UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE CAXIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE, AMBIENTE E SAÚDE

MARCELO CARDOSO DA SILVA VENTURA

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE DE MORCEGOS (MAMMALIA: CHIROPTERA) CATALOGADA NA APA DO INHAMUM NO CERRADO MARANHENSE

CAXIAS – MA

2016

MARCELO CARDOSO DA SILVA VENTURA

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE DE MORCEGOS (MAMMALIA: CHIROPTERA) CATALOGADA NA APA DO INHAMUM NO CERRADO MARANHENSE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde – PPGBAS/CESC/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

ORIENTADOR: Prof. Drª. Maria Claudene Barros- CESC/UEMA

Caxias – MA

2016

V468m Ventura, Marcelo Cardoso da Silva

Caracterização da diversidade de morcegos (Mammalia: Chiroptera) catalogada na APA do Inhamum no Cerrado Maranhense / Marcelo Cardoso da Silva Ventura. Caxias-MA: CESC/UEMA, 2016.

57f.

Orientador: Profª. Dra. Maria Claudene Barros.

Dissertação (Mestrado) – Centro de Estudos Superiores de Caxias, Curso Mestrado em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

1. Morcego. 2. Maranhão. 3. DNA. 4. Morfologia. 5. Ecossistema. I. Ventura, Marcelo Cardoso da Silva. II. Título.

CDU 599.4(812.1)

MARCELO CARDOSO DA SILVA VENTURA

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE DE MORCEGOS (MAMMALIA: CHIROPTERA) CATALOGADA NA APA DO INHAMUM NO CERRADO MARANHENSE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde – PPGBAS/CESC/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

Aprovado em: ___/____/____

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Drª. Maria Claudene Barros – Orientadora
Doutorado em Ciências Biológicas
Universidade Estadual do Maranhão – CESC/UEMA

_____

Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz – Membro
PhD Researcher - Molecular Genetics
EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS

_____

Profª.Drª Fernanda Atanaena G.de Andrade – Membro
Doutorado em Zoologia
Instituto Federal do Pará, Campus Tucuruí – IFPA

Meus agradecimentos e dedicatória, a todos aqueles que apoiaram e me ajudaram nessa empreitada em busca de mais conhecimento, em especial, à minha família.

“A classificação por descendência não pode ser inventada por biólogos, ela pode apenas ser descoberta.”

(Theodozius Dobzhansky)

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Maranhão por propiciar o Programa de Mestrado em Biodiversidade, Ambiente e Saúde;

À Professora e minha Orientadora Maria Claudene Barros, pela paciência, dedicação e ensinamentos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde;

A FAPEMA, pela concessão financeira do estágio na UNESP/Botucatu;

Ao IFPI que me liberou e propiciou o fomento financeiro para a conclusão do curso;

Em especial a meus filhos; Arthur, Isadora e João Marcelo e esposa, Suan pelo ânimo e motivação nesses últimos anos;

Ao Professor e Coorientador Elmary Fraga;

Ao Grande Professor Wilson Uieda, pela acolhida em sua casa e o despertar científico na identificação e trato com morcegos;

À Professora Fernanda Atanaena pela prática na identificação de morcegos;

A todos que constituem o GENBIMOL, pois sem essa turma, não teria sido possível o aprendizado das práticas laboratoriais;

Em especial à Priscila, Márcia, Daiane, Walna, Andrelina e Histelle pelas dicas, sugestões durante todo o curso;

Aos colegas Marcelo, Daniel, Renato, Aryel e Bruno pela disposição em ajudar no processamento de morcegos;

Ao Fábio Hernique pela singela amizade;

Ao Nonato Sobrinho, Bruno Campos e Rômulo Barros pela companhia e ajuda nas traduções e correções textuais;

Aos "morcegueiros" Cleison, Amanda, Flávia, Samira, Viviane e Adriana;

À minha Tia Mercedinha pelo insight da Biologia;

Aos meus pais, irmãos, sobrinhos, parentes em geral e à minha Avó por acreditarem em minha determinação para conclusão deste curso;

A meu avô Felipe, que me ensinou sobre caráter, responsabilidade e honestidade;

A todos os meus colegas da turma de mestrado;

Aos Professores efetivos e convidados que puderam dispor de seus conhecimentos para alargar minhas ideias;

A todos aqueles que de forma direta e indireta me acompanharam nessa caminhada em busca de mais conhecimento.

RESUMO

A diversidade de morcegos tem instigado muitos pesquisadores a conduzirem seus estudos para a ordem Chiroptera principalmente motivados a estudar sua história natural e identificá-los dada sua ampla ecomorfologia. Este trabalho tem como objetivo realizar o levantamento da quiropterofauna do bioma Cerrado leste maranhense a fim de identificá-la, para tanto foram realizadas quatro campanhas de coleta na Área de Proteção Ambiental do Inhamum (APA do Inhamum) durante três noites consecutivas utilizando redes de neblina. Após a coleta os morcegos foram levados ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL) do CESC/UEMA onde foram processados e identificados ao nível infragenérico por meio de abordagem morfológica. Foi extraído tecido muscular, sanguíneo e encefálico para análise genética e sorológica. Amostras de tecido encefálico foram submetidas aos testes de Imunofluorescência Direta (IFD). Dos tecidos musculares foi realizado a extração do DNA e amplificado as regiões genômica do Citocromo Oxidase Subunidade I(COI) e rRNA 16S a partir da técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), posteriormente sequenciados no analisador genético ABI 3500. Na análise de dados, foram usados vários softwares, como: BioEdit, DNAsp, MEGA e Vegan (Programa R), além das plataformas BOLD Systems e Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Analisando as características morfológicas, verificou-se a ocorrência de quatro famílias, 11 subfamílias, 24 gêneros e 33 espécies. A curva do coletor evidenciou que ainda há uma diversidade de morcegos a ser conhecida para a área em estudo. Entre as espécies de ocorrência na área, 16 apresentaram-se como os primeiros registros para o Maranhão: *Lophostoma brasiliense, Lophostoma silvicola, Micronycteris schmidtorum, Gardnerycteris crenulatum, Phylloderma stenops, Tonatia bidens, Trachops cirrhosus, Rhinophylla fischerae, Artibeus fimbriatus, Artibeus obscurus, Dermanura gnoma, Platyrrhinus fusciventris, Platyrrhinus recifinus, Molossops temminckii*; *Lasiurus blossevillii* e *Lasiurus ega.* Os resultados ainda revelaram uma extensão de distribuição de várias espécies em pelo menos 350 km no sentido norte-leste do estado. Os dados moleculares obtidos a partir dos genes rRNA 16S e COI foram incongruentes para vários status taxonômicos, onde não há diferença específica para *Dermanura gnoma* e *D.cinerea*, assim como, *Platyrrhinus fusciventris* e *P. recifinus; Micronycteris minuta* e *M. schmidtorum*. Foi ratificado ainda a identidade das espécies *P. fusciventris* e *P. recifinus* como *P. helleri*; *M. minuta* e *M. schmidtorum* como *M. cf minuta* e *Myotis nigricans* como *M. riparius*. Tais incongruências são compartilhadas pelo grande número de publicações que tratam de identificar os grupos de morcegos. O teste Imunofluorescência Direta revelou resultado negativo para todos os espécimes analisados, confirmando a não ocorrência do vírus rábico para as espécies identificadas e, consequentemente, a não circulação do vírus na área de estudo. A presença dos gêneros *Artibeus*, *Dermanura*, *Trachops*, *Lophostoma*, *Desmodus*, *Glossophaga* e *Diaemus* na APA do Inhamum evidencia uma grande variação trófica na área, revelando a importância desses animais para o equilíbrio do ecossistema local.

Palavras – chave: Morcego, Maranhão, DNA, Morfologia, Ecossistema.

ABSTRACT

The diversity of bats has instigated many researchers to conduct their studies to the order Chiropteran, motivated mainly to study their natural history and to identify them, given their broad ecomorphology. This work has the objective of conducting a survey of the chiropters fauna from the biome Cerrado from the east region of Maranhão to identify it. For this, four collection campaigns were held in the Environmental Protection Area of Inhamum (EPA of Inhamum) during three consecutive nights using fog fences. After the collection, the bats were taken to the Laboratory of Genetics and Molecular Biology (GENBIMOL) of CESC/UEMA where they were processed and identified up to the infra-genetic level using morphologic approach. Muscular, blood and encephalic tissues were extracted for genetic and serologic analysis. Samples of encephalic tissue underwent direct Immunofluorescence testing (IFA). From muscular tissues, it was done the extraction of the DNA and amplification of the genomic regions of the subunit I of Cytochrome Oxidase (COI), and the rRNA16S, through Polymerase Chain Reaction (PCR), and later, the sequencing with the automated genetic analyzer ABI 3500. For the analysis of data, many software were used, such as BioEdit, DNAsp, MEGA and Vegan (R Program), in addition to the BOLD Systems and the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) platforms. By analyzing the morphologic characteristics, it was noticed the occurrence of four families, eleven subfamilies, twenty-four genera and thirty-three species. The curve of the collector evidenced that there is still a bat diversity to be known in the area of study. Among the species that occur in the area, sixteen happened to be the first registry for Maranhão: *Lophostoma brasiliense, Lophostoma silvicola, Micronycteris schmidtorum, Gardnerycteris crenulatum, Phylloderma stenops, Tonatia bidens, Trachops cirrhosus, Rhinophylla fischerae, Artibeus fimbriatus, Artibeus obscurus, Dermanura gnoma, Platyrrhinus fusciventris, Platyrrhinus recifinus, Molossops temminckii*; *Lasiurus blossevillii*, and *Lasiurus ega*. The results also revealed a distribution extension of various species of at least 350km northeastward of the state. The molecular data obtained from rRNA 16S and COI genes were incongruous with many taxonomic statuses, where *Dermanura gnoma* and *D. cinerea* behold to the same species, as well as *Platyrrhinus fusciventris* and *P. recifinus*. Such incongruences are shared by a large number of publications that deal with identification of bat groups. The direct Immunofluorescence testing revealed negative result for all the specimens studied, confirming the non-occurrence of rabies virus in the species, and, consequently, the non-circulation of the virus in the studied area. The presence of the genera *Artibeus, Dermanura, Trachops, Lophostoma, Desmodus, Glossophaga*, and *Diaemus* in the EPA of Inhamum brings evidence of a significant trophic variation in the area, revealing the importance of these animals to the local ecosystem equilibrium.

Keywords: Bat, Maranhão, DNA, Morphology, Ecosystem.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do Maranhão evidenciando a Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum 18
Figura 2. Curva de acumulação para as espécies de morcegos da APA do Inhamum 24
Figura 3. Árvore filogenética de Neighbor-Joining para os morcegos coletados na APA do Inhamum a partir do gene rRNA 16S 28
APÊNDICE C - Fotografias de campo e prática laboratorial com morcegos 50
APÊNDICE D - Fotografias de morcegos coletados da APA do Inhamum. 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de PCR para isolamento dos genes rRNA 16S e COI 21
Tabela 2. Morcegos coletados na APA do Inhamum 23
Tabela 3. Índice de diversidade molecular de morcegos baseado no gene rRNA 16S 25
Tabela 4. Divergência genética interespecífica para morcegos de três famílias 26
Tabela 5. Divergência genética entre as famílias de morcegos de ocorrência na APA do Inhamum 26
Tabela 6. Divergência genética interespecífica para morcegos de três famílias 29
Tabela 7. Pencentual de similaridade das sequências dos espécimes da APA do Inhamumplotadas na plataforma BOLD Systems 30
APÊNDICE A - Matriz de divergência genética gerada para os morcegos coletados na APA do Inhamum baseada no gene rRNA 16S 48
APÊNDICE B - Matriz de divergência genética gerada para os morcegos coletados na APA do Inhamum baseada no gene COI. 49

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO 13
1.1 Caracterização geral dos morcegos 13
1.2 Os morcegos na região Neotropical 13
1.3 Os morcegos e sua importância ecológica 14
1.4 Problemática taxonômica 15
1.5 Circulação do vírus rábico 16
2 OBJETIVOS 17
2.1 Geral 17
2.2 Específicos. 17
3 MATERIAL E MÉTODOS 18
3.1 Área de estudo 18
3.2 Coleta do Material 19
3.3 Preparação e identificação de material biológico 20
3.4 Técnicas Moleculares 21
3.5 Testes de Imunofluorescência Direta 22
3.6 Análises dos dados 22
4 RESULTADOS 23
4.1 Identificação das espécies a partir de caracteres morfológicos 23
4.2 Diversidade de Espécies 24
4.3 Gene rRNA 16S 24
4.4 Gene COI 29
5 DISCUSSÃO 31
5.1 A abordagem morfológica 31
5.2 Abordagem molecular a partir do gene rRNA 16S 32
5.3 Abordagem molecular a partir do gene COI 33
5.4 Abordagem taxonômica 34
5.5 Vírus rábico 35
6 CONCLUSÃO 36
7 REFERÊNCIAS 37
APÊNDICES 47
ANEXOS 52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização geral dos morcegos

Os morcegos são mamíferos altamente especializados, possuem estruturas que lhes possibilitam realizar o voo verdadeiro, característica que os diferencia dos outros mamíferos. Pertencem à ordem Chiroptera, que provém do Grego *kheir* (mão) e *ptero* (asa), indicando que as asas dos morcegos são mãos altamente modificadas (REIS et al. 2013). Eles representam a segunda maior ordem de mamíferos em diversidade de espécies, desempenham atividade direta na sinergia dos ecossistemas, economicamente atuam de forma diversificada e, por alguns serem hematófagos, têm destaque nas relações médico-sanitárias (BEZERRA, 2003).

