO-FILHO, J. 1996b. The Brazilian cerrado bat fauna and its conservation. **Chiroptera Neotropical**, **2**(1):37-39.
- MARINHO-FILHO, J. & SAZIMA, I. 1998. Brazilian bats and conservation biology: A first survey. P. 282-294. *In*: KUNZ, T.H.; RACEY, P.A. (Ed.). **Bat Biology and Conservation**. Washington, D.C. & London: Smithsonian Institution. 365p.
- MARQUES-AGUIAR, S.A. 1994. A systematic review of the large species of *Artibeus* Leach,1821 (Mammalia: Chiroptera) with some phylogenetic inferences. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Zoológica**,**10**:83.
- MATTEVI, M. S. 2003. Caracterização Genético-molecular da Biodiversidade. *In*: MARQUES, E.K (org). **Diagnóstico genético-molecular**. Editora da ULBRA: Canoas. 372p.
- MAYER, F. & VON HELVERSEN, O. 2001a. Cryptic diversity in European bats. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**,**286**:1825-1832.
- MAYER, F. & VON HELVERSEN, O. 2001b. Sympatric distribution of two cryptic bat species across Europe. **Biological Journal of the Linnean Society**, **74**:365-374.

- MENDES, E. 1972. **Morcielagos hematofagos y su importancia medica en Panama**. Buenos Aires: Centro Americano de Zoonosis, 39p.
- MEDRANO, J.F., AASEN, E. & SHARROW, L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. **Biotechniques**,8:43.
- MILLER, G. S.1907. The families and genera of bats. **Bulletin. U.S. Natl. Museum. 57(1):282.1907.**
- MILLER-BUTTERWORTH, C.M., JACOBS, D.S. & HARLEY, E.H. 2003. Strong population substructure is correlated with morphology and ecology in a migratory bat. **Nature, 424(10):187-191.**
- MIKICH, S.B. & BÉRNILS, R.S. (ed.). 2004. **Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná**. Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná. 764 p.
- MITTERMEIER, R.A., GIL, P.R., HOFFMANN, M., PILGRIM, J., BROOKS, T., MITTERMEIER, C.G., LAMOUREX, J. & FONSECA, G.A.B. 2005. **Hotspots revisitados: As regiões biologicamente mais ricas e mais ameaçadas do planeta**. México:CEMEX. 18p.
- MOREIRA, M.A.M. 2001. Técnicas de avaliação da diversidade genética: DNA mitocondrial. In: GARAY,I. & DIAS, B. (org). **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais**. Petrópolis: Editora Vozes.284-94p.
- MULLIS, K., FALLONA, F., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology, 51:263.**
- NICHOLAS, K.B. & NICHOLAS, H.B. 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequences alignment. Distributed by author.
- NIXON K.C. 2002. WinClada, Version 1.00.08. New York: Ithaca: Published by the author.
- NOWAK, R.M. 1999. **Walkers Mammals of the World**. 6^a ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press. 1936p.
- OWEN, R.D. 1987. Phylogenetic analyses of the bat subfamily Stenodermatinae (Mammalia:Chiroptera). **Special Publications of Museum Texas Tech University, 26:1-65.**

