



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ANÁLISE FILOGENÉTICA POPULACIONAL DE *ARTIBEUS PLANIROSTRIS* SPIX,
1823 (CHIROPTERA:MAMMALIA) NO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL,
BASEADA NO GENE *CYTB* MITOCONDRIAL**

Emília Delarmelina Ferreira

Dissertação apresentada à Fundação
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Biologia Animal.
Área de concentração: Zoologia.

Orientador: Dr. Marcelo Oscar Bordignon
Co-orientadora: Dra. Alzira Batista Cecílio

Campo Grande, MS

Maio, 2015



RESOLUÇÃO Nº 26, DE 23 DE FEVEREIRO DE 2015.

O COLEGIADO DE CURSO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições, resolve:

Aprovar a composição da “Banca Examinadora de Dissertação” de **Emília Delarmelina Ferreira**, intitulada “**Análise filogenética populacional de *Artibeus planirostris* Spix, 1823 no Estado de Mato Grosso do Sul, baseada no gene Citocromo B mitocondrial**”, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Oscar Bordignon, conforme segue:

Dr. Fernando Paiva (UFMS - Presidente)
Dra. Betânia Paiva Drumond (UFJF)
Dr. Ricardo Moratelli M. da Rocha (FIOCRUZ)
Dr. Rodrigo Augusto Torres (UFPE)
Dra. Valéria da Cunha Tavares (INPA)

Vanda Lúcia Ferreira,
Presidente.

Emília Delarmelina Ferreira

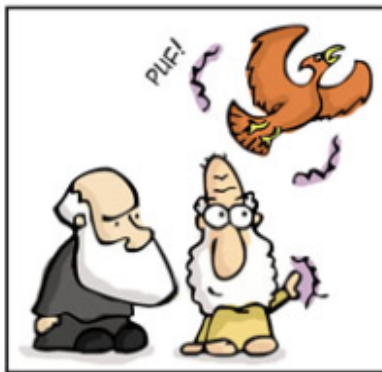
**ANÁLISE FILOGENÉTICA POPULACIONAL DE *ARTIBEUS PLANIROSTRIS* SPIX, 1823
(CHIROPTERA:MAMMALIA) NO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL, BASEADA NO GENE
CYTB MITOCONDRIAL**

Dissertação apresentada à Fundação
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Biologia Animal.
Área de concentração: Zoologia.

Orientador: Dr. Marcelo Oscar Bordignon
Co-orientadora: Dra. Alzira Batista Cecílio

Campo Grande, MS

Maio, 2015



www.umabaobodoqualquer.com

CP

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Dr. Marcelo Bordignon, pela paciência e confiança, pois aceitou me orientar mesmo sem me conhecer e com um projeto com metodologia que não estava habituado, pelo esforço em me ajudar em situações muitas vezes complicadas, coletas que não aconteceriam sem sua grande ajuda e pelo aprendizado.

Agradeço à minha co-orientadora Dra. Alzira Batista Cecílio, por tanto tempo de dedicação, pela oportunidade de aprender sob sua orientação, pelo uso de seu laboratório e de todo o material necessário para a pesquisa e pelo apoio concedido sem me conhecer previamente.

Agradeço também:

A CAPES e a Fundect pela bolsa concedida, o que permitiu concluir esta pesquisa.

A Fundação Ezequiel Dias pela parceria concedida.

Ao centro de pesquisas René Rachou – Fiocruz Minas, pelo sequenciamento de DNA.

Ao Departamento de Zoologia da UFPE e ao professor Dr. Diego Astua de Moraes, pelo esforço em conseguir material e empréstimo dos exemplares do estado de Pernambuco.

Aos professores da banca, por terem aceito revisar este trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação e professores por todo conhecimento repassado. À Liliane por toda ajuda e paciência, sempre!

A Atenisi e a Suely, por terem me encorajado ao mestrado, agradeço de coração!

Aos meus queridos amigos que conquistei em Campo Grande: Eder Barbier, pela amizade, paciência, acolhida em sua casa, pelas oportunidades de coletar e nos divertir ao mesmo tempo, pela ajuda mesmo a distância! Camila Salomão, também pela amizade, paciência, por aceitar dividir o quarto comigo, por me ajudar sempre, pelos momentos de lazer, por tudo!!

As meninas da república por me acolherem em um momento delicado, Marina, Vivi e Wendy. Aos queridos que me acolheram também em congressos, coletas ou visitas acadêmicas, Fabrício, Fernando e Rosânea. A Larissa pelas ajudas à distância. Ao Thiago não só pela companhia e ajuda em coletas mas também pela amizade, por dividir seu conhecimento e tudo mais!

Aos amigos e colegas de laboratório que sempre me ajudaram no andamento desta pesquisa, Sérgio Caldas, Fernanda, Ana Caroline, Rayana, Joyce e Nayara.

À Beth, por me apoiar desde o primeiro momento e me incentivar me dando coragem para ir tão longe de casa, sozinha, foi um aprendizado e tanto! Pela ajuda financeira em todos os momentos. Pela paciência nos momentos complicados de estresse! À você minha eterna gratidão, te amo Mãe!!

Ao João por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis desta jornada, pelo apoio, paciência, carinho e cuidado, obrigada lindo!

Aos meus amigos pela compreensão e paciência ao não poder encontrá-los por tantas vezes, Bela, Thessa, Igor e Aline, vocês são especiais pra mim! A tia Beca e minha irmã Marina, por estarem disponíveis e me ajudarem sempre (ou sempre que possível, rs)! Aos demais amigos e familiares pelo apoio!

Sumário

Resumo.....	7
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Referências Bibliográficas.....	11
Artigo.....	13
Abstract.....	14
Resumo.....	14
1. Introdução.....	15
2. Materiais e Métodos.....	16
3. Resultados.....	21
4. Discussão.....	23
Referências Bibliográficas.....	26
Anexos.....	29
Anexo: Guia para o autor.....	36

Resumo

A ordem Chiroptera possui uma alta riqueza de espécies e é única com capacidade de voo verdadeiro dentre os mamíferos. Possui ampla distribuição mundial, com exceção das regiões polares e algumas ilhas oceânicas. A família Phyllostomidae é caracterizada pela presença de uma folha nasal membranosa, que varia de forma e tamanho entre as espécies. Sua distribuição estende-se do sul dos Estados Unidos até o norte do Chile e Argentina. Como consequência da diversidade de hábitos alimentares e habitats, há grande variação da morfologia craniana e corporal entre as espécies do grupo. Ao fazer a análise dos caracteres morfológicos, sistematas encontram grandes dificuldades pois dependem de informações muitas vezes incompletas. Dados provenientes de marcadores moleculares são capazes de fornecer informações úteis para investigar processos de especiação. O Citocromomo B é um gene capaz de caracterizar a variabilidade interespecíficas e intraespecífica, identificar espécies e populações e estimar relações filogenéticas. A espécie *Artibeus planirostris* possui variação morfológica de acordo com suas populações e distribuição. O objetivo deste estudo foi elucidar as relações filogenéticas de *A. planirostris* dentro do Estado do Mato Grosso do Sul, e compará-las a dados disponíveis de outros estudos.

Abstract

The order Chiroptera has a high species richness and it is only with true flight capacity among mammals. It has worldwide distribution, except for the polar regions and some oceanic islands. The family of the Phyllostomidae is characterized by the presence of a nasal membranous sheet, which varies in shape and size between species. Its distribution extends from the southern United States to northern Chile and Argentina. As a result of the diversity of eating habits and habitats, there is wide variation in cranial morphology and body among the species of the group. By doing the analysis of morphological characters, systematists are great difficulties because they depend on information often incomplete. Data from molecular markers are able to provide useful information to investigate speciation processes. The Cytochrome *B* is a gene capable of characterizing the interspecific and intraspecific variability, identify species and populations and estimate phylogenetic relationships. The species *Artibeus planirostris*, has a morphological variation according to their population and distribution. The aim of this study was to elucidate the phylogenetic relationships of *A. planirostris* within the Mato Grosso do Sul, and compare them to available data from other studies.