Os morcegos são polinizadores e dispersores de sementes, são predadores e presas (BELWOOD e MORRIS, 1987; FENTON, 1995; KALKA et al. 2008), controlam populações de insetos, incluindo algumas pragas agrícolas (CLEVELAND et al. 2006, AGUIAR e ANTONINI, 2008; REISKIND e WUND, 2009; BOYLES et al. 2011) e também agem como vetores de doenças como a raiva, com significativo impacto sobre humanos, rebanhos animais e outras espécies de morcegos (SCHNEIDER et al. 2009; AGUIAR e BRITO, 2010). De acordo com Bredt et al. (2012), pelo menos 542 espécies de plantas pertencentes a mais de 50 famílias têm suas sementes dispersadas por morcegos frugívoros, o que contribui para o processo de recomposição da vegetação em áreas degradadas. Estes polinizam mais de 500 espécies de plantas, atuam no controle de insetos-praga da lavoura e são bioindicadores da saúde ecossistêmica.

1.2 Os morcegos na região Neotropical

De acordo com Bernard et al. (2011), foram identificados 5502 registros formais de morcegos no Brasil. Embora pareça ser um número significativo, estudos mostram que menos de 10% do país têm sido pesquisados e que, para quase 60% do território nacional, não há registro único de espécies. No entanto, a fauna de morcegos é considerada rica para a região Neotropical, apesar de a maioria dos estudos realizados sobre comunidades de morcegos está concentrada na região dos biomas florestais com registros formais, variando de 24% no bioma Amazônia a 80% no bioma Mata Atlântica (BERNARD et al. 2011).

Desde o fim do século XIX, listas de mamíferos têm sido publicadas para incluir espécies de morcegos. Em 1893, foi publicado *The first list of brazilian mammals* com 40 espécies. Nogueira et al. (2014) listaram, para o Brasil, 178 espécies, compreendidas em 68 gêneros, 13 subfamílias e nove famílias. Feijó et al. (2015) descreveram uma nova espécie,

Histiotus diaphanopterus (FEIJÓ, ROCHA & ALTHOFF, 2015), o morcego pertencente à família Vespertilionidae, totalizando assim 179 espécies para o Brasil. Segundo Voss e Emmons (1996), o Brasil apresenta a maior área geográfica nos trópicos, mas o número de espécies de morcegos é apenas levemente maior que os registrados em outros países da América do Sul, como Equador (n=164; ALBUJA, 2011), Peru (n=165; PACHECO et al. 2009), Venezuela (n=165; SÁNCHEZ e LEW, 2012); e, menor do que o número de espécies de morcegos documentados, para a Colômbia (n=187; SOLARI et al. 2013). Estes dados sugerem que, no Brasil, ainda há uma diversidade de morcegos escondida e que precisa ser descoberta (NOGUEIRA et al. 2014). No entanto, é verificado que a sistemática de quirópteros vem acompanhando um panorama dinâmico, em que muito do conhecimento sobre as relações de parentesco (filogenia) e sobre a taxonomia está sendo discutido (GREGORIN e TAVARES, 2008).

Para os autores, Reis et al. (2007), Pacheco et al. (2008), Tavares et al. (2008) e Bredt et al. (2012), o conhecimento sobre a diversidade de espécies de morcegos no Brasil vem aumentando significativamente nos últimos 15 anos, sendo ainda bastante incipiente. Nesse sentido, o advento das técnicas moleculares e as coleções zoológicas constituem importantes ferramentas para os estudos sobre morcego, visto que armazenam material testemunho e bancos de DNA. Os morcegos que habitam as formações florestais ainda precisam ser estudados mais detalhadamente. O primeiro passo consiste em inventariar as espécies e conhecer sua biologia. Dessa forma, percebe-se a necessidade de registros da diversidade de morcegos para todas as regiões brasileiras, não somente pelo conhecimento, mas também pela importância deles em relação ao meio ambiente. A maior concentração sobre levantamento de morcegos no Brasil está na região Amazônica, destacando-se os trabalhos propostos por Cruz et al. (2007) que abordaram o estudo da comunidade de morcegos em São Luís-MA, em áreas remanescentes de Mata Amazônica. A diversidade e o comportamento de morcegos no Maranhão têm sido abordados por autores como Almeida et al. (2007); Dias et al. (2009).

1.3 Os morcegos e sua importância ecológica

Os morcegos constituem um dos grupos de mamíferos mais diversificados quanto aos hábitos alimentares. Excetuando-se a saprofagia, todos os níveis tróficos podem ser observados em sua guilda. Sendo que essa variação trófica pode ser explicada pela diversidade entre as espécies (REIS et al. 2007). Os frugívoros são considerados os dispersores mais importantes entre os mamíferos de acordo com Huber (1910) e Pijl (1957). Os filostomídeos são considerados os melhores dispersores de sementes nas Américas, o que

os coloca entre os principais responsáveis pela regeneração das florestas Neotropicais (BREDT et al. 1996). Esse potencial de dispersão está associado a seu hábito de forrageio, a sua mobilidade e a grandes distâncias que percorrem em busca de alimentos (GALINDO-GONZALES, 1998). Morcegos glossofagineos desempenham atividade vital nos ecossistemas, atuando na polinização de centenas de espécies de plantas, algumas das quais totalmente dependentes deles para sua reprodução (SAZIMA et al. 1999; TSCHAPKA et al. 1999; MUCHHALA, 2006). Os morcegos também atuam como controladores de populações de insetos. Estima-se que algumas espécies possam comer quantidades correspondentes a uma vez e meia de seu peso em uma única noite (GOODWIN e GREENHALL, 1961). Muitos insetos capturados pelos morcegos são prejudiciais à lavoura ou podem transmitir doenças como a dengue. Também capturam coleópteros e isópteros que atacam a estrutura de casas de madeira (YALDEN e MORRIS, 1975).

1.4 Problemática taxonômica

Embora muitos trabalhos atualmente estejam sendo realizados sobre a taxonomia de morcegos, a controvérsia taxonômica na ordem Chiroptera ocorre há mais de 30 anos (MARCHESIN, 2006). As primeiras classificações relacionavam a Subordem Megachiroptera com os primatas, pois levava em consideração caracteres visuais (PETTIGREW, 1986). Essa condição dava ao grupo caráter polifilético. Outros autores (SIMMONS, 1994; VAN DEN BUSSCHE et al.1998) propuseram o monofiletismo, relacionando caracteres morfológicos. Esta proposta foi apoiada por Murphy et al. (2001), analisando caracteres genéticos. De acordo com Jones e Teeling (2006), a ordem está dividida em duas subordens: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera. Esta inclui as 17 famílias ocorrentes nas Américas. Mesmo havendo consenso dessas famílias, compondo a subordem Yangochiroptera (sinônimo de Microchiroptera), a filogenia do grupo é discutível para o gênero *Artibeus* na família Phyllostomidae, *Myotis* na família Vespertilionidae e *Molossus* na família Molossidae (SIMMONS e GEILSER, 1998; JONES et al. 2002; MARCHESIN, 2006). Para a família Phyllostomidae, muitos estudos sobre sistemática filogenética têm sido realizados e, geralmente, apontam incongruência com a taxonomia morfológica, causando incertezas taxonômicas (CIRRANELO et al. 2016). De acordo com Marchesin (2006), a família Molossidae mostra relações filogenéticas confusas em níveis supragenéricos. Na família Vespertilionidae, a classificação morfológica baseou-se inicialmente em caracteres dentários, nas quais foi reconhecida apenas a subfamília Vespertilioninae. Simmons (1998) propôs, a partir de um conjunto de dados, a classificação filogenética atual, agrupando cinco

subfamílias: Vespertilioninae, Myotinae, Miniopterinae, Murininae e Kerivoulinae. Hood e Baker (1986) propuseram a classificação da família Emballonuridae por meio de comparação cromossômica, porém não observaram homologias entre os cromossomos dessas espécies. De acordo Griffthset al. (1992), Simmons e Geisler (1998), a família Emballonuridae forma grupo irmão com todas as famílias pertencentes à subordem Microchiroptera. No entanto, Jones et al. (2002) revelaram que essa família surge como grupo basal dessa subordem.

1.5 Circulação do vírus rábico

Os morcegos hematófagos destacam-se na importância médico-sanitária, sendo considerados os principais transmissores da raiva entre os mamíferos, incluindo humanos, podendo ocasionar grandes prejuízos econômicos à pecuária (BRASIL, 2009). No entanto, espécies não hematófagas das famílias Phyllostomidae, Vespertilionidae e Molossidae têm sido frequentemente registradas como portadoras do vírus rábico. Entre 2001 e 2007, foram registrados no Brasil 863 casos de raiva em morcegos, dos quais 424 pertenciam às espécies não hematófagas (49,1%), 250 às hematófagas (29%) e 189 às não determinadas (21,9%) (PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2008). De acordo com Sodré et al. (2010), em relação aos morcegos hematófagos, o número pode estar subestimado devido à pouca quantidade de *Desmodus rotundus* enviada para o diagnóstico de raiva.

No Maranhão, 31 casos de raiva humana foram registrados em 2005, sendo 29 transmitidos por morcegos hematófagos. No Pará, ocorreram mais de 20 casos de óbitos humanos por raiva transmitida por morcegos nos anos de 2004 e 2005. Após esses grandes surtos de raiva humana por morcegos hematófagos nos dois Estados, não houve mais registros de casos, porém Costa et al. (2013) apresentaram dados coletados em 2009 no nordeste paraense e encontraram soropositividade para a raiva em morcegos analisados, indicando que a circulação do vírus rábico em morcegos foi presente em algum momento para aqueles animais porém, para o Estado do Maranhão, não há dados disponibilizados.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar a diversidade de morcegos de ocorrência no fragmento do Cerrado leste maranhense a partir de abordagens morfológicas e moleculares e inferir quanto ausência ou presença do vírus rábico.

2.2 Específicos.

- ✓ Identificar as espécies de morcegos de ocorrência na Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum a partir de caracteres morfológicos;
- ✓ Caracterizar e identificar através dos genes mitocondriais rRNA 16S e COI as espécies de morcegos de ocorrência na Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum;
- ✓ Inferir quanto às incertezas taxonômicas do grupo de morcego;
- ✓ Informar quanto presença ou ausência de morcegos infectados com o vírus da raiva na Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

A Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum (APA do Inhamum) está localizada no município de Caxias/MA, sob as coordenadas 04º53’30”S e 43º24’53”W (Figura 1). Sua fitofisionomia abrange campo sujo e cerradão, composta por 5224,02 Km^2, dos quais 229,19 Km^2 já foram desmatados. É composta por uma vegetação graminosa, arbóreo-arbustiva, e árvores de grande porte como buritizais associados a cursos d’água. A região sofre com desgastes sistemáticos de atividades proibidas como a caça de animais silvestres, desmatamento, despejo de poluentes, construção de casas, mesmo sendo protegida por Lei Municipal nº 1464/2001. É cortada transversalmente pela MA 127 estrada que liga a cidade de Caxias a São João do Sóter (BARROS, 2012).

Figura 1. Mapas evidenciando a área de estudo.