- OWEN, R.D. 1991. The systematics status of *Dermanura concolor* (Peter, 1865) (Chiroptera: Phyllostomidae), with a description of a new genus. *In: Bulletin of American Museum Natural History*, **206**:18–25.
- PATTON, J.C., & BAKER, R.J. 1978. Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoid bats. *Systematic Zoology*, **27**:449-469.
- PERACCHI, A.L., LIMA, I.P., REIS, N.R, NOGUEIRA, M.R. & ORTÊNCIO FILHO, H. 2006. Ordem Chiroptera. *In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A. & LIMA, I.P (eds). Mamíferos do Brasil*. Londrina: SEMA. P.153-23.
- PETIT, E. & MAYER, F. 2000. A population genetic analysis of migration: the case of the noctule bat (*Nyctalus noctula*). *Molecular Ecology*, **9**:683-690.
- PETRI, B., PÄÄBO, S., VON HAESELER, A. & TAUTZ, D. 1997. Paternity assessment and population subdivision in a natural population of the larger mouse-eared bat *Myotis myotis*. *Molecular Ecology*, **6**:235-242.
- PIECZARKA, J.C., NAGAMACHI, C. Y., O'BRIEN, P. C. M., YANG, F., REN, W., BARROS, R. M. S., NORONHA, R. C. R., RISSINO, J., OLIVEIRA, E. H. C. DE & FERGUSON-SMITH, M. A. 2005. Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). *Chromosome Research*, **13**: 1–9,
- PIERSON, E.D., SARICH, V.M., LOWNSTEIN, J.M., DANIEL, M.J. & RAINEY, W.E. 1986. A molecular link between the bats of New Zealand and South America. *Nature*, **323**:60-63.
- PORTER, C. A. & BAKER, R. J. 2004. Systematics of *Vampyressa* and related genera of phyllostomid bats as determined by cytochrome-b sequences. *Journal of Mammalogy*, **85**(1):126-132.
- POSADA, D. & CRANDALL, K. A. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**:817-818.
- PUMO, D.E., FINAMORE, P.S., FRANEK, W.R., PHILLIPS, C.J., TARZANI, S. & BALZARANO, D. 1998. Complete mitochondrial genome of a neotropical fruit bat,

- Artibeus jamaicensis*, and a new hypothesis of the relationships of bats to other eutherian mammals. **Journal of Molecular Evolution**, **47**:709-17.
- QUMSIYEH, M.B. & BAKER, R.J. 1988. Comparative cytogenetics and the determination of primitive karyotypes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, **47**:100-103.
- REIS, N.R. 1982. Sobre a conservação dos morcegos. **Semina**, **3**(10):107-109.
- ROGERS, A.R. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. **Evolution**, **49**: 608–615.
- ROZAS, J., SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C., MESSEGUER, X. & ROZAS, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics** **19**: 2496-2497.
- RUI, A.M. AND FABIÁN, M.E. 1997. Quirópteros de la familia Phyllostomidae (Mammalia, Chiroptera) em selvas del estado de Rio Grande do Sul, Brasil. **Chiroptera Neotropical**, **3** (2): 75-77.
- RUI A.M. & DREHMER, C.J. 2004. Anomalias e variações fórmula dentária em morcegos do gênero *Artibeus* Leach (Chiroptera, Phyllostomidae). **Revista Brasileira de Zoologia** **21** (3): 639–648.
- RUEDI, M. & MAYER, F. 2001. Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **21**:436-448.
- RUSCHI, A. 1951. Morcegos do estado do Espírito Santo. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão. Serie Zoológica**, **14**:1-8.
- RYDELL, J. & SPEAKMAN, J.R. 1995. Evolution of nocturnality in bats: potential competitors and predators during their early history. **Biological Journal of the Linnean Society**, **54**:183-91.
- SADOSKY, M.J. 2001. The RAG proteins in V(D)J recombination: more than just a nuclease. **Nucleic Acids Research**, **29**:1399-1409.
- SANTOS, N., FAGUNDES, V., YONENAGA-YASSUDA, Y. & SOUZA, M. J. 2002. Localization of rRNA genes in Phyllostomidae bats reveals silent NORs in *Artibeus cinereus*. **Hereditas**, **136**: 137-143.

- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** **9**:945-967.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SHARF, S., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**,**239**:487-491.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**,**74**:5463-5467.
- SCHNEIDER, S. ROESSLI, D. & EXCOFIER, L. 2000. **Arlequin: A software for populations genetics data analysis. Version 2000**. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva.
- SCHONEWALD-COX, C.M. 1983. Preface. In: SCHONEWALD-COX, C.M; CHAMBERS, S.M. & MACBRYDE, L.T.(eds.). **Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations**. New York:The Benjamin/ Cumming Publishing Company, Inc.
- SHIMKO, N., LIU, L., LANG, B.F. & BURGER, G. 2001. GOBASE: The organelle genome database. **Nucleic Acids Research**,**29**:128-132.
- SILVA, F. S. 1985. **Guia para determinação de morcegos**. Porto Alegre: UNISINOS. 77p.
- SILVA, F. 1994. **Mamíferos silvestres do Rio Grande do Sul**. São Leopoldo: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. 245p.
- SILVA, S. S. P. da & PERACCHI, A.L. 1995. Observação da visita de morcegos (Chiroptera) às flores de *Pseudobombax grandiflorum* (CAV) A. ROBYNS. **Revista Brasileira de Zoologia**,**12**:859-865.
- SILVA, M.N. da. & PATTON, J.L. 1998. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. **Molecular Ecology**,**7**:475-486.
- SILVA, A.M.; MARQUES-AGUIAR, S.A.; BARROS, R.M.S.; NAGAMACHI, C.Y. & PIECZARKA, J.C. 2005. Comparative cytogenetic analysis in the species *Uroderma magnirostrum* and *U. bilobatum* (cytotype 2n = 42) (Phyllostomidae,

- Stenodermatinae) in the Brazilian Amazon. **Genetics and Molecular Biology**,**28**(2): 248-253.
- SIMMONS, N.B. & GEISLER, J.H. 1998. Phylogenetic relationships of *Icaronycteris*, *Archeonycteris*, *Hassianycteris*, and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in microchiroptera. **Bulletin of the American Museum of Natural History**,**235**:1-182.
- SIMMONS, N.B.; VOSS, R.S. & FLECK, D.W. 2002. A new amazonian species of *Micronycteris* (Chiroptera: Phyllostomidae) with notes on the roosting behavior of sympatric congeners. **American Museum Novitates**, (3358): 1-14.
- SIMMONS, N.B. 2005a. An Eocene Big Bang for Bats. **Science**,**307**:527-528.
- SIMMONS, N.B. 2005b. Order Chiroptera. In: Wilson, D.E & Reeder, D.M. (eds.). **Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference**, third edition, vol 1. Baltimore: Johns Hopkins University Press. P:312-529.
- SIMMONS, N.B. 2005c. Chiroptera. In: ROSE, K.D. & ARCHIBALD, D. (ed). **The rise of placental mammals**. Baltimore: Johns Hopkins University. 259p. 159-174p.
- SMITH J. D. 1976. Chiropteran evolution. *In*: BAKER, R. J.; JONES JR., J. K. & CARTER, D. C. (eds.). *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae*, p. I. **Special Publications of Museum Texas Tech University**,**10**:49-69.
- SMITH, M. F., & PATTON, J.L. 1991. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). **Molecular Biology and Evolution**, **8**:85- 103.
- SMITH M.F. & PATTON JL. 1993. Amazonian Phylogeography: mtDNA sequence variation in arboreal equimyid rodents (Caviomorpha). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **2**:243-255.
- SLAUGHTER, B.H. 1970. Evolutionary trends of chiropteran dentitions. *In* SLAUGHTER, B.H. & WALTON, W.D. (eds.). **About bats**. Dallas:Southern Methodist Univ. Press.p:51–83.

- STRANEY, D.O., SMITH, M.H.; GREENBAUM, I.F. & BAKER, R.J. 1979. Biochemical genetics. In: BAKER, R.J., JONES JR., J.K. & CARTER, D.C. (eds.), *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae*, p. III. **Special Publications of Museum Texas Tech University**,16:157-176.
- SWOFFORD, D.L. 1993. **PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 3.1.1**. Washington DC: Smithsonian Institute.
- TADDEI, V.A. 1980. Biologia reprodutiva de Chiroptera: perspectivas e problemas. **Inter-Facies - Escritos e Documentos**,6:1-8.
- TADDEI, V.A.; NOBILE, C.A. & MORIELLE-VERSUTE, E. 1998. Distribuição geográfica e análise morfométrica comparativa em *Artibeus obscurus* (Schinz, 1821) e *Artibeus fimbriatus* Gray, 1838 (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae). *Ensaio: Ciência*,2:49-70.
- TAJIMA F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, **123**: 585–595.
- TAVARES, V. C., GREGORIN, R. & PERACCHI, A.L. *in press*. A diversidade de morcegos no Brasil: lista atualizada com comentários sobre distribuição e taxonomia. In: PACHECO, S.M; MARQUES, R.V. AND ESBÉRARD. C.E.L. (eds.). **Morcegos no Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação**. Pelotas:USEB.
- TEELING, E.C., MADSEN, O., MURPHY, W.J., SPRINGER, M.S. & O'BRIEN, S.J. 2003. Nuclear gene sequences confirm an ancient link between New Zealand's short-tailed bat and South American noctilionoid bats. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **28**:308-319.
- TEELING, E.C., SPRINGER, M.S., MADSEN, O., BATES, P., O'BRIEN, S.J. & MURPHY, W.J. 2005. A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record. **Science**,**307**(5709):580 - 584.