Introdução

A família Phyllostomidae é exclusivamente neotropical, sua distribuição estende-se do sul dos Estados Unidos até o norte do Chile e Argentina (Koopman, 1993). Possui um total de 92 espécies distribuídas em 43 gêneros, representando mais da metade das espécies de morcegos descritas no Brasil em 10 subfamílias (Nogueira et al., 2014). A principal característica da família é a presença de uma folha nasal membranosa, que varia de forma e tamanho entre as espécies (Vizzoto & Taddei, 1973). Seus hábitos alimentares variam entre hematofagia, insetivoria, frugivoria, carnivoria e nectarivoria (Reis et al., 2007). A variação de tamanho corporal é grande, podendo ser de 5 g de massa e 17 cm de envergadura em *Ectophylla alba* (Timm, 1982) a 190 g de massa e 100 cm de envergadura em *Vampyrum spectrum* (Navarro & Wilson, 1982).

O gênero *Artibeus* pertence a subfamília Sternodermatinae, com cinco espécies descritas no Brasil (Nogueira et al., 2014). Com grande variação de peso e tamanho, podem consumir pólen, néctar, flores e insetos mas são primariamente frugívoros (Reis et al., 2007; Simmons, 2005). São importantes dispersores de sementes por deixá-las cair dos frutos ao levar para o abrigo ou mesmo ao defecar durante o voo (Aguiar, 2007). A sistemática do grupo sofreu muitas alterações ao longo do tempo. Owen (1987) definiu o grupo como polifilético mas estudos moleculares não suportaram esta afirmação (Van den Bussche et al., 1993; Lim et al., 2004). Owen (1987, 1991) sugeriu a separação das espécies pequenas para o gênero *Dermanura* Gervais, 1856, a inclusão de *Artibeus hartti* no gênero *Enchistenes* Andersen, 1906, e a inclusão de *A. concolor* no gênero *Koopmania*. Van den Bussche et al. (1993) no entanto, baseou-se em dados moleculares e concluiu que não existe suporte para o gênero *Koopmania*. No presente estudo adotou-se a divisão mais recente feita por Nogueira e colaboradores (2014), em que são considerados os gêneros *Artibeus* Leach, 1821 e *Dermanura* Gervais, 1856.

A espécie *Artibeus planirostris* possui variação morfológica de acordo com suas populações e distribuição (Lim et al., 2004, Hollis, 2005). Por muito tempo foi considerada uma subespécie de *A. jamaicensis* (Marques-Aguiar, 1994). Um estudo molecular do gênero mostrou que são espécies distintas mas a colocou em situação confusa com *A. amplus*, *A. obscuros* e *A. lituratus* (Lim et al., 2004). No Estado do Mato Grosso do Sul, a espécie é uma das mais comuns e abundantes e apresenta características cranianas muito variáveis (Pulchério-Leite et al., 1998).

A sistemática filogenética foi definida como o uso de caracteres derivados ou apomórficos para reconstruir as relações de ancestral comum e o agrupamento de táxons com base na ancestralidade comum. A descoberta de grupos monofiléticos é a missão

básica da filogenia. Ao fazer a análise dos caracteres morfológicos, sistematas podem encontrar dificuldades, pois alguns caracteres podem ser ambíguos e/ou não serem definidos em alguns indivíduos, podendo causar assim dois ou mais cladogramas igualmente parcimoniosos e inconsistentes entre si (Willey et al., 1991).

O fenótipo dos organismos é gerado por uma série de interações complexas entre o genótipo e o ambiente, sendo que os genes são a base da herança das características nos organismos, e novas formas gênicas são formadas principalmente por mutação. A mutação produz a variação em que as forças evolutivas irão atuar para “moldar” as características fenotípicas dos organismos (Redondo, 2007). Dados provenientes de marcadores moleculares são capazes de fornecer informações sobre fluxo gênico entre populações (Slatkin, 1987), detectar eventos fundadores populacionais (Avise, 1994), estimar expansão de território (Rogers & Harpending, 1992), sendo úteis para investigar processos de especiação (Moritz et al., 1987; Avise, 2000).

O DNA mitocondrial (DNAm_t) é o marcador molecular mais utilizado em estudos filogeográficos (Avise, 2000) e populacionais (Avise, 1989). O DNAm_t dos mamíferos se apresenta em fita dupla de forma circular fechada, tem componentes de gene bem conservados contendo de 15 a 17 quilobases. Apresenta 2 genes RNA ribossômicos (rRNA), 22 genes RNA transportador (tRNA) e 13 genes de proteína (Moritz et al., 1987). O Citocromomo B (CytB) é um gene de proteína mitocondrial estruturalmente estável, possui pouca variação de tamanho genômico e arranjo gênico entre as espécies de mamíferos. Devido a ausência de recombinação, herança predominantemente materna e alta taxa de evolução, é um marcador molecular extremamente informativo em estudos evolutivos, capaz de caracterizar a variabilidade interespecíficas e intraespecífica, identificar espécies e populações e estimar relações filogenéticas (Moritz et al., 1987; Avise et al., 1987; Avise 1994; 2000; Thoisy et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi avaliar as relações filogenéticas de três populações de *A. planirostris* no estado do Mato Grosso do Sul, e compará-las a dados disponíveis na literatura para outras populações da América do Sul.

Referências Bibliográficas

- Aguiar, L.M.S., Marinho-Filho, J., 2007. Bat Frugivory in a remnant Of Southeastern Brazilian Atlantic forest, 9:251-260
- Avise, J.C., 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43: 1192-1208
- Avise, J.C., 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. London, Chapman & Hall.
- Avise, J.C., 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522
- Hollis, L., 2005. *Artibeus planirostris*. *Mammalian species*, Calgary, Canada, 775, 1-6
- Koopman, K.F., 1993. Chiroptera. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M., *Mammal Species of the World*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, EUA
- Lim, B.K., Engstrom, M.D., Lee, T.E. JR, 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
- 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, Zoologia* 10, 3-83.
- Moritz, C., Dowling, T.E., Brown, W.M., 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 269-292.
- Navarro, D.L., Wilson, D.E., 1982. *Vampyrum spectrum*. *Mammalian Species*, American Society of Mammalogists, 184:1-4
- Nogueira, M.R., de Lima, I.P., Moratelli, R., Tavares, V.C., Gregorin, R., Peracchi, A.L., 2014. Checklist of Brazilian Bats, with coments of original records. *Check List* 10(4): 808-21
- Owen, R.D., 1987. Phylogenetic analyses of the bat subfamily Sternodermatinae (Mammalia: Chiroptera). *Spec. Pub., Mus. Texas Tech. Univ.* 26, 1-65.
- Owen, R.D., 1991. The systematic status of *Dermanura concolor* (Peters, 1865) (Chiroptera: Phyllostomidae), with description of a new genus. *B. Am. Mus. Nat. Hist.* 206, 18-25.
- Pulchério-Leite, A., Meneguelli, M., Taddei, V.A., 1998. Morcegos dos Pantanaís de Aquidauana e da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul. I. Diversidade de Espécies. *Ensaios e Ciência, Campo Grande-MS, Brasil*, 2(2), 149-163