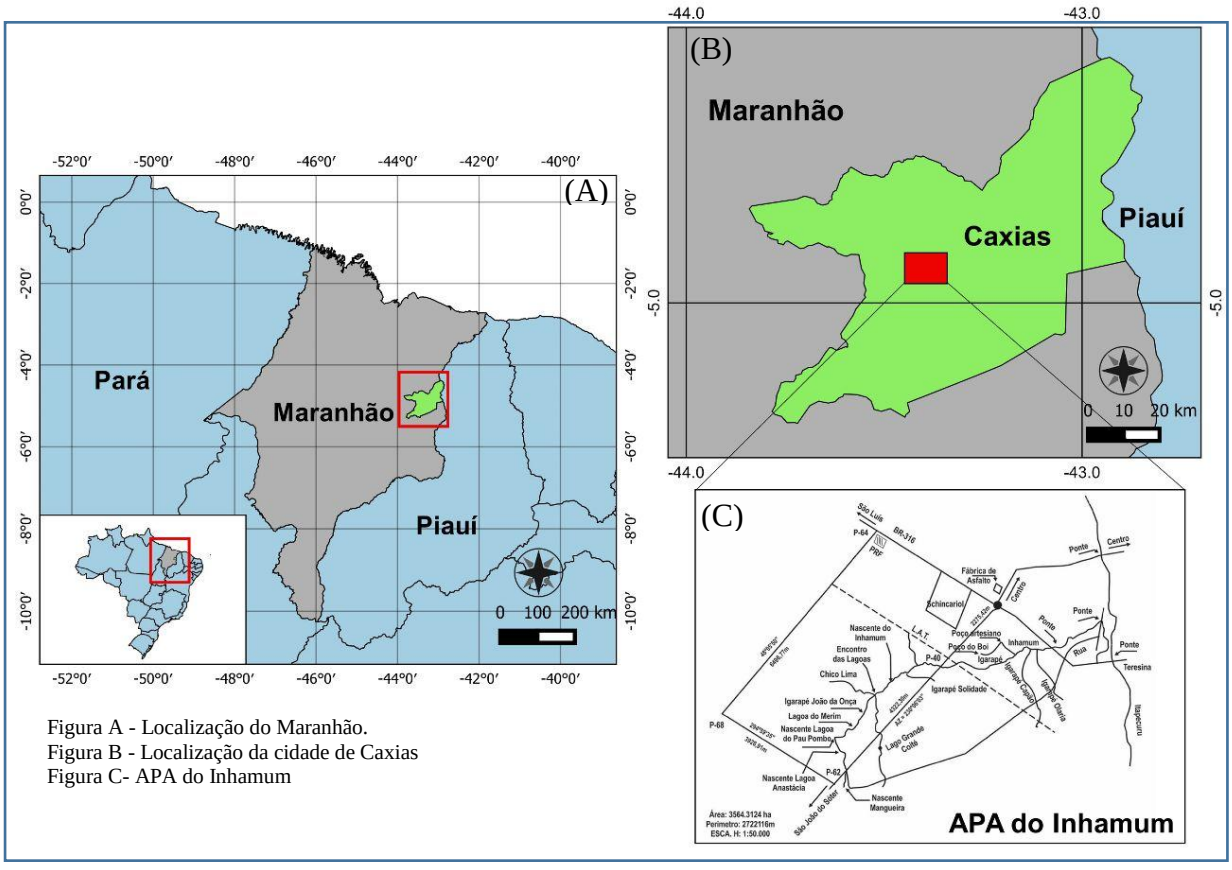


Figura A - Localização do Maranhão.
Figura B - Localização da cidade de Caxias
Figura C- APA do Inhamum

Fonte: (VENTURA, M.C.S., 2016)

3.2 Coleta do Material

Quatro campanhas foram realizadas nos meses de abril/maio/2014, setembro/2014, janeiro/2015 e junho/2015 em pontos estratégicos na área de estudo. Cada campanha com duração de três noites consecutivas totalizando um esforço amostral de 20.736 horas/rede. As coletas realizadas caracterizam o tipo passiva, nas quais foram armadas dez redes-de-neblina (*mist nets*), sendo duas com medidas de 6 x 3 m, quatro 9 x 3 m e quatro com medidas 12 x 3 m de comprimento, todas com malha de 25 mm. As redes eram armadas ao entardecer e fechadas após a exposição de seis horas. A relação entre o esforço amostral e o número de espécies registradas foi realizada a partir da multiplicação simples da área de cada rede pelo tempo de exposição, multiplicado também pelo número de repetições e, por fim, pelo número de redes, de acordo com a proposta apresentada por Straube e Bianconi (2002). As exposições das redes ocorreram em possíveis rotas de voo, área composta de vegetação frutífera, próximas a residências nas quais continham animais domésticos e cursos d´água. As redes foram posicionadas com auxílio de aparelho de GPS (Sistema de Posicionamento Global por Satélite) e permaneceram suspensas a três metros do solo, sendo vistoriadas em intervalos de no máximo 30 minutos. Os animais coletados nas redes foram retirados vivos, acondicionados em sacos de panos numerados e levados ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA (GENBIMOL).

Os períodos de coleta foram selecionados com base no calendário lunar, preferencialmente nas fases de lua Minguante e Nova. As fases de lua Crescente e Cheia foram evitadas uma vez que é amplamente conhecido que as atividades de determinadas espécies, principalmente de *Desmodus rotundus*, são fortemente influenciadas pela presença do luar (FLORES-CRESPO et al. 1972; GREENHALL, 1988; UIEDA, 1992; UIEDA, 1996; UIEDA,2008). Com intuito de manter uma padronização para o esforço de captura em cada coleta as redes não foram fechadas em momentos de chuvas e/ou ventanias.

Equipamentos de proteção individual (EPI’s) foram usados pelos membros participantes das coletas e os mesmos foram submetidos ao Teste de Titulação de Anticorpos Neutralizantes para Raiva – Soro neutralização em Cultivo Celular pelo Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo (CCZ-SP). Este trabalho é resultado de um projeto fomentado pela FAPEMA e licenciado pelo ICMBIO/SISBIO nº 42670-1.

3.3 Preparação e identificação de material biológico

A técnica de campo utilizada para a obtenção dos dados morfológicos com fins de identificação, preparação e fixação dos espécimes por via úmida seguiu a metodologia descrita por Pacheco (2004) e pelo Guia de manejo e controle de morcegos (CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO RIO GRANDE DO SUL, 2012). No GENBIMOL os morcegos foram fotografados, identificados, pesados, sexados, medidos com auxílio de paquímetros digital e manual (300mm – 12”), posteriormente procedeu-se com a retiradade tecidos muscular e encefálico que foram conservados em álcool 70% em ambiente refrigerado. O estágio reprodutivo foi determinado de acordo com os caracteres morfológicos, e estes, classificados em jovens ou adultos. As fêmeas foram caracterizadas como lactantes ou não pela apalpação do abdome e visualização das mamas, enquanto nos machos os testículos foram caracterizados quanto à posição, abdominal ou externalizados (escrotados). Alguns espécimes foram anestesiados e sacrificados, para servir como material testemunho e fixados em posição adequada, o que possibilita quando necessário, a aferição de medidas para estudos posteriores.

Os espécimes foram submetidos a aplicação de formol com concentração a 10% por sete dias, consequentemente foram lavados com água corrente e conservados em álcool 70% GL em recipientes apropriados. Foram realizadas aferições morfométricas tais como: comprimento do antebraço direito (AD) e antebraço esquerdo (AE), orelha (O), trago (T), pé (P), cauda (C).

O ordenamento taxonômico adotado foi o proposto por KOOPMAN (1993) e a identificação foi realiza por meio das chaves de classificação de Gregorin e Taddei (2002); Uieda et al. (2006); Reis et al. (2007); Gardner (2007), Reis et al. (2011); Miranda et al. (2011).

A identificação dos espécimes foi submetida à análise para posterior confirmação por especialistas: Dr. Wilson Uieda, professor da Universidade Estadual Paulista (UNESP/Botucatu) e Dr.ª Fernanda Atanaena Gonçalves de Andrade, professora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA/Tucuruí).

3.4 Técnicas Moleculares

A extração de DNA foi realizadacom o protocolo de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico (SAMBROOK eRUSSEL, 2001) e o kit da WIZARD® GENOMIC DNA PURIFICATION KIT (Promega) seguindo instruções do fabricante. Para amplificação dos genes rRNA 16S e COI foi empregada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir do DNA total obtendo-se volume final de 25µl. A tabela 1 mostra os genes, primers e condição de PCR empregadas para o isolamento dos fragmentos gênicos rRNA 16S e COI.

Tabela 1. Condições de PCR para isolamento dos genes rRNA 16S e COI

GENE	**PRIMERS**	AUTORES	**Condições de PCR**
rRNA 16S	16S-L1987 5' GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC 3' 16S-H2609 5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'	Palumbi et al. (1991)	94°C por 5'(Desnaturação inicial) 30 ciclos: 94°C por 30" (Desnaturação) 50°C por 1' (*Anealling*) 72°C por 2' (Extensão) 72°C por 7' (Extensão final)
COI	LCO-1490 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3' HCO-21985'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'	Folmer et al. (1994)	94°C por 3'(Desnaturação inicial) 40 ciclos 94°C por 45" (Desnaturação) 48°C por 45"(*Anealling*) 72°C por 1,5' (Extensão) 72°C por 3' (Extensão final)
	CO1-5285F 5'- CCYCTGTNYTTAGATTTACAGTCTA-3' CO1-6929R 5'- ACAARGTTATGTAATDDTTTTACTA-3'	Spradling et al. (2004)	94°C por 5' (Desnaturação Inicial) 35 ciclos 94°C por 45" (Desnaturação) 50°C por 1' (*Anealling*) 72°C por 1' (Extensão) 72°C por 5' (Extensão final)

Os produtos da PCR foram purificados com o kit "ExoSap-IT" (USB Corporation) conforme recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento de DNA usando-se o método didesoxiterminal (SANGER et al. 1977), após a reação os produtos foram precipitados e submetidos ao sequenciador automático de

DNA (ABI 3500/Life Technologies) onde ocorreu a eletroforese. A descrição dos protocolos de extração de DNA, amplificação e de sequenciamento está relatada no anexo A. Foi obtida uma sequência do GenBank (HOME/NCBI) para compor o grupo externo nas árvores filogenéticas a partir do fragmento gênico rRNA 16S (*Bradypustridactylus*AF 069535).Todas as sequências foram submetidas ao programa de comparação de fragmentos gênicos e identificação de espécies, Basic Local AlignmentSearch Tool (BLAST) - http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi para comparar as sequências coletadas com as de referência. Para o gene COI as sequências foram plotadas na plataforma BOLD Systems v3 (*TheBarcode of Life Data Systems*) para identificação das espécies.

3.5 Testes de Imunofluorescência Direta

No Laboratório de virologia da Universidade Estadual do Maranhão/UEMA foi realizado o diagnóstico laboratorial da raiva utilizando a técnica de imunofluorescência direta (IFD), teste recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), Ministério da Saúde do Brasil e Instituto Pasteur de São Paulo. O protocolo com as etapas para os testes consta no Anexo B.

3.6 Análises dos dados

Para verificar a amostragem de morcegos coletados construiu-se a curva de acumulação de espécies gerada no programa R usando o pacote Vegan (OSKANEM et al. 2010). Na análise genética foram usados vários softwares, entre eles: BIOEDIT, versão 7.0.5.2 (HALL, 1999) para editar e alinhar as sequências. DNAsp versão 5 (LIBRADO e ROZAS, 2009) para estimar os haplótipos, diversidades haplotípica e nucleotídica. O MEGA 6.0 (TAMURA et al. 2013) foi usado para obtenção de sítios conservados, variáveis e informativos para parcimônia, modelo evolutivo, matriz de divergência e árvores filogenéticas. Para a construção das árvores foram utilizados os métodos de “agrupamentos de vizinhos” Neighbor-Joining (NJ), Máxima Verossimilhança (MV) e Máxima Parcimônia (MP). A significância dos agrupamentos foi estimada pela análise de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985).

4 RESULTADOS

4.1 Identificação das espécies a partir de caracteres morfológicos

Os morcegos que foram coletados e triados ao nível de família no campo, no laboratório foram identificados com o uso de bibliografias especializadas (GREGORIN e TADDEI, 2002; UIEDA et al. 2006; REIS et al. 2011). Foi verificada a ocorrência de quatro famílias, 11 subfamílias, 24 gêneros e 33 espécies, sendo a família Phyllostomidae a mais representativa com 25 espécies, seguida de Molossidae com quatro espécies, Vespertilionidae com três espécies e a família Emballonuridae com apenas uma espécie (Tabela 2).

Tabela 1. Morcegos coletados na APA do Inhamum.