- TRAJANO, E. 1984. Ecologia de populações de morcegos cavernícolas em uma região cárstica do Sudoeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**,**2**:255-320.
- TRIERVEILER, F. 1998. **Estrutura e composição da fauna de quirópteros da região do Alto Tocantins, GO**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. 90p.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D.G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, **24**:4876-4882.
- VAN DEN BUSSCHE, R. A. 1991. Phylogenetic analysis of restriction site variation in the ribosomal DNA complex of New World leaf-nosed bat genera. **Systematics Zoology**,**40**:420-432.
- VAN DEN BUSSCHE, R.A., BAKER, R.J., WICHMAN, H.A. & HAMILTON, M.J. 1993. molecular phylogenetics of Stenodermatini bat genera: congruence of data from nuclear and mitochondrial DNA. **Molecular Biological and Evolution**,**10**:944-959.
- VAN DEN BUSSCHE, R.A., HUDGEONS, J.L. & BAKER, R.J. 1998. **Phylogenetic accuracy, stability, and congruence: relationships within and among the New World bat genera *Artibeus*, *Dermanura* and *Koopmania***, p. 59-71. In: T.H. Kunz and Racey P.A. (Eds). Bat biology and conservation. Washington, Smithsonian Institution Press, 365p.
- VAN DEN BUSSCHE, R.A. & HOOFER, S.R. 2001. Evaluating monophyly of Nataloida (Chiroptera) with mitochondrial DNA sequences. **Journal of Mammalogy**,**82**:320-327.
- VIEIRA, C.O.C. 1942. Ensaio monográfico sobre os quirópteros do Brasil. **Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo**, **3**:219-471.
- XIA, X. & XIE, Z., 2001 DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity** **92**:371-373.
- XIANG, Q.-Y., MOODY, M. L., SOLTIS, D. E., FAN, C. & SOLTIS, P. S. 2002.

- Relationships within Cornales and circumscription of *Cornaceae-matK* and *rbcL* sequence data and effects of outgroups and long branches. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **24**:35-57.
- WETTERER, A.L., ROCKMAN, M.V. & SIMMONS, N.B. 2000. Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes and restriction sites. **Bulletin of the American Museum of Natural History, New York**, **248**: 1-200.
- WHELAN, S., LIÒ, P. & GOLDMAN N. 2001 Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. **Trend in Genetics**, **17**:262-272.
- WILKINSON, G.S. 1990. Food sharing in vampire bats. **Scientific American**, **262**:78-82.
- WILKINSON, G.S. & FLEMING, T.H. 1996. Migration and evolution of lesser long-nosed bats *Leptonycteris curasoae*, inferred from mitochondrial DNA. **Molecular Ecology**,**5**:329-339.
- WILSON, D. 1997. **Bats in question: the Smithsonian answer book**. Washington DC: Smithsonian Institution Press. 168p.
- WRIGHT A.J., VAN DEN BUSSCHE R.A., ENGSTROM M.D. & BAKER R.J. 1999. Systematics of the genera *Carollia* and *Rhinophylla* based on the cytochrome B gene. **Journal of Mammalogy**, **80**(4):1202-1213.