- Redondo, A.F.R., 2007. Estudos evolutivos em quirópteros neotropicais, Tese, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
- Reis, N. R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P., 2007. Morcegos do Brasil. Londrina:Brasil 253p. 18-25, 108-129
- Rogers, A., Harpending, H.C., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 522-69.
- Simmons, N.B., 2005. Order Chiroptera. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammal Species of the World, a Taxonomic and Geographic reference*, Vol 1, third ed. John Hopkins University Press, Washington, DC, pp. 312–529.
- Slatkin, M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-92.
- Thoisy, B., Silva, A.G., Ruiz-García, M., Tapia, A., Ramirez, O., Arana, M., Quse, V., Paz-Y-Miño, C., Tobler, M., Pedraza, C., Lavergne, A. N., 2010. Population history, phylogeography, and conservation genetics of the last Neotropical mega-herbivore, the lowland tapir (*Tapirus terrestris*). *BMC Evolutionary Biology*, Guiana Francesa, 10:278
- Timm, R.M., 1982. *Ectophylla alba*. *Mammalian Species*, American Society of Mammalogists, 166:1-4
- 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. *Mol. Biol. Evol.* 10, 944-959
- Vaughan, T. A., Ryan, J. M., et al. 2000. *Mammalogy*, fourth edition.
- Vizzoto, L.D., Taddei, V.A., 1973. Chave para identificação de quirópteros brasileiros. *Revista Faculdade Filosofia Ciências Letras, São José do Rio Preto.* 1, 1-72.
- Wiley, E.O., Siegel-Causey, D., Broks, D.R., Funk, V.A., 1991. *The Complete Cladistic: A Primer of Phylogenetic Procedures*. University of Kansas, Museum of Natural History, EUA, Special Publication, 19

Análise Filogenética Populacional de *Artibeus planirostris* Spix, 1823 (Chiroptera:Mammalia) no Estado do Mato Grosso do Sul, baseada no gene CytB Mitochondrial

Emília Delarmelina Ferreira^{1*}, Alzira Batista Cecílio², Marcelo Oscar Bordignon³

¹ Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

² Serviço de Biotecnologia e Saúde, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³ Departamento de Zoologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

* Autor Correspondente:

Telefone: +55 31 9638-5877

E-mail: emilia.biologa@gmail.com

Abstract

The species *Artibeus planirostris* has a morphological variation between populations, generating discussions about its taxonomic identity. For a long time the species was considered a subspecies of *Artibeus jamaicensis*, but recent molecular studies do not support this assertion. This paper makes a comparison between *A. planirostris* samples from three locations in the State of Mato Grosso do Sul, using the skull morphology and molecular data of CytB. The results indicate that there are no differences in the populations considering the sampling and the used marker. New analyzes are necessary to complement this study.

Keywords: Cytochrome b; population; Molecular Systematics; Chiroptera; bats.

Resumo

A espécie *Artibeus planirostris* possui variação morfológica entre suas populações, gerando discussões sobre sua identidade taxonômica. Por muito tempo a espécie foi considerada uma subespécie de *Artibeus jamaicensis*, mas recentes estudos moleculares não sustentam esta afirmação. Este trabalho faz uma comparação de *A. planirostris* entre amostras de três localidades no Estado de Mato Grosso do Sul, utilizando a morfologia do crânio e dados moleculares do CytB. Os resultados indicam que não há divergências nas populações considerando a amostragem e o marcador utilizado. Novas análises são necessárias para complementar este estudo.

Palavras chave: Citocromo b; população; Sistemática Molecular; Chiroptera; morcegos.

1. Introdução

O gênero *Artibeus* Leach, 1821 pertence a família Phyllostomidae, subfamília Stenodermatinae e agrupa dois subgêneros, *Artibeus* e *Koopmania* (Hooper et al., 2008; Solari et al., 2009). Possui cinco espécies descritas no Brasil: *Artibeus concolor* Peters, 1865; *Artibeus fimbriatus* Gray, 1838; *Artibeus lituratus* Olfers, 1818; *Artibeus obscurus* Schinz, 1821; *Artibeus planirostris* Spix, 1823 (Nogueira et al., 2014). Segundo Owen (1987), trata-se de um grupo polifilético, porém, esta visão não é suportada por dados moleculares (Van den Bussche et al., 1993; 1998; Lim et al., 2004;). Com o subgênero *Dermanura* recentemente elevado ao grau gênero (Solari et al., 2009), a relação entre as espécies tem sido alvo de debate contínuo (Van den Bussche et al., 1998; Lim et al., 2004; Hooper et al., 2008; Solari et al., 2009).

Segundo Lim e colaboradores (2004) e Hollis (2005) *Artibeus planirostris* possui grande variação morfológica ao longo de sua ampla área de distribuição, gerando dúvidas e por vezes discussões sobre sua identidade taxonômica. Esta espécie possui massa variando entre 40-69 g e antebraço de 62-73 mm, distribuindo-se desde a Venezuela até o norte de Argentina. Possui coloração acinzentada, listras faciais pouco perceptíveis, orelhas pequenas com pontas arredondadas, trago curto, folha nasal bem desenvolvida com porção médio-basal livre e uropatágio com poucos pelos (Hollis, 2005).

Por muito tempo a espécie foi considerada uma subespécie de *Artibeus jamaicensis* (Handley, 1987; Marques-Aguiar, 1994). Alguns autores defendem a não distinção das duas espécies por não terem caracteres suficientes para justificar a separação (Marques-Aguiar, 1994; Simmons, 2005), porém, evidências morfológicas e moleculares apontam que são duas espécies distintas (Lim et al., 1997; 2004; Guerrero et al., 2004). O trabalho de Lim et al (2004) buscou elucidar as relações filogenéticas do gênero, incluindo explicar a relação de *A. planirostris* e *A. jamaicensis*. Os dados desse trabalho mostraram que se tratavam de espécies

diferentes, porém a relação entre *A. obscuros*, *A. planirostris*, *A. amplus* e *A. lituratus* teve um suporte pouco consistente devido ao número de indivíduos utilizados em sua análise (Figura 1).

Velazco et al, (2010) ao estudarem o citocromo B mitocondrial (*CytB*) do gênero *Plathyrrhinus* Saussure, 1860, identificaram variações genéticas e a partir da nova descoberta, observaram pequenas variações morfológicas antes não percebidas.

A escolha do *CytB* se refere a dados resultantes da variabilidade genética do DNA mitocondrial, comumente utilizado para o estudo da história natural das espécies e dispersão de caracteres pois são marcadores adequados para a investigação evolutiva (Thoisy et al., 2010). O gene *CytB* tem sido utilizado como marcador para estudos filogenéticos e filogeográficos (Avise et al., 1987; Avise, 1989; Avise 2000), se mostrou uma importante ferramenta para estruturação de gêneros (Lim et a., 2004; Redondo 2008) e populações (Brown et a., 2011).

O presente estudo teve como objetivo verificar a existência de diferenças genéticas e morfológicas em amostras populacionais de *A. planirostris* em regiões distintas do estado do Mato Grosso do Sul, uma das espécies mais comuns e abundantes no Pantanal e Cerrado.

2. Materiais e Métodos

2.1 Área de estudo e coleta dos animais:

As coletas foram realizadas em três municípios no estado do Mato Grosso do Sul (MS), Campo Grande, Nova Andradina e Corumbá (Comunidade Passo do Lontra) distando aproximadamente 300 km de um ponto de coleta a outro (Figura 2). As duas primeiras são áreas de Cerrado e a última, Pantanal. O Cerrado *sensu lato* (bioma Cerrado) é composto por um gradiente de fisionomias que vão desde campos abertos (campo limpo) à floresta esclerófila (cerradão), passando pelas fisionomias savânicas propriamente ditas (campo sujo,

campo cerrado, cerrado *sensu stricto*). Já no Domínio do Cerrado ocorrem outras formações vegetais, como floresta estacional, floresta ripária, campo úmido e campo rupestre (Coutinho, 1978). O Pantanal é uma planície sedimentar e 65% do seu território se encontra no Mato Grosso do Sul. Sua área é alagável e possui ciclos anuais de inundação e rebaixamento das águas, assim como a aglutinação em períodos de vários anos com inundações mais volumosas, alternadas com períodos mais secos, determinam forte zonação na distribuição da vegetação, principalmente a vegetação rasteira. Sua vegetação é influenciada por quatro principais biomas: Amazônia, Cerrado, Chaco e Mata Atlântica (Prance et al., 1992).