FAMÍLIAS	SUBFAMÍLIAS	GÊNEROS	ESPÉCIES
Phyllostomidae	**Stenodermatinae**	*Artibeus*	*Artibeus fimbriatus* (GRAY, 1838)*
			Artibeus lituratus (OLFERS, 1818)
			Artibeus obscurus (SCHINZ, 1821)*
			Artibeus planirostris(APIX, 1923)
		Dermanura	*Dermanura cinérea* (GERVAIS, 1823)
			Dermanura gnoma (HANDLEY, 1847)*
		Platyrrhinus	*Platyrrhinus fusciventris* (HANDLEY, 1847)*
			*Platyrrhinus recifinus (*VELAZCO, GARDNER & PATTERSON, 2010)*
		Sturnira	*Sturnira lilium* (É. GEOFFROY, 1810)
	Carollinae	*Carollia*	*Carollia perspicillata* (LINNAEUS, 1758)
	Desmodontinae	*Desmodus*	*Desmodus rotundus* (É. GEOFFROY, 1810)
		Diaemus	*Diaemus youngii* (JENTINK, 1893)
	Glossophaginae	*Glossophaga*	*Glossophaga soricina* (PALLAS, 1766)
	Micronycterinae	*Micronycteris*	*Micronycteris minuta* (GERVAIS, 1856)
			Micronycteris schmidtorum (SANBORN, 1935)*
	Rhinophyllinae	*Rhinophylla*	*Rhinophylla pumilio* (PETERS, 1856)
			Rhinophylla fischerae (CARTER, 1966)*
	Phyllostominae	*Gardnerycteris*	*Gardnerycteris crenulatum* (É. GEOFFROY, 1803)*
		Phylloderma	*Phylloderma stenops (*É. GEOFFROY, 1810)*
		Phyllostomus	*Phyllostomus discolor* (WAGNER, 1843)
			Phyllostomus hastatus (PALLAS, 1767)
		Lophostoma	*Lophostoma silvícola* (d'ORBIGNY, 1843)*
			Lophostoma brasiliense (PETERS, 1866)*
		Trachops	*Trachops cirrhosus* (SPIX, 1823)*
		Tonatia	*Tonatia bidens* (SPIX, 1843)*
Molossidae	**Molossinae**	*Cynomops*	*Cynomops abrasus* (WAGNER, 1843)
		Molossus	*Molossus rufus* (É. GEOFFROY, 1803)
		Molossops	*Molossops temminckii* (BURMEISTER, 1854)*
		Nyctinomops	*Nyctinomops laticaudatus* (É. GEOFFROY, 1803)
Vespertilionidae	**Myotinae**	*Myotis*	*Myotis nigricans* (SCHINZ, 1821)
	Vespertilioninae	*Lasiurus*	*Lasiurus blossevillii* (LESSON, 1826)*
		Lasiurus	*Lasiurus ega* (É. GERVAIS, 1856)*
Emballonuridae	**Emballonurinae**	*Rhynchonycteris*	*Rhychonycteris naso (*WIED-NEUWIED, 1820)

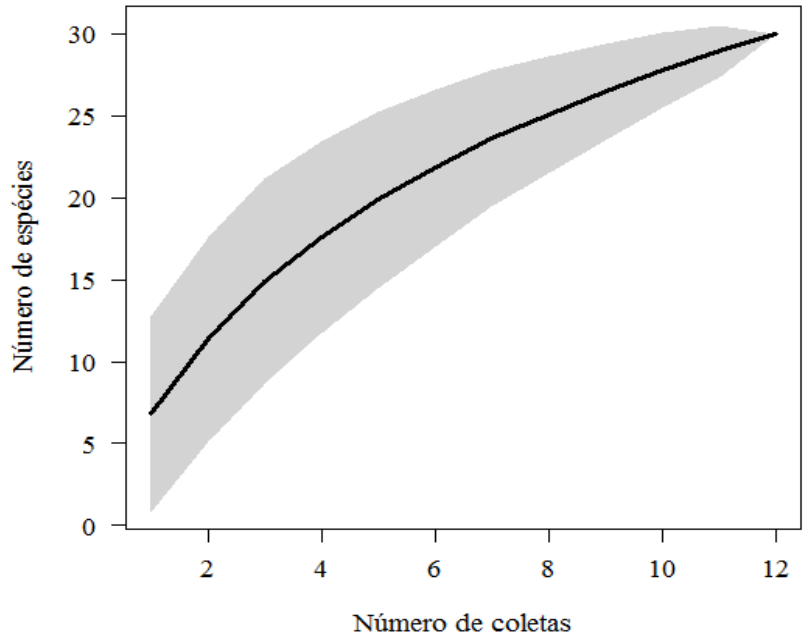
* Registros novos para o Maranhão.

Nenhuma das espécies coletadas se encontra em perigo de extinção.

4.2 Diversidade de Espécies

Foi usado o cálculo do esforço amostral para gerar a curva de acumulação que representa uma forma de estimar a riqueza de espécies da fauna da área de estudo onde o esforço foi de 20.736 horas/rede. A curva evidenciou que ainda há uma diversidade de morcegos a ser conhecida para a área em estudo (Figura 2).

Figura 2. Curva de acumulação para as espécies de morcegos da APA do Inhamum



4.3 Gene rRNA 16S

Obteve-se 156 sequências com fragmento de 579 pb do gene mitocondrial rRNA 16S para 33 espécies de morcegos coletados na APA do Inhamum. Entre os filostomídeos foi verificado para *D. rotundus* 86 sítios polimórficos, seis haplótipos (H=6), diversidade nucleotídica de 0,024 e haplotípica de 0,771. A espécie *S. lilium* apresentou sete haplótipos (H=7) diversidade nucleotídica de 0,008 e haplotípica de 0,964. Na família Molossidae, a espécie *M. rufus* foi a mais representativa (n=10), no entanto apresentou cinco haplótipos (H=5), diversidade nucleotídica de 0,008 e haplotípica de 0,800. Na família Vespertilionidae, *M. nigricans* apresentou dois haplótipos (H=2), diversidade nucleotídica de 0,018 e haplotípica de 0,400. Os índices de diversidade molecular para as espécies de morcegos com mais de um espécime coletado estão representados na tabela 3.

Tabela 2. Espécies e Índice de diversidade molecular de morcegos baseado no gene rRNA 16S.

Espécies	n	H	S	Índice de diversidade molecular	
				Haplotípica (Hd)	Nucleotídica (π)
Artibeus fimbriatus	2	2	2	1,0	0,003
Artibeus lituratus	7	3	3	0,733	0,002
Artibeus obscurus	4	2	7	0,500	0,006
Artibeus planirostris	2	2	10	1,0	0,018
Carollia perspicillata	29	6	11	0,720	0,003
Dermanura cinerea	9	5	4	0,785	0,001
Desmodus rotundus	26	6	86	0,771	0,024
Glossophaga soricina	4	2	4	0,666	0,004
Lophostoma brasiliense	3	2	1	0,667	0,001
Lophostoma silvicola	5	1	0	0,0	0,0
Micronycteris minuta	2	1	0	0,0	0,0
Phyllostomus discolor	7	4	24	0,809	0,020
Phyllostomus hastatus	2	1	0	1,0	0,001
Rhinophylla fischerae	4	3	4	0,833	0,003
Rhinophylla pumilio	5	3	5	0,700	0,003
Sturnira lilium	8	7	14	0,964	0,008
Cynomops abrasus	2	1	0	0,0	0,0
Molossus rufus	10	5	7	0,800	0,005
Nyctinomops laticaudatus	2	1	0	0,0	0,0
Lasiurus ega	5	2	6	0,400	0,004
Lasiurus blossevillii	3	3	8	1,0	0,009
Myotis nigricans	5	2	25	0,400	0,018

(n= número amostral, **H**= número de haplótipos, **S**= sítios polimórficos)

A matriz de divergência genética foi gerada com o uso do algoritmo de Tamura-Nei, que foi estimado como o melhor método de substituição nucleotídica, por apresentar o menor Critério para Informação Bayseniana (BIC). Para a família Molossidae a divergência interespecífica variou de 5,4, a 7,7% entre *M. rufus* e *M. temminckii; M. temminckii* e *C. abrasus* respectivamente, a menor divergência intraespecífica foi entre *M. rufus* de 0,4%. Para a família Phyllostomidae foi encontrada uma divergência interespecífica alta 13,4% entre as

espécies *D. rotundus* e *R. pumilio*, a divergência intraespecífica variou de 0,0% para *L. brasiliense* a 1,9% para os congêneres de *Phyllostomus*. Para a família Vespertilionidae verificou-se uma divergência interespecífica variando de 9,6% entre *L. blossevillii* e *L. ega* a 11,9% entre *L. ega* e *M. nigricans*. A divergência intraespecífica variou de 0,7% em *L. ega* a 4,2% em *M. nigricans* (Tabela 4 e Apêndice A).

Tabela 4. Divergência genética interespecífica para morcegos de três famílias a partir do gene rRNA 16S

Famílias	**DIVERGÊNCIA INTERESPECÍFICA**			
	Menor (%)		**Maior (%)**	
Molossidae	*M. rufus* x *M. temminckii*	5,4	*M. temminckii x C. abrasus*	7,7
Phyllostomidae	*D. cinerea* x *D. gnoma* *R. pumilio* x *R. fischerae*	0,2	*D. rotundus* x *R. pumilio*	13,4
Vespertilionidae	*L. blossevillii* x *L. ega*	9,6	*L. ega* x *M. nigricans*	11,9

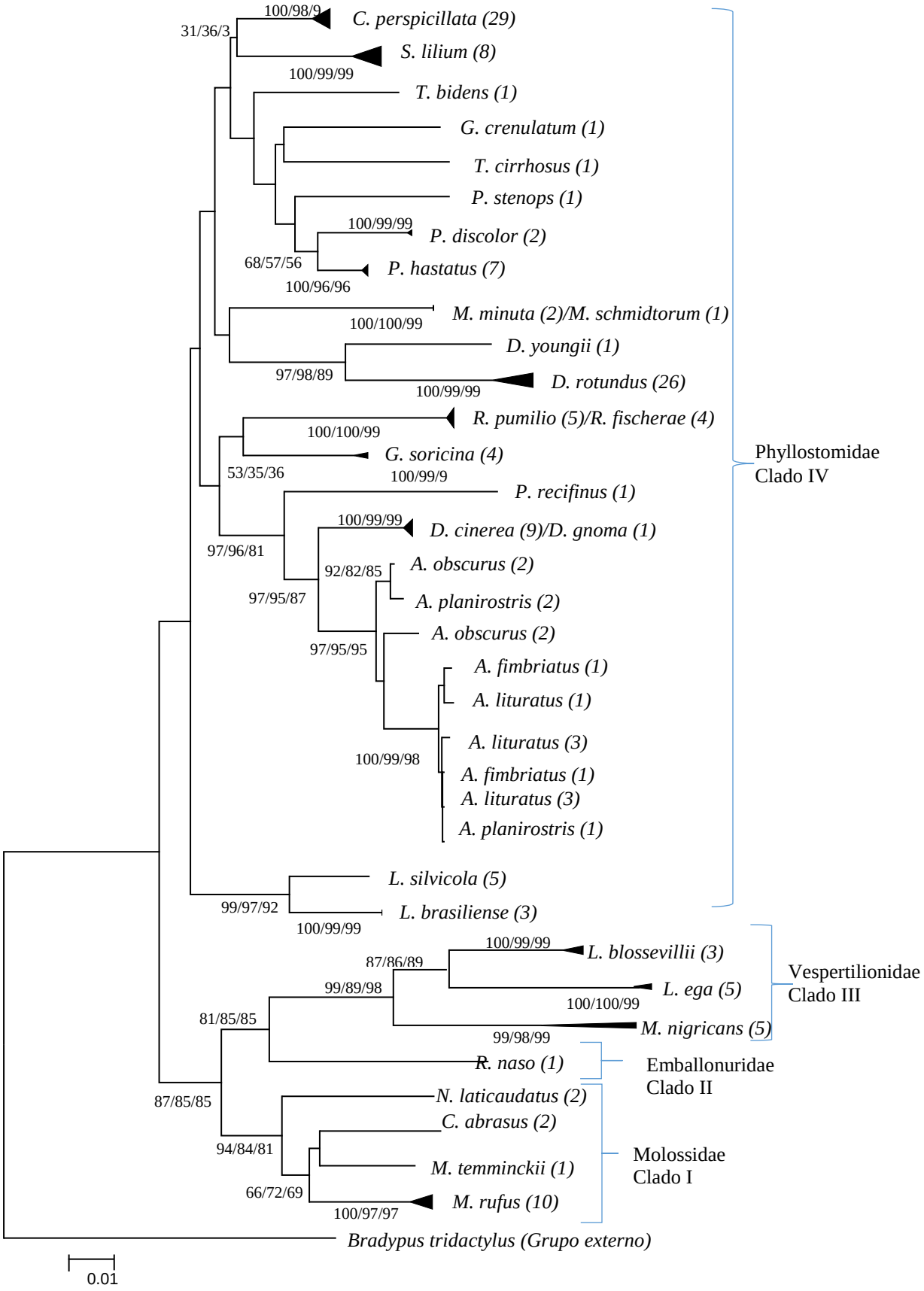
Considerando o nível de família a divergência genética variou de 10,9 a 16,3% entre Phyllostomidae e Emballonuridae. De 13,9 a 20,5% entre Phyllostomidae e Vespertilionidae. De 8,9 a 15,7% entre Phyllostomidae e Molossidae e de 12,8 a 16,7% entre Molossidae e Vespertilionidae. Entre Molossidae e Emballonuridae a variação foi de 10,9 a 11,9%. Para Emballonuridae e Vespertilionidae variou de 12,9 a 14,4% (Tabela 5e Apêndice A).