Foram coletados cinco morcegos em cada ponto de amostragem (município) por meio de redes de neblina de 9x3m. As coletas foram devidamente autorizadas pelo IBAMA/SISBIO e possui o número de registro: 39649-1. Os animais foram anestesiados com acepromazina na dose de 2,5 mg/kg, aplicada por via subcutânea e, após alguns minutos o animal foi eutanasiado com tiopental sódico na dose de 150 mg/kg aplicado por via intraperitoneal. Este protocolo foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS) e possui o número de registro: 584/2013.

Preliminarmente, testou-se o uso de RNA *Later*® para conservação de diferentes tipos de tecido e período máximo de conservação dos mesmos à temperatura ambiente. Posteriormente esses tecidos foram submetidos à extração de DNA e posteriormente à PCR para a verificação da preservação do DNA para fins desta pesquisa. Observou-se que o reagente preservou os tecidos e DNA por um período de sete dias em temperatura ambiente e mostrou-se ideal para realidade das áreas de coleta, onde muitas vezes o resfriamento das amostras ocorre após algumas horas da coleta. Desta forma, tecidos hepático, cardíaco, sanguíneo e epitelial (patágio) dos indivíduos coletados foram mantidos em RNA *Later*® Solution da Ambion™ e após a coleta condicionados à temperatura -20° C. Outros cinco

indivíduos do estado de Pernambuco foram cedidos por empréstimo pela UFPE, sendo um indivíduo coletado no Vale do Catimbau e quatro indivíduos no município de Recife com o intuito de comparar o grau de diferenciação morfológica e molecular dos indivíduos coletados no MS.

2.2 Análise Morfométrica:

Análises morfométricas foram realizadas com base nos caracteres cranianos (Vizzoto e Taddei, 1973; Araújo e Langguth, 2010). As medidas foram tomadas empregando um paquímetro digital com precisão de 0,1 mm. Os caracteres medidos foram: Comprimento total do crânio, da borda alveolar anterior dos incisivos centrais superiores ao extremo posterior do occipital; Comprimento cêndilo basal, da borda alveolar anterior de um dos incisivos centrais superiores ao ponto distal do cêndilo occipital correspondente; Comprimento palatal, da borda alveolar posterior de um dos incisivos centrais ao ponto mais anterior da chanfradura palatina, ao nível das coanas; Comprimento da série de dentes superiores, da borda alveolar anterior do canino superior à borda alveolar posterior do último molar da mesma série; Comprimento da série de dentes inferiores, da borda alveolar anterior do canino inferior à borda alveolar posterior do último molar da mesma série; Comprimento da mandíbula, da borda anterior dos incisivos centrais ao ponto distal do processo condilóide (articular); Largura externa dos cingula-caninos, entre os pontos extremos externos dos cingula dos caninos superiores; Largura externa dos molares, entre os pontos extremos das bordas alveolares externas dos molares superiores; Largura interorbital, entre os pontos mais próximos das constrições orbitais; Largura posorbitária, entre os pontos mais próximos na constrição posorbitária; Largura zigomática, entre os pontos extremos laterais dos arcos zigomáticos; Largura da caixa craniana, entre os pontos extremos das paredes da caixa craniana, na região escamosal do temporal; Largura mastoidea, entre os pontos extremos dos processos mastoideos; Largura

palatal, entre os pontos mais próximos das bordas alveolares internas dos últimos molares; Altura da caixa craniana, do ponto mais profundo do basioccipital ao ponto mais elevado do parietal, desprezando a crista sagital; Altura do occipital, da borda anterior do foramen magnum ao ponto de união das cristas lambdoideas e sagital.

O teste Shapiro-Wilk foi realizado para verificar se havia a distribuição normal dos dados. Duas análises exploratórias foram realizadas para identificar a presença de agrupamentos entre as populações utilizando todas as medidas tomadas. Realizou-se também a Análise de Componentes Principais (PCA) e a análise de Cluster apresentada através de um dendograma. Também foi realizado o teste t para identificar possível dimorfismo sexual com cada um dos caracteres mensurados. Posteriormente a Análise de Variância Multivariada (MANOVA) foi realizada utilizando os caracteres com peso maior ou igual a 20%, obtidos através da análise de PCA, para verificar se existe diferença significativa entre as populações. Os testes foram realizado no programa Past 2.17 (Hammer, et al., 2001)

2.3 Métodos Moleculares

2.3.1 Extração do DNA

Foram feitas as extrações de DNA do fígado e coração com o kit Wizard® Genomic DNA Purification da Promega™ com o protocolo sugerido pelo fabricante. O produto da extração foi visualizado em gel de agarose 0,8% (Sambrook et al., 2001) para verificar a presença do DNA. O protocolo foi otimizado para extração de DNA do patágio, a fim de criar um método menos invasivo, porém, a criação do mesmo ocorreu de forma paralela ao andamento da pesquisa, impossibilitando a sua aplicação neste estudo. Esse protocolo permite a criação de banco de dados sem que ocorra a eutanásia do animal.

2.3.2 Reação em cadeia polimerase PCR:

O gene *CytB* completo foi amplificado utilizando os iniciadores (primers) LG765 e LG766 (Cronin et al., 1999) à 10pmol, e PCR Supermix® da marca Invitrogen™, gerando um fragmento de aproximadamente 1250 pb. As amostras eram aquecidas inicialmente a 95° C por 5 minutos para a desnaturação e depois submetidas a 40 ciclos. Estes ciclos consistiam em 95° C por 45 segundos (desnaturação), 50° C por 40 segundos (anelamento) e 70° C por 2 minutos e 30 segundos (extensão). Para finalizar a PCR, as amostras foram submetidas a 70° C por 10 minutos para a extensão final (Cronin et al., 1999).

Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 0,8% (Sambrook et al., 2001). As amostras foram purificadas utilizando o kit QIAquick® PCR Purification da marca QIAGEN™ (Lim et al., 2004), com o protocolo sugerido pelo fabricante. A quantificação do DNA amplificado foi realizada a partir do aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer da marca Invitrogen™, utilizando os kits Qubit® dsDNA HS Assay e Qubit® dsDNA BR Assay, do próprio fabricante.

2.3.3 Sequenciamento:

O sequenciamento foi feito em um aparelho ABI Prism® 3730 DNA Analyzer da Applied Biosystems™. A reação de sequenciamento foi feita utilizando o kit Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit da Applied Biosystems™. Para cada reação usou-se 0,5µL da solução Big Dye®, 1,75µL de tampão fornecido no kit Big Dye®, 1µL de primer (LG765 ou LG766) a 5pmol, 100ng de DNA da amostra e completados para 10µL com água Milli-Q. O ciclo completo utilizado foi o sugerido pelo fabricante do sequenciador. Consistiu em 96° C por 1 minuto para a desnaturação, depois repetia-se o seguinte ciclo por 40 vezes: 96° C por 15 segundos para desnaturação, 50° C por 15 segundos para anelamento e 60° C por 4 minutos para extensão do DNA. Para cada indivíduos utilizou-se uma amostra (fígado ou

coração) e realizou-se quatro sequenciamentos, dois com primer forward e dois com primer reverse.

2.3.4 Montagem e validação das sequências:

A análise dos picos das sequências assim como as informações necessárias para a montagem de uma sequência consenso (contig) foi mensurada no programa Asparagim desenvolvido pela Embrapa e que pode ser acessado on line (Togawa, 2006). Os fragmentos sequenciados foram submetidos ao programa CAP3 Sequence Assembly (Huang e Madan, 1999) onde obteve-se os contigs.

2.3.5 Busca de sequências no GenBank:

Quarenta e seis sequências foram obtidas no GenBank com o intuito de comparar às sequências deste estudo. Estas sequências foram definidas contemplando diferentes localidades onde ocorre a espécie *A. planirostris*. O código de acesso dos indivíduos retirados do GenBank assim como suas localidades podem ser encontrados na tabela em anexo (Tabela 1).

2.3.6 Análise Filogenética:

As sequências obtidas foram alinhadas usando o programa Clustal W (Larkin et al., 2007) de forma múltipla e par-à-par, com abertura e extensão de Gaps. Após inspeção manual, as extremidades do alinhamento foram excluídas usando como referência a menor sequência. O modelo de substituição Tamura-Nei (TN-93) (Tamura e Nei, 1993) foi selecionado a partir do critério Akaike implementado no programa Mega6 (Tamura et al., 2013). Utilizou-se também software MEGA 6.0 para estimar valores de Divergência Evolucionária e para reconstrução filogenética no método Máxima Verossimilhança (MV). A confiabilidade dos padrões de ramificação foi testada através de 1.000 amostragens de bootstrap. Como grupo externo foi utilizada a espécie *Carolia perspicilata*.

3. Resultados

3.1 Caracteres Cranianos:

Através do teste t constatou-se não haver diferenças significativas entre as medidas cranianas dos machos e das fêmeas de *A. planirostris*. Ou seja, não há dimorfismo sexual quanto ao tamanho na espécie.

Para as próximas análises a amostra do Vale do Catimbau não foi considerado visto que não se pode afirmar que esta que pertence à mesma população das amostras de Recife. De acordo com o gráfico da PCA, observa-se a separação das populações de Nova Andradina, Campo Grande e Pernambuco (Figura 3). A amostra colhida no Pantanal apresenta sobreposição com as amostras das áreas de Nova Andradina e Campo Grande. Pela análise empregando a MANOVA, constatou-se diferença significativa entre as populações (Pillai Trace = 1,983; $p = 0,0002516$). Os resultados de Posthoc mostram que apenas a população de Pernambuco diferencia da população de Nova Andradina, apesar das populações de Pernambuco/Campo Grande e Pernambuco/Pantanal também estarem próximas ao valor de referência ($P = < 0,05$). A análise par a par está contida na tabela 2.

No dendograma constituído com dados morfológicos (Figura 4), é possível observar três grupos, o primeiro com indivíduos de Campo Grande – MS e dois indivíduos do Pantanal – MS, o segundo com indivíduos de Recife – PE, um indivíduo de Recife alinhado com grupo irmão dos demais indivíduos e o último grupo com indivíduos de Nova Andradina – MS mais três indivíduos do Pantanal – MS.

3.2 Análise Molecular:

Foram sequenciados 19 indivíduos no total, cinco indivíduos para cada uma das quatro localidades, exceto para a localidade de Recife, onde foram sequenciados quatro indivíduos. Para cada indivíduo foram feitas 4 reações de sequenciamento, sendo que a qualidade do

material sequenciado variou de acordo com a amplificação obtida, assim, foram selecionados 14 indivíduos garantindo a confiabilidade das sequências parciais de 530 pares de base.

A Divergência Evolucionária intraespecífica de *A. planirostris* variou de 0 à 0,03. Entre *A. planirostris* e o grupo externo *C. perspicilata*, esta variação foi de 0,17 à 0,2 pelo método TN-93. Esses valores permaneceram dentro o padrão esperado (0,01 à 0,03).

A árvore filogenética pelo método ML dos indivíduos sequenciados pelo presente estudo e sequências acessadas no GenBank pode ser observada na figura 5. Amostras coletadas nos três pontos no estado do MS se uniram a um grupo de amostras amazônicas e também a outro grupo onde se encontram indivíduos do sudeste brasileiro, Paraguai e Guiana Francesa. Outros dois grupos se formaram, um grande grupo com amostras do nordeste brasileiro e outro grupo menor com amostras das ilhas do Caribe.

4. Discussão

As populações de *A. planirostris* habitam quase todo o continente da América do Sul e parte de suas ilhas (Hollis, 2005). A diferença morfológica entre as populações pode ser um reflexo de uma combinação de isolamento geográfico e condições ecológicas (Lim, 1997). Não foi possível comparar as medidas individuais cranianas deste estudo com medidas de outros estudos já publicados, porém, evidências bibliográficas mostram uma tendência dos indivíduos da Amazônia serem maiores e mais robustos passando pelo seu médio porte no centro-oeste brasileiro e chegando aos seus menores espécimes no nordeste brasileiro (Koepcke e Kraft, 1984; Araújo e Langguth, 2010).

A espécie *A. planirostris* foi amostrada tanto em grandes áreas de preservação (Pantanal: Passo do Lontra – Corumbá) quanto em pequenas remanescentes de cerrado (Nova Andradina e Campo Grande). Hollis (2005) descreveu a espécie como sendo preferencialmente frugívora, mas pode oportunamente se alimentar de flores e insetos. Os

diferentes habitats em que foram coletados os indivíduos deste estudo proporcionam também uma diferente qualidade e quantidade de oferta de alimentos e abrigos, o que seleciona indivíduos mais adaptados. As populações de Campo Grande e Nova Andradina foram separadas pelo dendograma morfológico. Apesar de ambos os locais de coleta estarem inseridos no bioma Cerrado, há uma grande diferença entre os ambientes. A remanescente de Cerrado de Campo Grande está inserida em um ambiente urbano e Nova Andradina possui várias pequenas áreas de conservação, onde a espécie não teria dificuldades em transitar sobre elas e aumentar sua diversidade genética. Para os indivíduos do Pantanal, esta distância morfológica pode ser menor devido a maior área e possibilidade de integração entre indivíduos de diferentes grupos, fator os manteve entre as populações de Campo Grande e Nova Andradina nas análises de PCA e Cluster. Características morfológicas são mais facilmente reforçadas quando há um menor índice de variabilidade genética (Moritz et al., 1987; Avise et al., 1987).

Mesmo se tratando de uma espécie que possui capacidade de voo, deve-se levar em consideração a distância mínima entre os pontos de coleta dos indivíduos de Recife e o seguinte mais próximo (Campo Grande), aproximadamente 2.500 km. Embora o histórico de migração desta espécie seja desconhecido, a probabilidade de haver troca gênica entre estas populações são pequenas, outro fator é que as mesmas estão inseridas em biomas diferentes, onde a oferta de abrigo e alimento é distinta. Isto deve explicar seu isolamento morfológico.

Segundo Bradley e Baker (2001), para Chiroptera os valores de distância do *CytB* são aceitáveis em um nível alto, de 0 até 3,83 o que difere muito dos pequenos roedores onde os valores podem chegar a 0,53. Apesar da distância intragênero defendida por Bradley e Baker ser de no mínimo 2,51, este valor não nos fornece um bom suporte devido ao N amostral baixo utilizado pelo mesmo (7 espécies). Outro motivo pelo qual a distância entre o objeto de estudo e o grupo externo ser tão próxima, seria o fato de não ter sido utilizado o gene

completo (1140pb) e sim apenas 530pb. Isto pode ter influenciado ao selecionar uma parte mais “conservada” do *CytB*.

Apesar das populações de *A. planirostris* serem encontradas em áreas geograficamente isoladas como ilhas oceânicas ou onde não há barreiras geográficas, nossos dados mostram para o *CytB* estas populações não são bem diferenciadas. De acordo com Baker e Bradley (2006), o conceito genético de espécies se baseia em um grupo de populações naturais intercruzantes que são geneticamente isolados de outros grupos. A conclusão em que existem diferentes populações de *A. planirostris*, bem como a tendência do isolamento genético das mesmas não podem ser tomadas, análises complementares são necessárias para tais conclusões. O fato de encontrar diferentes linhagens em um mesmo ponto de coleta demonstra que esta espécie teve uma rápida expansão demográfica no Estado do MS.