Tabela 5. Divergência genética entre as famílias de morcegos a partir do gene rRNA 16S

Famílias	**DIVERGÊNCIA INTERESPECÍFICA**			
	Menor (%)		**Maior (%)**	
Phyllostomidae **x** Emballonuridae	*G. soricina* x *R. naso*	10,9	*D. rotundus* x *R. naso*	16,3
Phyllostomidae **x** Vespertilionidae	*A. lituratus* x *L. blossevillii*	13,9	*P. recifinus* x *L. ega*	20,5
Phyllostomidae **x** Molossidae	*P. discolor* x *C. abrasus*	8,9	*D. rotundus* x *C. abrasus*	15,7
Molossidae **x** Vespertilionidae	*M. rufus* x *L. blossevillii* *M. temminckii x L. blossevillii*	12,8	*C. abrasus* x *L. ega*	16,7
Molossidae **x** Emballonuridae	*M. temminckii x R. naso* *N. laticaudatus x R. naso*	10,9	*M. rufus x R. naso*	11,9
Emballonuridae **x** Vespertilionidae	*R. naso* x *M. nigricans*	12,9	*R. naso* x *L. ega*	14,4

Foram geradas árvores filogenéticas de Neighbor-Joining (NJ), Máxima Verossimilhança (MV) e Máxima Parcimônia (MP). As topologias para as três árvores apresentaram-se de forma similar com formação de quatro clados individualizando cada família, nas quais as famílias Molossidae, Emballonuridae e Vespertilionidae mostraram-se como mais basais e mais proximamente relacionadas. O clado I formado por espécies da família Molossidae mostrou *C. abrasus* fortemente agrupado com *N. laticaudatus, M. temminckii* e *M. rufus*. A família Emballonuridae apesar de um único exemplar mostrou-se moderadamente agrupada com Vespertilionidae onde as espécies *M. nigricans*, *L. ega* e *L. blossevillii* estão fortemente agrupadas. As espécies da família Phyllostomidae formou o clado IV onde as espécies do gênero *Lophostoma* mostraram-se como mais basais e fortemente relacionadas. As espécies *P. recifinus*, *D. cinerea*, *D. gnoma*, *A. obscurus*, *A. planirostris*, *A lituratus* e *A. fimbriatus* mostraram-se fortemente agrupados e formando grupo irmão com *R. pumilio*, *R. fischerae* e *G. soricina* (apesar de não significante). *D. rotundus* mostrou-se fortemente agrupado com *D. youngii*. No entanto, a relação filogenética para várias espécies não obteve suporte significativo (Figura 3).

Figura 3. Árvore filogenética de Neighbor-Joining usando o algoritmo de Tamura 3- Parâmetros para os morcegos coletados na APA do Inhamum a partir do gene rRNA 16S. Os números nos ramos indicam da esquerda para a direita os valores de bootstrap para NJ, MV e MP.



4.4 Gene COI

Foram sequenciados 87 morcegos para o gene COI com 692 pares de bases. Na família Phyllostomidae, a divergência interespecífica variou de 0,3 a 29,6%entre *M. minuta e M. schmidtorum; D. rotundus* e *R. pumilio* respectivamente, a divergência intraespecífica variou de 0,0 entre *L. silvicola* e *A. obscurus* a 9,9 % entre *P. discolor*. Para a família Vespertilionidae, a divergência interespecífica variou de 22,2% entre *L. blossevillii* e *L. ega* a 24,1% entre *M. nigricans* e *L. ega*, a divergência intraespecífica variou de 0,7% entre *L. ega* a 9,9% para *M. nigricans*. Para a família Molossidae, a divergência genética interespecífica foi de 16,4% entre *N. laticaudatus* e *M. rufus* e a intraespecífica variou de 0,4% entre *N. laticaudatus* a 0,9%entre *M. rufus* (Tabela 6 e Apêndice B).

Tabela 6. Divergência genética interespecífica para morcegos de três famílias a partir do gene COI.

Famílias	**DIVERGÊNCIA INTERESPECÍFICA**			
	Menor (%)		**Maior (%)**	
Phyllostomidae	*M. minuta* x *M. schmidtorum*	0,3	*R. pumilio x D. rotundus*	29,6
Vespertilionidae	*L. blossevillii x L. ega*	22,2	*M. nigricans X L. ega*	24,1
Molossidae	*N. laticaudatus* x *M. rufus* 16,4			

Ao plotar as sequências dos morcegos coletados na APA do Inhamum na plataforma BOLD Systems foram observadas várias incongruências: *P. discolor* apresentou similaridade de 100% para *P. discolor* e para *P. hastatus*; *D. gnoma* fortemente similar a *D. cinerea; M. schmidtorum* a *Micronycteris cf. minuta; A. fimbriatus* a *A. lituratus; P. fusciventris* a *P. helleri*; *R. fischerae* a *R. pumilio; M. nigricans* a *M. riparius* e *N. laticaudatus* a *Eumops sp* e *T. bidens a Tonatia saurophila.* Por outro lado, foi confirmado a identificação das espécies *L. brasiliense, R. pumilio, D. youngii, D. rotundus, P. discolor, A. planirostris, A. obscurus, C. perspicillata, M. nigricans, L. blossevillii, L. ega, M. rufus, G. crenulatum, D. cinerea, L. silvicola* e *G. soricina* com valores de similaridade variando de 99,04% a 100% (Tabela 7).

Tabela 7. Similaridade das sequências das espécies da APA do Inhamum plotadas na plataforma BOLD Systems.

Sequências	**Espécies**	**Similaridade (%)**
CESC141 *C. perspicillata*	*Carollia perspicillata*	100
CESC001 *D. youngii*	*Diaemus youngii*	99,85
CESC187 *D. rotundus*	*Desmodus rotundus*	99,29
CESC136 *P. discolor*	*Phyllostomus discolor*	100
CESC111 P. discolor	*Phyllostomus hastatus*	100
CESC223 *D. gnoma*	*Dermanura cinerea*	99,68
CESC150 *M. schmidtorum*	*Micronycteris cf. minuta*	97,81
CESC114 *A. planirostris*	*Artibeus planirostris*	100
CESC60 *A. fimbriatus*	*Artibeus lituratus*	100
CESC133 *A. obscurus*	*Artibeus obscurus*	100
CESC171 *P. fusciventris*	*Platyrrhinus helleri*	100
CESC176 *L. brasiliense*	*Lophostoma brasiliense*	99,69
CESC135 *R. pumilio*	*Rhinophylla pumilio*	99,22
CESC43*R. fischerae*	*Rhinophylla pumilio*	99,68
CESC207 *M. nigricans*	*Myotis riparius*	99,84
CESC010 *M. nigricans*	*Myotis nigricans*	97,26
CESC114 *L. blossevillii*	*Lasiurus blossevillii*	99,04
CESC60 *L. ega*	*Lasiurus ega*	98,55
CESC68 *N. laticaudatus*	*Eumops sp*	98,72
CESC 171 *M. rufus*	*Molossus rufus*	100
CESC 218 *G. crenulatum*	*Gardnerycteris crenulatum*	97,64
CESC 127 *D. cinerea*	*Dermanura cinerea*	100
CESC 031 *L. silvicola*	*Lophostoma silvicola*	98,77
CESC 149 *M. minuta*	*Micronycteris cf. minuta*	98,3
CESC 040 *G. soricina*	*Glossophaga soricina*	99,65
CESC 94 *T. bidens*	*Tonatia saurophila*	98,43

5 DISCUSSÃO

5.1 A abordagem morfológica

Estudo sobre morcegos nos biomas maranhenses ainda é bastante incipiente (CRUZ et al. 2007). Poucos trabalhos realizados concentram-se na Amazônia maranhense e em São Luís, região norte do Maranhão (ALMEIDA et al. 2007; DIAS et al. 2009). Diante da evidente relevância dos morcegos na manutenção de vários ecossistemas, percebe-se a importância em conhecer a quiropterofauna de parte do Cerrado leste maranhense e com isso preencher lacuna que existe neste bioma. As informações sugeridas neste trabalho também propiciam o conhecimento de aspectos de distribuição geográfica destes animais.

Os filostomídeos foram evidenciados em maior número na área de estudo, com 25 espécies. Os morcegos desta família são endêmicos da região Neotropical sendo o grupo geralmente predominante e de maior diversidade nas comunidades de mamíferos (HUMPHREY & BONACCORSO, 1979; FENTON et al. 1992; KOOPMAN, 1993). Demonstrando similaridade com os muitos trabalhos realizados em áreas de florestas neotropicais, em que cerca de 40% das espécies dessa família podem ocorrer em sintopia ou simpatria (BROSSET & CHARLES-DOMINIQUE, 1990; REIS e MULLER, 1995; SIMMONS e VOSS, 1998; EMMONS e FEER, 1997; BERNARD et al. 2001**).** É proposto por vários autores que *A. lituratus* e *C. perspicillata* possuem uma maior eficiência em adaptarem-se a processos de fragmentação e/ou modificação de habitat (BROSSET et al. 1996, WILSON et al. 1996, ESTRADA & COATES-ESTRADA, 2002). A presença dessas espécies tem se mostrado especialmente abundante em áreas alteradas (MULLER & REIS 1992, WILSON et al. 1996, MIRETZKI & MARGARIDO 1999, PEDRO et al. 2001), incluindo até pequenas manchas florestais no interior de grandes áreas urbanas (FÉLIX et al. 2001, REIS et al. 2003). De acordo com Estrada & Coates-estrada (2002), esta flexibilidade pode estar relacionada com sua capacidade de utilizar vários estratos da vegetação, beneficiando-se das diversas oportunidades presentes nos ambientes modificados pelo homem. Houve registro de espécies de morcegos com distribuição comum para todos os biomas brasileiros e espécies ainda não reportadas para o Maranhão. As espécies *L. brasiliense, L. silvicola, M. schmidtorum, G. crenulatum, P. stenops, T. bidens, T. cirrhosus, R. fischerae, A. fimbriatus, A. obscurus, D. gnoma, P. fusciventris, P. recifinus,* pertencentes à família Phyllostomidae; *M. temminckii* pertencente a Molossidae; *L. blossevillii* e *L. ega* da família Vespertilionidae apresentam-se como os primeiros registros para o Maranhão de acordo com o Guia de Campo Morcegos do Brasil (REIS et al. 2013). No entanto, nos trabalhos de Almeida et al. (2007) e Dias et al. (2009) foi registrada a ocorrência de *A.*

obscurus, mas tal registro não corrobora os dados apresentados por Bernard et al. (2011) e Reis et al. (2013).

As espécies registradas neste estudo mostram uma expansão em pelo menos 350 km no sentido norte-leste do estado do Maranhão e evidenciam através dos gêneros *Artibeus*, *Dermanura*, *Trachops*, *Lophostoma*, *Desmodus*, *Glossophaga* e *Diaemus* uma grande variação trófica nesta área revelando a importância destes animais para o equilíbrio do ecossistema local.

5.2 Abordagem molecular a partir do gene rRNA 16S

As espécies *A. lituratus*, *M. rufus*, *C. perspicillata* e *P. discolor* revelaram uma divergência genética baixa corroborando os dados apresentados por Marchesin et al. (2008). *A. lituratus* revelou uma divergência similar a encontrada por Martins et al. (2007), mesmo estes tendo usado o marcador genético diferente, o citocromo *b*, no entanto, diferiu para *D. rotundus*, onde a divergência encontrada foi alta sugerindo inclusive a criação de mais táxons. A divergência intraespecífica para os filostomídeos de ocorrência na área de estudo variou apenas de 0,0 a 1,9% estando de acordo com Marchesin et al. (2008) que encontraram variação intraespecífica com valores muito baixos. As análises a partir do gene rRNA 16S mostraram sinais de parentesco filogenético entre os hematófagos *D. rotundus* e *D. youngii*, os congêneres *Lophostoma* e entre as espécies da subfamília Stenodermatinae, constituída por congêneres de *Artibeus*, *Dermanura* e *P. fusciventris* e serviu para otimizar a classificação para as espécies *D. gnoma* e *D. cinerea; P. fusciventris* e *P. recifinus; M. minuta* e *M. schmidtorum* que apresentaram baixos valores de divergência genética indicativo de pertencerem à mesma espécie. No entanto, entre os vespertilonideos, percebe-se divergência genética intraespecífica alta para *M. nigricans* (4,2%), e para Taddei (1980), esta condição pode ser apontada pelo habitat e modo de vida destes morcegos, pois optam por abrigar-se em folhagens e alçar voos altos, dificultando sua coleta pelas redes de espera. Nesse sentido, a pouca quantidade de caracteres morfológicos apropriados para sua classificação taxonômica resulta na carência de publicações referentes às relações filogenéticas do grupo (MARCHESIN et al. 2008).

Na análise da árvore filogenética percebe-se que para a família Phyllostomidae as espécies *D. rotundus* e *D. youngii*, *L. silvicola* e *L. brasiliense* e os congêneres de *Artibeus* com *Dermanura* e *Platyrrhinus recifinus* apresentam fortes valores de bootstrap. Entre *Artibeus*, relações filogenéticas apresentam intenso questionamento (HONEYCUTT, 1981; VAN DEN BUSSCHE, 1992; LIM, 1993; WETTERER et al. 2000) porém, a prevalência de

um clado monofilético com as espécies de *A. lituratus e A. planirostris* indica um suporte monofilético para estas espécies, circunstância também observada por Van Den Bussche et al. (1998). Outras espécies desta família precisam ser melhor amostradas a fim de obter informações quanto as suas relações filogenéticas.