Ferramentas moleculares são extremamente importantes para o estudo do filogenético entre populações. O gene *CytB* possui marcadores adequados para investigação evolucionária por ser mais conservado, dando suporte ao estudo da história natural da espécie. A ausência de estruturação geográfica também indica que houve uma rápida dispersão da espécie no local. Um estudo populacional com o gênero *Noctilio* mostrou resultado semelhante quanto a dispersão da espécie (Pavan, 2008). É importante ressaltar que o *CytB* por ser mitocondrial, carrega informações genéticas apenas da linhagem materna e é muito conservado. Os resultados do presente estudo mostram que tanto a escolha do método morfológico quanto o molecular trouxeram resultados relevantes ao estudo de populações de *Artibeus planirostris*. Análises complementares como a Inferência Bayesiana, o gene *CytB* completo, inclusão de outros genes mitocondriais e Microssatélites serão importantes para um maior entendimento da sistemática e biogeografia do grupo.

Referências Bibliográficas

ARAÚJO, P., e LANGGUTH, A., 2010. Caracteres distintivos das quatro espécies de grandes *Artibeus* (Phyllostomidae) de Paraíba e Pernambuco, Brasil. *Chiroptera Neotropical*, no. 16, vol. 2, p. 715-722.

AVISE, JC., 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, no. 43, p. 1192-1208.

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

AVISE, JC., ARNOLD, J., BALL, RM., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, JE., REEB, CA. e SAUNDERS, NC., 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, no. 18, p. 489-522.

BRADLEY, RD. e BAKER, RJ., 2001. A Test of Genetic Species Concept: Cytochrome-*b* Sequences and Mammals. *Journal of Mammalogy*, no. 82, vol. 4, p. 960-973.

BROWN, VA., BROKE, A., FORDYCE, JA. e MCCRACKEN, GF., 2011. Genetic analysis of populations of the threatened bat *Pteropus mariannus*. *Conservation Genetics*, vol. 12, p. 933-941.

COUTINHO, LM., 1978. O conceito de Cerrado. *Revista Brasil Botanica*, no. 1, p. 17-23.

CRONIN, M., SHIDELER, R., HECHTEL, J., STROBECK, C. e PAETKAU, D., 1999. Genetic Relationships of Grizzly Bears (*Ursus arctos*) in the Prudhoe Bay Region of Alaska: Inference from Microsatellite DNA, Mitochondrial DNA, and Fiels Observations. *The American Genetic Association*, no. 90, p. 622-628.

GUERRERO, JA., DE LUNA, E. e GONZÁLEZ, D., 2004. Taxonomic status of *Artibeus jamaicensis triomylus* inferred from molecular and morphometric data. *J. Mammal*, no. 85, vol. 5, p. 866-874.

HAMMER, Ø., HARPER, DAT., RYAN, PD., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, no. 4, no. 1, p 1-9.

HANDLEY, CO. JR., 1987. New species of mammals from northern South America: fruit-eating bats, genus *Artibeus* Leach. In *Studies in neotropical mammalogy, essays in honor of Phillip Hershkovitz* (B. D. Patterson and R. M. Timm, eds.). *Fieldiana: Zoology (New Series)*, no. 39, p. 163-172.

HOLLIS, L., 2005. *Artibeus planirostris*. *Mammalian species*, no. 775, p. 1-6.

HOOFER, SR., SOLARI, S., LARSEN, PA., BRADLEY, RD. e BAKER, RJ., 2008. Phylogenetics of the Fruit-eating Bats (Phyllostomidae: Artibeina) Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University*, no. 272, p. 1-16.

- HUANG, X. e MADAN, A., 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, no. 9, p. 868-877.
- KOEPCKE, J. e KRAFT, R., 1984. Cranial and external characters of the large fruit bats of the genus *Artibeus* from Amazonian Peru. *Spixiana*, no. 7, p. 75-84.
- LARKIN, MA., BLACKSHIELDS, G., BROWN, NP., CHENNA, R., MCGETTIGAN, PA., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, IM., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, JD., GIBSON, TJ. E HIGGINS, DG., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, no. 23, p. 2947-2948.
- LIM, BK., 1997. Morphometric differentiation and species status of the allopatric fruit-eating bats *Artibeus jamaicensis* and *A. planirostris* in Venezuela. *Studies in Neotropical Fauna and Environment*, no. 32, p. 65-71.
- LIM, BK., ENGSTROM, MD., LEE, TE. JR, PATTON, JC. e BICKHAM, JW., 2004. Molecular differentiation of large species of fruit-eating bats (*Artibeus*) and phylogenetic relationships based on the cytochrome *b* gene. *Acta Chiropterologica*, no. 6, vol. 1, p. 1-12.
- MARQUES-AGUIAR, SA., 1994. A systematic review of the large species of *Artibeus* Leach, 1821 (Mammalia: Chiroptera), with some phylogenetic inferences. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Zoologia*, no. 10, p. 3-83.
- MORITZ, C., DOWLING, TE. e BROWN, WM., 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, no. 18, p. 269-292.
- NOGUEIRA, MR., DE LIMA, IP., MORATELLI, R., TAVARES, VC., GREGORIN, R. e PERACCHI, AL., 2014. Checklist of Brazilian Bats, with comments of original records. *Check List*, no. 10, vol. 4, p. 808-21.
- OWEN, RD., 1987. Phylogenetic analyses of the bat subfamily Sternodermatinae (Mammalia: Chiroptera). *Spec. Pub., Mus. Texas Tech. Univ*, no. 26, p. 1-65.
- PAVAN, ACD., 2008. Filogeografia e Diversidade Genética do Gênero *Noctilio* (Chiroptera: Noctilionidae). São Paulo: Universidade de São Paulo. 71p. Dissertação de Mestrado Ciência.
- PRANCE, GT. e SCHALLER, GB., 1982. Preliminary study of some vegetation types of the Pantanal, Mato grosso, Brazil. *Brittonia*, no. 34, vol. 2, p. 228-251.
- REDONDO, RAF., BRINA, LPS., SILVA, RF., DITCHFIELD, AD. e SANTOS, FR., 2008. Molecular systematics of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, no. 49, p. 44-58.
- SAMBROOK, J. e RUSSEL, DW., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL press, 3 ed.
- SIMMONS, NB., 2005. Order Chiroptera. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammal Species of the World, a Taxonomic and Geographic reference*, vol. 1, third ed. John Hopkins University Press, Washington, DC, 312-529.

SOLARI, S., HOOFFER, SR., LARSEN, PA., BROWN, AD., BULL, RJ., GUERRERO, JA., ORTEGA, J., CARRERA, JP., BRADLEY, RD. e BAKER, R., 2009. Operational criteria for genetically defined species analysis of the diversification of the small fruit-eating bats, *Dermanura* (Phyllostomidae: Stenodermatinae). *Acta Chiropterologica*, no. 11, vol. 2, p. 279-288.

TAMURA, K. e NEI, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, no. 10, p. 512-526.

TAMURA, K, STECHER, G, PETERSON, D, FILIPKI, A. e KUMAR, S, 2013. Mega6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, no. 30, p. 2725-2729.

THOISY, B., SILVA, AG., RUIZ-GARCÍA, M., TAPIA, A., RAMIREZ, O., ARANA, M., QUSE, V., PAZ-Y-MIÑO, C., TOBLER, M., PEDRAZA, C. e LAVERGNE, AN., 2010. Population history, phylogeography, and conservation genetics of the last Neotropical mega-herbivore, the lowland tapir (*Tapirus terrestris*). *BMC Evolutionary Biology*, no. 10, p. 278.

TOGAWA, RC., BRIGIDO, MM., SANTOS, CMR. e JUNIOR, MT., 2006. The use of the PHPH tool to assembly the gene sequences that are candidate to the biotic and abiotic stress in *Musa acuminata*. XXXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Aguas de Lindoia, SP, Brazil.

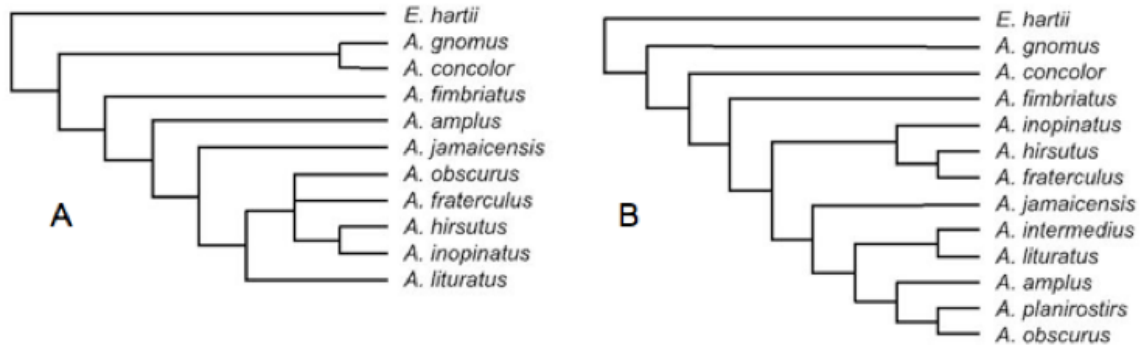
VAN DEN BUSSCHE, RA., HUDGEONS, JL. e BAKER, RJ., 1998. Phylogenetic accuracy, stability, and congruence: relationships within and among the New World bat genera *Artibeus*, *Dermanura* and *Koopmania*. In: Kunz, T.H., Racey, P.A. (Eds.), *Bat Biology and Conservation*. Smithsonian Institution, Washington, DC, p. 43-58.

VAN DEN BUSSCHE, RA., BAKER, RJ., WICHMAN, HA. e HAMILTON, MJ., 1993. Molecular phylogenetics of Stenodermatini bat genera: Congruence of data from nuclear and mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, no. 10, p. 944-959.

VELAZCO, PM., GARDNER, AL. e PATTERSON, BD., 2010. Systematics of the *Platyrrhinus helleri* species complex (Chiroptera: Phyllostomidae), with descriptions of two new species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 159, no. 3, p. 785-812.

VIZZOTO, LD. e TADDEI, VA., 1973. Chave para identificação de quirópteros brasileiros. *Revista Faculdade Filosofia Ciências Letras*, no. 1, p. 1-72.

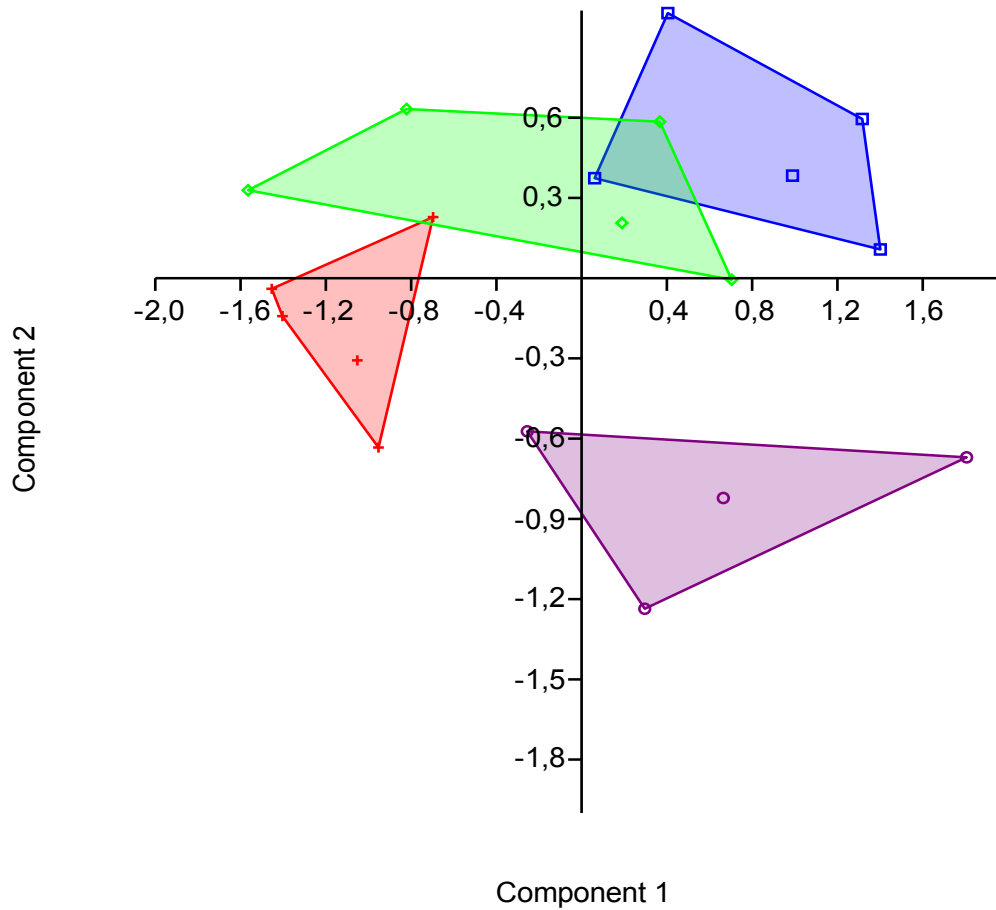
1. Figura 1: A) Cladograma para o gênero *Artibeus* com base em caracteres morfológicos descrito por Marques-Aguiar (1994); B) Cladograma para o gênero *Artibeus* baseado em caracteres do citocromo-*B* mitocondrial descrito por Lim et al (2004).



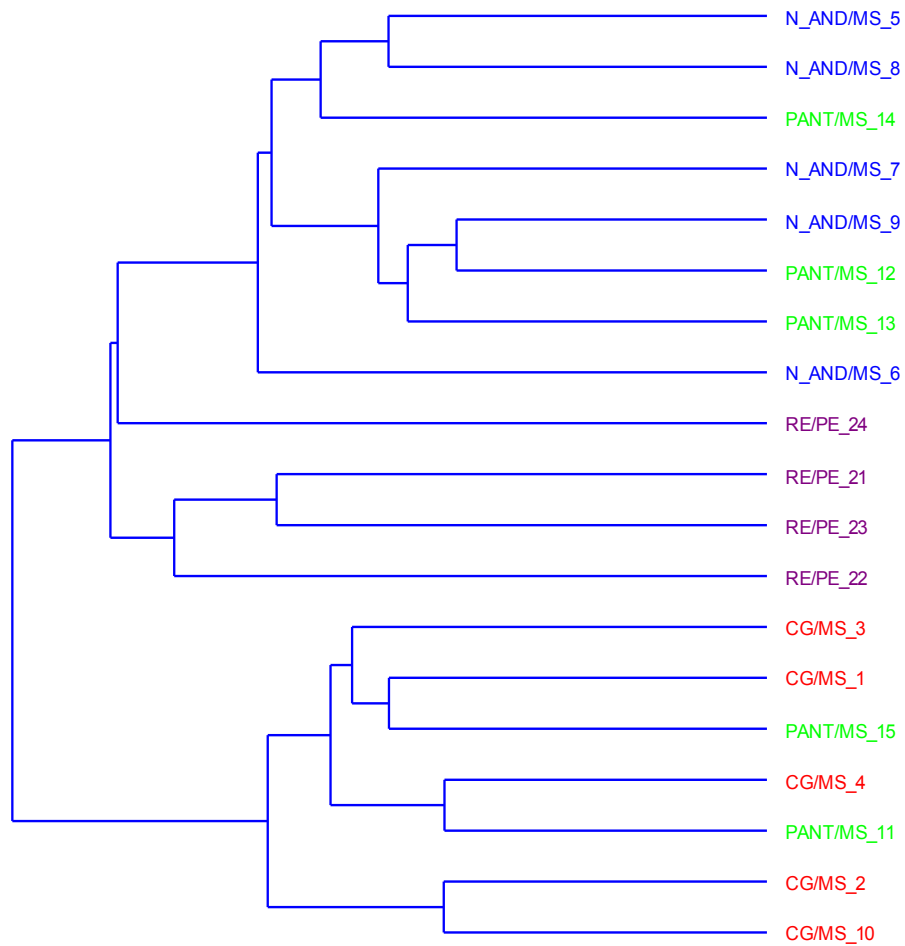
2. Figura 2: Localização de coleta dos indivíduos sequenciados pelo presente estudo. 1- Passo do Lontra – Pantanal (Miranda - MS), 2- Campo Grande (MS), 3- Nova Andradina (MS), 4- Recife (PE).