5.3 Abordagem molecular a partir do gene COI

O uso de marcadores moleculares está sendo utilizado em vários trabalhos de identificação biológica, para morcegos essa prática vem sendo empregada desde 1986 com a proposta de estabelecer o relacionamento ao nível de família para a ordem Microchiroptera (MARCHESIN, 2006). Devido às características que apresenta, o fragmento gênico Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) é uma importante ferramenta para a prática da identificação dos seres vivos. Este gene possui aparentemente uma maior amplitude de sinal filogenético em relação a outros genes mitocondriais e os *primers* ou iniciadores universais são de grande robustez (FOLMER et al.1994; ZHANG e HEWITT, 1997). Esta concepção tem sido aceita entre pesquisadores que trabalham com grupos que tenham problemática taxonômica (NANNEY, 1982; PACE, 1997; ALLANDER et al. 2001; HAMELS et al. 2001). Os dados apresentados neste estudo para o gene COI ratificam a identidade das espécies coletadas em sua maioria considerando os critérios propostos por Bradley e Baker (2006) os quais sugerem que para o COI valores de divergência genética abaixo de 2% são indicativos de divergência intraespecífica e valores entre 2 a 11% são frequentemente indicativos de variação entre espécies (CLARE et al. 2011). Apesar das informações geradas por meio do gene COI ter ratificado a identidade para a maioria das espécies coletadas, algumas foram incongruentes, entre elas: *P. fusciventris* e *P. recifinus*, similaridade na ordem de 98,92% com a espécie *P. helleri*, no entanto, de acordo com Velazco et al. (2010) tal espécie não ocorre para o Brasil. As espécies *M. minuta* e *M. schmidtorum* mostraram similaridade de 98,16% com a espécie *M. cf minuta*. Já *M. nigricans* teve uma similaridade de 100% com a espécie *M. riparius*.

Ressalta-se ainda que nos trabalhos de Almeida et al. (2007) e Dias et al. (2009) foi registrada a ocorrência de *A. obscurus* para o Maranhão, mas tal registro não corrobora os dados apresentados por Bernard et al. (2011) e Reis et al. (2013), mas corrobora nossos achados para o bioma Cerrado leste maranhense.

5.4 Abordagem taxonômica

No território brasileiro, há registro para nove famílias e cerca de 175 espécies são espalhadas nos cinco biomas (REIS et al. 2013). De acordo com Bernard et al. (2011) alguns trabalhos têm sido propostos com a finalidade de identificar a quiropterofauna no país, porém estes esforços ficam limitados a chaves de classificação defasadas e específica como Gregorin e Taddei (2002) para identificação de molossideos ou mesmo limitada a gêneros como: *Sturnira* (GIANNINI e BARQUEZ, 2003), *Diclidurus* (CEBALLOS e MEDELLÍN, 1988), *Micronycteris* (SIMMONS, 1998), *Lasiurus* (SHUMP JR e SHUMP, 1982) e *Platyrrhinus* (FERRELL e WILSON, 1991). Tal condição ocasiona frequentemente propostas de mudanças na ocorrência de morcegos por região e até mesmo a alteração de status taxonômico (BERNARD et al. 2011).

Os dados genéticos deste estudo apontaram incongruências na identificação de algumas espécies quando comparados aos morfológicos, para *Dermanura cinerea* e *D. gnoma* os genes rRNA 16S e COI apontaram uma divergência de 0,2% e 0,4% respectivamente, pela morfologia. A diferença entre essas duas espécies se baseia na quantidade de dentes, *D. cinerea* (28) e *D. gnoma* (30). De forma semelhante ocorre também para *Micronycteris minuta* e *M. schmidtorum* com divergência de 0,0% para o gene rRNA 16S e 0,3% para o COI. A diferença morfológica é sustentada pelo tamanho dos pelos das margens superiores internas das orelhas, que em *M. schmidtorum* é um pouco maior, variando de 5 mm a 8 mm. Para *Rhinophylla pumilio* e *R. fischerae* a divergência genética para o gene rRNA 16S foi de 0,4% enquanto para o COI de 0,2%, para essas espécies a morfologia aponta como caractere diagnóstico a presença de um diastema ente o segundo incisivo e o canino superior na espécie *R. fischerae*. Para *Artibeus lituratus* e *A. fimbriatus* a divergência foi de 0,3% para o gene rRNA 16S e 0,6% para o COI, a caracterização morfológica, aponta para a visualização mais evidente de duas listras faciais em *A. lituratus* e menor nitidez em *A. fimbriatus.* A abordagem morfológica quanto aos critérios utilizados para a classificação de morcegos é baseada em chaves de classificação compiladas por Reis et al. (2013).

Neste trabalho também foram considerados aspectos de distribuição geográfica, pois foi evidenciado para a área de estudo espécies endêmicas do bioma Amazônia como *Platyrrhinus fusciventris* e *Rhinophylla fischerae* considerando Bernard et al. (2011); Reis et al. (2013). Algumas espécies, relatadas nesse trabalho têm uma grande distribuição geográfica, podendo ser encontradas nos biomas Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e em vários estratos amazônicos (MELO, 2013), entre elas: *Phyllostomus discolor*, *Phyllostomus hastatus, Glossophaga soricina, Carollia perspicillata, Molossus rufus, L. brasiliense, L.*

silvicola, Molossops temminckii, Diaemus youngii, Desmodus rotundus, Trachops cirrhosus, Micronycteris minuta, Gardnerycteris crenulatum, Phylloderma stenops, Artibeus lituratus, A. planirostris, D. cinerea, Sturnira lilium, Nyctinomops laticaudatus, Lasiurus ega, Lasiurus blossevillii e Myotis nigricans.

5.5 Vírus rábico

O resultado do teste de imunofluorescência direta mostrou resultado negativo para a ocorrência do vírus da raiva nos espécimes analisados corroborando Póvoas et al. (2014) quanto aos morcegos não hematófagos do estado do Maranhão, mas diferindo dos hematófagos onde há registro de vírus. Os resultados aqui apresentados diferem dos trabalhos realizados por Cunha et al. (2005) que analisaram espécies pertencentes ao gênero *Artibeus* e mostraram resultados positivos para três espécies, entre elas: *A. lituratus, A. planirostris e A. jamaicensis* na cidade de São José do Rio Preto em São Paulo. Os morcegos infectados pelo vírus rábico podem sofrer uma fase de excitabilidade seguida de paralisia, principalmente das asas, o que faz com que estes animais deixem de voar. Deve-se suspeitar, portanto, de morcegos (hematófagos ou não), encontrados em local e hora não habitual. Este fato é a base para o desenvolvimento das atividades da vigilância epidemiológica passiva da raiva nestes animais, que vem sendo desenvolvida no Brasil, particularmente em alguns estados do sudeste. Ressalta-se que durante a fase de paralisia dos morcegos não há paralisia do maxilar, o que permite que ele, uma vez manipulado, possa morder (MANUAL TÉCNICO DO INSTITUTO PASTEUR - SÃO PAULO, 2009). As características supracitadas não foram evidenciadas para nenhum espécime coletado neste estudo, sendo confirmada a ausência do vírus pelo diagnóstico laboratorial.

6 CONCLUSÃO

Os dados morfológicos e moleculares registraram a ocorrência de quatro famílias de morcegos para a APA do Inhamum: Phyllostomidae, Vespertilionidae, Molossidae e Emballonuridae. No entanto, diferiram quanto ao status específico para algumas espécies enquanto a abordagem morfológica apontou 33 espécies a análise molecular identificou 28 espécies.

As espécies *Lophostoma brasiliense*, *Lophostoma silvicola*, *Micronycteris schmidtorum*, *Gardnerycteris crenulatum*, *Phylloderma stenops*, *Tonatia bidens*, *Trachops cirrhosus*, *Rhinophylla fischerae*, *Artibeus fimbriatus*, *Artibeus obscurus*, *Dermanura gnoma*, *Platyrrhinus fusciventris*, *Platyrrhinus recifinus*, *Molossops temminckii*; *Lasiurus blossevillii* e *Lasiurus ega* apresentaram-se como novos registros para o Maranhão.

A ocorrência das espécies *Artibeus obscurus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Diaemus youngii*, *Micronycteris minuta*, *Phyllostomus discolor*, *Phyllostomus hastatus*, *Rhinophylla pumilio*, *Sturnira lilium*, *Molossus rufus* e *Myotis nigricans* ampliou em cerca de 350 km a área de distribuição destes quirópteros.

As amostras de tecido encefálico submetidas ao teste para verificar a presença do vírus rábico em morcegos nesta área do Maranhão apresentaram resultado negativo e nenhum caso de raiva humana ou em herbívoros foi notificado até o término desta pesquisa, mesmo assim, campanhas de esclarecimento sobre os riscos de transmissão e informações sobre os morcegos têm que ser incentivadas a fim de divulgar os procedimentos corretos adotados pela população quando ocorrer o contato com estes animais.

7 REFERÊNCIAS

AGUIAR L.M.S & BRITO. D. Do current vampire bat (*Desmodus rotundus*) population control practices pose a threat to Dekeyser's nectar bat's (*Lonchophylla dekeyseri*) long-term persistence in the Cerrado? Acta Chiropterologica 12(2): 275-282, 2010.

AGUIAR, L.M.S & ANTONINI, Y. Diet of two sympatric insectivores bats (Chiroptera: Vespertilionidae) in the Cerrado of Central Brazil. Revista brasileira de Zoologia 25(1): 28-31, 2008.

ALBUJA-V. L. Lista de mamíferos actuales del Ecuador. Instituto de Ciências Biológicas, Escuela Politécnica Nacional. Quito, 2011.

ALLANDER, T., EMERSON, S. U., ENGLE, R. E., PURCELL, R. H. & BUKH, J. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. Proceeding of the National Academy Sciencis. USA 98, 11 609-11 614, 2001.

ALMEIDA, M.F, MARTORELLI, L.F.A, SODRÉ, M.M, KATAOKA A.P.A.G, ROSA, A.R, OLIVEIRA, M.L ET AL. Rabies diagnosis and serology in bats from the State of São Paulo, Brazil. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 44:140-145,2007.

BARROS, M.C. Biodiversidade na área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum. ed. UEMA: São Luís, 2012.

BELWOOD J.J & MORRIS G.K Bat predation and its influence on calling behavior in neotropical katydids. Science 238:64-67, 1987.

BERNARD, E.; AGUIAR, L. M. S.; BRITO, D.; CRUZ-NETO, A. P.; GREGORIN, R.; MACHADO, R. B.; OPREA, M.; PAGLIA, A. P.; TAVARES, V. C. Uma análise de horizontes sobre a conservação de morcegos no Brasil. In: FREITAS, T. R. O. & VIEIRA. E. M., Mamíferos do Brasil: Genética, Sistemática, Ecologia e Conservação. Sociedade Brasileira de Mastozoologia, Rio de Janeiro, vol. 2, pp 19-35, 2012.

BERNARD, E. TAVARES, V.C. & SAMPAIO, E. Compilação atualizada das espécies de morcegos (Chiroptera) para a Amazônia Brasileira. Biota Neotropica. 11(1), pp 35-46, 2011.

BERNARD, E.; ALBERNAZ, A.L.K.M.; MAGNUSSON, W.E. Bat species composition in three localities in the Amazon Basin. Studieson Neotropical Fauna and Environment 36 (3): 177-184, 2001.

BEZERRA, P.V. S. F. Morcegos Fitófagos do Parque Ecológico Olhos D´água. Centro Universitário de Brasília Faculdade de Ciências da Saúde. Brasília, 2003.

BOYLES, J.G, CRYAN P.M, MCCRACKEN G.F & KUNZ T.H. Economic importance of bats in agriculture. Science 332:41-42, 2011.

BRADLEY, R.D, BAKER R.J, Speciation in mammals and the Genetic Species Concept. J Mammal 87: 643-662, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009.

BREDT, A., ARAÚJO, F.A.A., CAETANO-JÚNIOR, J., RODRIGUES, M.G.R., YOSHIZAWA, M., SILVA, M.M.S., HARMANI, N.M.S., MASSUNAGA, P.N.T., BÜRER, S.P., PORTO, V.A.R. & UIEDA, W. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 1996.

BREDT, A, UIEDA, W. & PEDRO W. A. Plantas e morcegos: na recuperação de áreas degradadas e na paisagem urbana. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2012.

BROSSET, A, CHARLES-DOMINIQUE, P. The bats of French Guiana: a taxonomic, faunistic and ecological approach.Mammalia, 54(4): 509-560, 1990.

BROSSET, A.; P. CHARLES-DOMINIQUE; A. COCKLE; J.F. COSSON & D. MASSON. Bat communities and deforestation in French Guiana. Canadian Journal of Zoology, Ottawa, 74: 1974-1982, 1996.

CASTELLA V, RUEDI M, EXCOFFIER L. Contrasted patters of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat Myotismyotis. Journal of Evolutionary. Biology. 14:708-720, 2001.

CEBALLOS, G. & MEDELLIN, R.A. *Diclidurus albus*. Mammals of Species 316:1-4. (22), 1988.

CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Guia de manejo e controle de morcegos: técnicas de identificação, captura e coleta. Porto Alegre: CEVS/RS, 2012.

CIRRANELLO, A., N. B. SIMMONS, S. SOLARI, & R. J. BAKER. Morphological diagnoses of higher-level phyllostomid taxa (Chiroptera: Phyllostomidae). Acta Chiropterologica, 18: 39-71, 2016.

CLARE, E.L, LIM, B.K, FENTON, M.B, HEBERT, P.D.N. Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. PLOS ONE 6(7): e22648. doi: 10.1371/ journal.plosone.0022648, 2011.