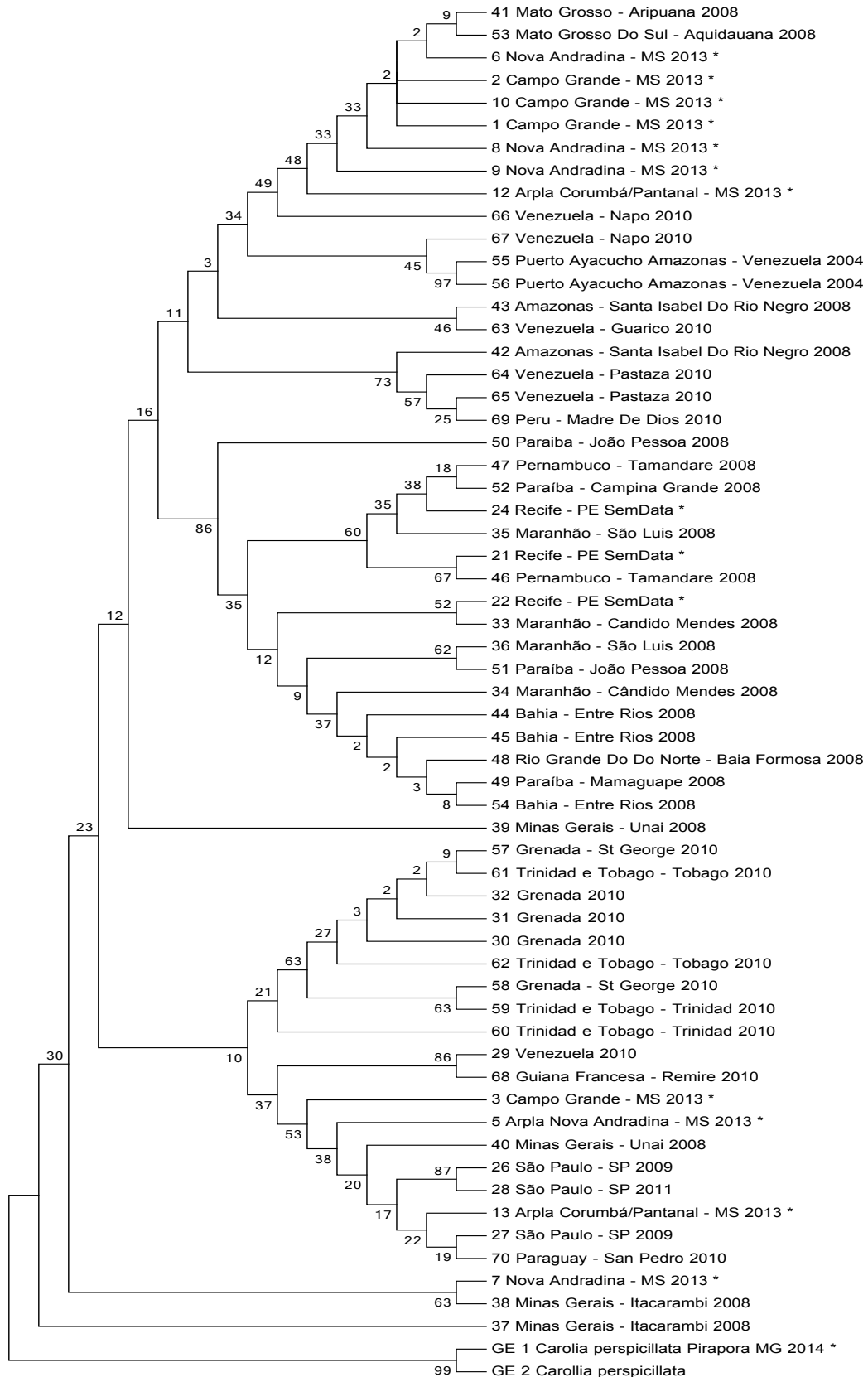
3. Figura 3: Análise de PCA de *Artibeus planirostris*, baseado em dados morfológicos cranianos. Componente 1 com Eigenvalue 10,597 com 50,66% de variância e componente 2 com eigenvalue 0,337 e 16,13% de variância. Em verde, indivíduos do Pantanal (Miranda - MS), em vermelho indivíduos de Campo Grande – MS, em azul indivíduos de Nova Andradina – MS, ambos com cinco indivíduos, em roxo quatro indivíduos de Recife – PE.



4. Figura 4: Dendrograma de Cluster baseado em dados morfológicos cranianos da espécie *Artibeus planirostris*. Representados por PANT/MS indivíduos do Pantanal (Corumbá - MS) em verde, CG/MS indivíduos de Campo Grande – MS em vermelho, N_AND/MS indivíduos de Nova Andradina – MS em azul e RE/PE indivíduos de Recife – PE em roxo. Os números são correspondentes a aos números contidos no dendrograma da análise filogenética.



5. Figura 5: Dendograma de *Artibeus planirostris* em Máxima Verossimilhança (MV), baseado em 530pb do CytB. Os valores dos nós são referentes ao bootstrap. Amostras deste estudo representadas por *.



6. Tabela 1: Número de referência da amostra relativo às análises e código de acesso no GenBank dos indivíduos utilizados neste estudo da espécie *Artibeus planirostris*. Por último, indivíduos do grupo externo da espécie *Carolia perspicilata*.

Amostra	GenBank	Amostra	GenBank
1	Não submetido	43	EU160897
2	Não submetido	44	EU160888
3	Não submetido	45	EU160887
5	Não submetido	46	EU160880
6	Não submetido	47	EU160879
7	Não submetido	48	EU160878
8	Não submetido	49	EU160877
9	Não submetido	50	EU160871
10	Não submetido	51	EU160869
12	Não submetido	52	EU160868
13	Não submetido	53	EU160867
21	Não submetido	54	EU160866
22	Não submetido	55	AY642918
24	Não submetido	56	AY642917
26	JX444088	57	DQ869439
27	JX444087	58	DQ869436
28	JX444086	59	DQ869433
29	GQ861699	60	DQ869432
30	GQ861612	61	DQ869431
31	GQ861611	62	DQ869428
32	GQ861610	63	DQ869423
33	EU160943	64	DQ869418
34	EU160942	65	DQ869417
35	EU160937	66	DQ869414
36	EU160936	67	DQ869413
37	EU160922	68	DQ869398
38	EU160921	69	DQ869397
39	EU160919	70	DQ869396
40	EU160918	71	DQ869395
41	EU160899	Carolia 1	Não submetido
42	EU160898	Carolia 2	FJ589681

7. Tabela 2: Análise de Posthoc de populações de *Artibeus planirostris*, par a par, com diferenças significativas ($P = <0,05$). Para cada população foi utilizado cinco indivíduos. Daos obtidos em 2014.

	Nova Andradina	Miranda (Pantanal)	Pernambuco
Campo Grande (MS)	0,270898	0,345516	0,0520189
Nova Andradina (MS)	-	0,679741	0,0453096*
Miranda (Pantanal-MS)		-	0,0552327

*Valor de diferença significativa.