CLEVELAND C.J, BETKE. M, FEDERICO. P. Economic value of the pest control service provided by Brazilian free-tailed bats in southcentral Texas. Front Ecology Environmental 4: 238-243, 2006.

COSTA, L.J.C.; ANDRADE, F.A.G.; UIEDA, W.; MARTORELLI, L.F.A.; KATAOKA, A.P.A.G.; FERNANDES, M.E.B. Sorological investigation of rabies vírus neutralizing antibodies in bats captured in the eastern Brazilian Amazon. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 107(11): 684-689, 2013.

CRUZ, L.D., MARTÍNEZ, C., FERNANDES, F. R. Comunidades de morcegos em hábitats de uma Mata Amazônica remanescente na Ilha de São Luís, Maranhão, vol. 37(4) 2007: 613-620, 2007.

CUNHA, E.M.S., LARA, M.C.C.S.H., NASSAR, A.F.C., SODRÉ, M.M., AMARAL, L.F.V., Isolation of rabies virus in *Artibeus fimbriatus* bat in the State of São Paulo, Brazil. Revista de Saúde Pública; 39: 683-4, 2005.

DIAS, P.D., SANTOS, C.LC., RODRIGUES, F.S., ROSA, L.C., LOBATO,K.S., REBÊLO, J.M.M., Parasitic flies (Diptera, Hippoboscoidea) on bats (Mammalia, Chiroptera) in Maranhão State, Revista Brasileira de Entomologia. vol. 53 no.1 São Paulo, 2009.

EMMONS, L.H., FEER, F. Neotropical Rainforest Mammals. 2ed. University of Chicago Press, Chicago, USA. 380pp, 1997.

ESTRADA, A.; R. COATES-ESTRADA & D. MERITT JR. Bats species richness and abundance in tropical rain forest fragments and in agricultural habitats at Los Tuxtlas, Mexico. Ecography, Copenhagen, 16: 309-318. 1993.

FEIJÓ, A., ROCHA, A. & ALTHOFF, S. New species of *Histiotus* (Chiroptera: Vespertilionidae) from northeastern Brazil, Zootaxa 4048 (3), 412-427, Nov 2015.

FÉLIX, J.S.; N.R. DOS REIS, I.P. LIMA; E.F. COSTA & A.L. PERACCHI. Is the area of the Arthur Thomas Park, with its 82.72 ha, sufficient to maintain viable chiropteran populations? Chiroptera Neotropical, Brasília, 7 (1-2): 129-133, 2001.

FELSENSTEIN, J. Filogenyes and the comparative method. The American Naturalist. vol 125. n.1, janeiro, pp: 1-15, 1985, 2001.

FENTON, M.B.; L. ACHARYA; D. AUDET; M.B.C. HICKEY; C. MERRIMAN; M.K. OBRIST & D.M. SYME. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. Biotropica, Washington, 24 (3): 440-446, 1992.

FENTON, M. B. Constraint and flexibility; bats as predators, bats as prey. Symposia of the Zoological Society of London, nº 67: 277-290, 1995.

FERREL, C. S.; WILSON, D. E. *Platyrrhinus helleri. Mammalian Species*. n. 373. New York: p.1-5, 1991.

FLORES-CRESPO F R., UNHART S.B. & BURNS R.J. Camportamiento del vampiro (*Desmodus rotundus*) em cautiverio. The Southwestern Naturalist. 17(12): 139-143, 1972.

FOLMER O, BLACK M, HOEH W, LUTZ R, VRIJENHOEK R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine BiologyBiotechnology. Oct; 3(5): 294-9, 1994.

GALINDO-GONZALES, J. Dispersion de semillas por murciélagos; su importancia em la conservacion y regeneracion del bosque tropical. Acta Zoológica Mexicana. (nueva serie) 73: 57-74, 1998.

GARDNER, F. A. Mammals of South America, Volume 1. The University of Chicago Press, Ltda, London, 2007.

GIANNINI, N.P. & BARQUEZ, R.M. *Sturnira erythromos*. Mammals of Species 729:1-5. 35, 2003.

GOODWIN, G.G. & A.M. GREENHALL. A review of the bats of Trinidad and Tobago: descriptions, rabies infection and ecology. Bulletin of the American Museum of Natural History, New York,122(3): 187-302, 1961.

GREENHALL, A. M. & SCHIMDT, U. (Eds.). Feeding behavior. In: Natural history of vampire bats. Florida: CRC Press, p. 111-131, 1988.

GREGORIN, R., TAVARES, V. Morcegos do Brasil: Biologia, Ecologia e Conservação, Chapter: Sistemática de Morcegos no Brasil: história e perspectivas, 2008.

GREGORIN R. & TADDEI, V.A. Chave artificial para a identificação de Molossideos brasileiros (Mammalia, Chiroptera).Mastozoologia Neotropical 9, 2002.

GRIFFTHS, T. A. Systematics of the New World nectar-feeding bats (Mammalia, Phyllostomidae), based on the morphology of the hyoid and lingual regions. Am. Mus. Novitates., v. 2742, p. 1-45, 1982.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium. Series. vol. 41 pp 95-98, 1999.

HAMELS, J., GALA, L., DUFOUR, S., VANNUFFEL, P., ZAMMATTEO, N. & REMACLE, J. Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance. BioTechniques. 31, 1364-1372, 2001.

HOOD, C. S., BAKER, R. J. G- and C- banding chromosomal studies of bats of the family Emballomuridae. Journal of Mammalogy., v. 67, p. 705-711, 1986.

HONEYCUTT, R H, GREENBAUM, I F, BAKER, R J, SARICH, V M. Molecular evolution of vampyre bats. Journal of Mammalogy, 62:805-811, 1981.

HUBER, J. Matas e madeiras amazônicas. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. v. 6. n. 91. Belém: p. 91-225, 1910.

HUMPHREY, S.R. & F.J. BONACCCORSO. Population and community ecology, p. 409-441. In: R.J. BAKER; J.K. JONES JR. & D.C. CARTER (Eds). Biology of bats of the New World family Phyllostomidae, part III. Special Publications Museum Texas Tech University, Lubbock, 16: 1-441, 1979.

JONES, G.; TEELING, E. C. The evolution of echolocation in bats. Trends in Ecology & Evolution, v. 21, n. 3, p. 149-156, 2006.

JONES, K. E.; PURVIS, A.; MCLARNON; BININDA-EMONDS, O. R. P.; SIMMONS, N. B. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). Biol. Rev., v. 77, p. 223-259, 2002.

KALKA M.B, SMITH A.R & KALKO E.K.V. Bats limit arthropods and herbivory in a tropical forest. Science 320: 71-71, 2008.

KOOPMAN, K.F. Order Chiroptera, p. 137-24 1. In: D.E. WILSON & D.M. REEDER (Eds). Mammals species of the World, a taxonomic and geographic reference. Washington, D.C., Smithsonian Institute. Press, 1206p, 1993.

LIBRADO, P. & ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452, 2009.

LIM, B. K. Cladistic reappraisal of neotropical Stenodermatine bat phylogeny. Cladistic, v.9, p. 147-165, 1993.

MANUAL TÉCNICO DO INSTITUTO PASTEUR. Secretaria de Estado da Saúde. Profilaxia da raiva humana - São Paulo, 2009.

MARCHESIN, S.R.C. Divergência genética e relacionamento filogenético em espécies de morcegos das famílias Molossidae e Phyllostomidae baseado em análises de PCR-RFLP. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto. 2006.

MARCHESIN S.R.C., M.R. BEGUELINI, K.C. FARIA, P.R.L. MOREIRA & E. MORIELLE-VERSUTE Assessing genetic variability in bat species of Emballonuridae,

Phyllostomidae, Vespertilionidae and Molossidae families (Chiroptera) by RFLP-PCR. Genetics and Molecular Research 7 (4): 1164-1178, 2008.

MARTINS, F. DITCHFIELD, A. MEYER, De MORGANTE, J. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, Desmodus rotundus (Phyllostomidae). Journal compilation, 2007.

MELO, V.A.P., Diversidade da Assembléia de Morcegos (Quirópteros: Mammalia) do fragmento do Cerrado, no Parque Estadual de Vassununga e Estação Ecológia de Jataí-SP, Dissertação de Mestrado, pp-52, 2013.

MIRANDA, J.M. D., BERNARDI, ITIBERÊ, P. & PASSOS, FERNANDO, C., Chave ilustrada para determinação dos morcegos da Região Sul do Brasil. Curitiba, 2011.

MIRETZKI, M. & T.C.C. MARGARIDO. Morcegos da Estação Ecológica do Caiuá, Paraná (sul do Brasil). Chiroptera Neotropical, Brasília, 5 (1-2): 105-108, 1999.

MULLER, M.F. & N.R. DOS REIS. Partição de recursos alimentares entre quatro espécies de morcegos frugívoros (Chiroptera, Phyllostomidae). Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba, 9 (3/4): 345-355, 1992.

MUCHHALA, N. Nectar bats tows huge tongue in its rib cage. Nature, v.444, London, p.701-702, 2006.

MURPHY, W. J.; EIZIRIK, E.; O´BRIEN, S. J.; MADSEN, O.; SCALLY,M.; DOUADY, C. J.; TEELING, E.;RYDER, O. A.; STANHOPE, M. J.; DE JONG, W. W.; SPRINGER, M. S. Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. *Science*. v.294, n.5550. Washington: p.2348-2351, 2001.

NANNEY, D. L. Genes and phenes in *Tetrahymena*. *Bioscience* 32, 783-788, 1982.

NOGUEIRA, M.R.I.P. LIMA, R. MORATELLI, V.C. TAVARES, R. GREGORIN & A.L. PERACCHI. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. Check List, 10(4): 808-821, 2014.

OKSANEN, J. et al. Vegan: community ecology package. R package version, v.1, p. 8-8. 2010.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science 276, 734-740, 1997.

PACHECO, S.M. Técnicas de campo empregadas no estudo de quirópteros. Rio Grande do Sul. Universidade de Santa Cruz do Sul, Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS. Porto Alegre - RS, 2004.

PACHECO S.M. MARQUES, R.V. & ESBÉRARD, C.E.L. Morcegos do Brasil: biologia, ecologia e conservação. Armazém Digital, Porto Alegre, 2008.

PACHECO, S.M.; SEKIAMA, M.L.; OLIVEIRA, K.P.A.; QUINTELA, F.; WEBER, M.M.; MARQUES, R.V.; GEIGER, D. & SILVEIRA, D.D. Biogeografia de quirópteros da Região Sul. Revista Ciência & Ambiente 35: 181-202, 2009.

PALUMBI, S.R., MARTIN, A.P., ROMANO, S.L., MCMILLAN, W.O., STICE, L., GRABOWSKI, G. The Simple Fool's Guide to PCR. Dept. of Zoology, University of Hawaii, Honolulu, 1991.

PEDRO, W.A.; F.C. PASSOS & B.K. LIM. Morcegos (Chiroptera; Mammalia) da Estação Ecológica de Caetetus, Estado de São Paulo. Chiroptera Neotropical, Brasília, 7 (1-2): 136-140, 2001.

PETTIGREW, J. D. Are flying foxes really primates? *Bats*, v.3, n.2. Austin, p.1-2, 1986.

PIJL, L. VAN DER. The dispersal of plants by bats (Chiropterocory). Acta Amazônica, v.6, Manaus: p. 291-315, 1957.

PÓVOAS, D. CHAVES, N. BEZERRA, D. ALMEIDA, V. SARAIVA, L. Raiva em herbívoros no estado do Maranhão: um estudo retrospectivo, 2014.

REIS, N.R. DOS & M.F. MULLER..Bat diversity of forests and open areas in a subtropical region of south Brazil. Ecologia Austral, Córdoba, 5: 3 1-36, 1995.

REIS, N.R. FREGONEZI, M.N. PERACCHI, A.L. & SHIBATTA, O.A. Morcegos do Brasil: Guia de campo. Technical Books, Rio de Janeiro, 2013.

REIS, N.R., PERACCHI, A.L., PEDRO, W.A. & LIMA, I.P. Morcegos do Brasil. UEL, Londrina, 2007.

REIS, N.R., SHIBATTA, O.A., PERACCHI, A.L., PEDRO, W.A. & LIMA, I.P. Sobre os mamíferos do Brasil. In Mamíferos do Brasil (N.R. Reis, A.L. PERACCHI, W.A. PEDRO & I.P. Lima, eds.). 2. ed. N.R. Reis, Londrina, p. 23-29, 2011.

REISKIND, M.H & WUND, M.A. Experimental assessment of the impacts of Northern long-eared bats on ovipositing *Culex* (Diptera: Culicidae) mosquitos. Journal of Medical Entomoly 46:1037-1044, 2009.

SAMBROOK, J. RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning*. 3rd edition. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SÁNCHEZ, J.H. & D. LEW. Lista actualizada y comentada de los mamíferos de Venezuela. Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales. 2012: 173-238, 2012.

SANGER, F., AIR, G. M., BARRELL, B. G., BROWN, N. L., COULSON, A. R., FIDDES, J. C., HUTCHISON, C. A., SLOCOMBE, P. M. & SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage φX174 DNA. Nature 265,687-695, 1977.

SAZIMA, M.; BUZATO, S.; SAZIMA, I. Bat pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic forest sites in Brazil. *Annals of Botany*, v. 83, n. 6. London: p. 705-712, 1999.

SCHNEIDER M.C, ROMIJN P.C, UIEDA. W, TAMAYO. H, SILVA D.F, BELOTTO.A, SILVA J.B, LEANES L.F. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? Pan Am Journal Public Health 25: 260-269, 2009.

SHUMP Jr., K.A. & SHUMP, A.U. *Lasiurus borealis*. Mammals of Species.183:1-6. 121, 1982.

SIMMONS, J.A. 1994. The case for chiropteran monophyly. American Museum Novitates.3103:1, 1994.

SIMMONS, N.B .A new species of *Micronycteris* (Chiroptera: Phyllostomidae) from Northeastern Brazil, with comments on phylogenetic relationships. American Museum. Novitates 3158:1-34. 123, 1998.

SIMMONS, N.B. & GEISLER, J.H. 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, 1998.

SODRÉ, M.M.; GAMA, A.R. & ALMEIDA, M.F. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. Revista Instituto de Medicina Tropical. São Paulo, 52(2): 75-81, 2010.

SOLARI, S., MUÑOZ-SABA, Y., RODRÍGUEZ-MAHECHA, J.V., DEFLER, T.R., RAMÍREZ - CHAVES, H.E., & TRUJILLO, F., Riqueza, endemismo y conservación de los mamíferos de Colômbia. Mastozoologia Neotropical20(2): 301-365, 2013.

SPRADLING, A. C., BELLEN, H. J., LEVIS, R. W., LIAO, G., HE, YUCHUN., CARLSON, J. W., TSANG, G., HOLM, M. E., ROBIN, H.P., SCHULZE, K. L. HIESINGER, P.R., RUBIN, G.M., HOSKINS, R.A., HIESINGER, P.R. The BDGP Gene Disruption Project June 1, vol. 167 no. 2761-781; doi:10.1534 /genetics.104.026427, 2004.

STRAUBE, F.C. & G.V. BIANCONI. Sobre a grandeza e a unidade utilizada para estimar esforço de captura com utilização de redes-de-neblina. Chiroptera Neotropical, Brasília, 8 (1-2): 150-152, 2002.

TADDEI, V.A. Phyllostmidae (Chiroptera) do Norte-Ocidental do Estado de São Paulo. II-Glossophaginae, Carollinae, Sturnirinae. Ciência e Cultura, 1980.

TAMURA, K., STECHER., G, PETERSON., D, FILIPSKI., A, KUMAR., S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6. Molecular Biology Evolution 30: 2725-2729, 2013.

TAVARES, V.C., GREGORIN, R., & PERACCHI, A.L., Diversidade de morcegos no Brasil: lista atualizada com comentários sobre distribuição e taxonomia. In Morcegos no Brasil: biologia, sistemática, ecologia e conservação (S.M. Pacheco, R.V. Marques, R.V. & C.E.L. Esberard, orgs.). Armazém Digital, Porto Alegre, 2008.

TSCHAPKA, M., VON HELVERSEN, O., BARTHLOTT, W., Bat pollination of *Webero cereustunilla*, an epiphytic rain forest cactus with functional flagelliflory. *Plant Biology*, v.1, Stuttgart. p. 554-559, 1999.

UIEDA, W. Biologia e dinâmica populacional de morcegos hematófagos no Brasil. Anais II Curso de Atualização em Raiva dos Herbívoros, Curitiba, 1996.

UIEDA, W. Comportamento alimentar do morcego hematófago, *Diaemus youngi*,em aves domésticas. *Revista Brasileira de Biologia*. v. 53, n. 4. São Carlos: p. 529-538, 1992.

UIEDA, W. História natural dos morcegos hematófagos no Brasil. In: S.M. PACHECO; R.V. MARQUES; C.E.L. ESBERÁRD (Ed.). Morcegos no Brasil: biologia, sistemática, ecologia e conservação. Porto Alegre, Armazém Digital, 510p, 2008.

UIEDA, W.,CHAVES, M.E., SANTOS, C.F., Chave de campo para identificação de morcegos brasileiros. Departamento de Zoologia do Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista - Botucatu, São Paulo, 2006.

VAN DEN BUSSCHE, R. A. Restriction - site variation and molecular systematics of New World Leaf-Nosed Bats. Journal of Mammalogy, v. 73, p. 29-42, 1992.

VAN DEN BUSSCHE, R. A., HUDGEONS, J. L., BAKER, R. J. Phylogenetic accuracy, stability, and congruence. Relatioships within and among the New World bat genera *Artibeus*, *Dermanura* and *Koopmania*. In: KUNZ, T. H., RACEY, P. A. (Ed.). Bat biology and conservation. Washington: Smithsonian Institution Press, p. 59-71, 1998.

VELAZCO, P.M., A.L. GARDNER and B.D. PATTERSON. Systematic of the *Platyrrhinus helleri* species complex (Chiroptera, Phyllostomidae), with descriptions of two new species. Zoological Journal of the Linnean Society 159: 785-812, 2010.

VOSS, R.S.; EMMONS, L.H. Mammalian diversity in Neotropical lowland rainforests: A preliminary assessment. Bulletin American Museum of Natural History, 230: 1-115, 1996.

WETTERER, A. L., ROCKMAN, M. V., SIMMONS, N. B. Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): Data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. Bulletin of the American Museum of Natural History. v. 248, 200p, 2000.

WILSON, D.E.; C.F. ASCORRA & S. SOLARI. Bats as indicators of habitat disturbance, p. 613-625. In: D.E. WILSON & A. SANDOVAL (Eds). Manu: The biodiversity of southeastern Peru. Washington, Office of biodiversity programs. National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, 365p, 1996.

YALDEN, D. W., MORRIS, P. A. The lives of bats. London: Red Wood Burn, 1975.

ZHANG, D.-X. & HEWITT, G. M. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insects. Insect Molecular Biology. 6, 143-150, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Matriz de divergência genética gerada para os morcegos coletados na APA do Inhamum a partir do algoritmo de Tamura 3 – Parâmetros a partir do gene rRNA 16S. Os números em negrito na diagonal representam os valores de divergência intraespecífica.

ESPÉCIES	DIVERGÊNCIA (%)																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
1. R.naso	-																																
2.L.ega	14,4	**0,7**																															
3.L.blossevillii	13,9	9,6	**0,6**																														
4.M.nigricans	12,9	11,9	11,5	**4,2**																													
5.C.abrasus	11,1	16,7	15,3	13,5	-																												
6.Nlaticaudatus	10,9	14,9	14,2	13,0	7,3	-																											
7.M.rufus	11,9	14,8	12,8	13,0	6,0	5,7	**0,4**																										
8.Mtemminckii	10,9	14,3	12,8	13,0	7,7	4,9	5,4	-																									
9.A.fimbriatus	13,3	16,4	14,0	15,3	11,6	11,6	11,3	10,9	**0,4**																								
10.A.lituratus	13,1	16,2	13,9	15,1	11,6	11,6	11,3	11,0	0,3	**0,4**																							
11.A.obscurus	11,9	16,7	14,1	14,7	11,3	11,1	11,1	10,2	2,1	2,1	**1,4**																						
12.A.planirostris	12,4	16,5	13,9	14,9	11,3	11,5	11,1	10,7	1,1	1,1	1,5	**1,8**																					
13.Precifinus	14,3	20,5	19,6	18,4	14,3	15,5	15,1	15,0	8,4	8,4	7,8	8,1	-																				
14.C.perspicillata	11,4	17,2	15,8	15,4	11,1	11,2	12,0	10,4	9,2	9,2	8,1	8,4	9,8	**0,6**																			
15.D.cinerea	13,2	17,9	16,5	16,2	13,4	12,2	12,6	11,1	4,7	4,7	3,9	4,5	7,5	8,0	**0,3**																		
16.D.gnoma	13,1	18,0	16,4	16,1	13,4	12,2	12,4	11,0	4,6	4,6	3,8	4,4	7,5	8,0	0,2	-																	
17.R.fischerae	11,7	18,0	15,1	17,1	11,3	12,3	11,9	11,1	10,3	10,2	9,1	9,8	10,9	8,9	9,9	9,8	**0,2**																
18.R.pumilio	11,6	18,0	15,2	17,2	11,5	12,4	12,1	11,2	10,5	10,4	9,3	9,9	10,9	8,8	9,9	9,8	0,2	**0,2**															
19.G.soricina	10,9	16,5	15,7	17,1	10,9	11,3	10,4	11,3	8,5	8,8	7,8	8,0	10,1	6,6	8,2	8,1	7,5	7,6	**0,6**														
20.Lbrasiliense	12,8	18,5	16,9	16,4	10,9	11,8	11,1	12,7	9,6	9,5	9,2	9,2	11,0	7,6	9,5	9,5	11,6	11,8	8,2	**0,0**													
21.L.silvicola	11,8	18,5	17,4	16,0	10,8	13,4	12,3	13,0	9,6	9,6	8,9	9,3	10,1	7,5	8,8	8,8	11,2	11,2	8,7	3,9	-												
22.Mcrenulatum	12,0	17,1	14,9	14,6	9,7	10,6	9,9	9,4	9,2	9,2	8,1	8,7	11,1	7,6	8,4	8,4	9,6	9,7	7,8	9,0	8,6	-											
23.M.minuta	14,0	19,0	18,1	17,3	12,3	12,5	12,3	12,0	11,0	11,0	9,9	10,5	12,2	7,4	10,0	9,9	10,7	10,8	10,3	9,1	9,3	10,5	-										
24.Mschmidtorum	14,0	19,0	18,1	17,3	12,3	12,5	12,3	12,0	11,0	11,0	9,9	10,5	12,2	7,4	10,0	9,9	10,7	10,8	10,3	9,1	9,3	10,5	0,0	-									
25.Pdiscolor	12,1	16,8	15,8	14,4	8,9	10,0	9,1	9,5	8,1	8,2	7,5	7,5	10,7	6,6	8,7	8,7	9,7	9,9	7,5	9,1	9,1	5,8	9,9	9,9	**1,9**								
26.P.hastatus	12,5	16,3	15,6	15,2	9,7	10,6	10,1	10,6	9,0	9,0	7,9	8,2	9,4	5,2	7,7	7,7	9,0	9,1	7,1	7,9	7,5	5,5	9,4	9,4	3,3	**1,9**							
27.Pstenops	13,8	18,0	17,6	16,7	10,1	11,7	11,4	11,7	10,3	10,3	9,6	10,0	10,8	7,2	8,8	8,8	11,6	11,6	9,3	9,5	8,8	8,1	10,9	10,9	6,1	5,3	-						
28.S.lilium	12,8	17,6	16,1	15,4	12,2	12,4	11,2	10,9	9,6	9,7	8,8	9,3	9,8	5,7	7,6	7,6	8,9	8,9	7,6	8,7	7,3	7,3	8,8	8,8	8,2	7,1	8,5	**0,8**					
29.Tbidens	11,8	16,4	16,6	13,8	9,2	10,8	9,9	11,3	10,9	11,0	10,0	10,5	11,9	6,0	10,2	10,1	9,8	9,8	8,3	9,7	8,3	7,0	9,8	9,8	6,5	6,8	8,1	7,4	-				
30.Tcirrhosus	11,5	16,8	15,8	17,0	10,1	11,0	9,3	10,8	9,1	9,2	8,8	8,6	12,0	7,2	10,2	10,2	9,7	9,7	8,5	9,3	9,5	7,3	10,7	10,7	6,7	5,7	8,4	9,2	7,5	-			
31.D.youngii	13,7	18,6	17,5	17,2	11,3	12,9	13,5	13,9	12,3	12,3	11,5	12,0	14,1	9,5	13,0	13,0	10,4	10,6	10,0	10,7	9,8	11,1	11,4	11,4	9,6	7,9	10,2	10,7	10,2	10,5	-		
32.D.rotundus	16,3	19,6	19,4	18,5	15,7	14,8	16,7	15,5	11,7	11,7	10,6	11,2	14,9	9,2	10,8	10,9	13,1	13,4	12,2	11,7	12,2	12,0	10,4	10,4	11,7	10,4	12,3	11,3	13,1	13,1	7,6	**1,1**	
33.B.tridactylus	18,9	21,9	20,5	20,9	17,4	16,8	17,7	16,4	16,9	17,0	16,3	16,6	18,8	14,3	15,9	15,8	18,0	18,0	15,4	15,1	15,6	17,6	18,0	18,0	17,7	16,8	17,2	16,1	16,6	18,4	18,7	18,6	

APÊNDICE B - Matriz de divergência genética gerada para os morcegos coletados na APA do Inhamum a partir do algoritmo de Tamura 3 – Parâmetros baseada no gene COI. Os números em negrito na diagonal representam os valores de divergência intraespecífica

ESPÉCIES		DIVERGÊNCIA (%)																									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1	*C. perspicillata*	**0,7**																											
2	*G. soricina*	20,2	**1,0**																										
3	*D. cinerea*	19,0	21,6	**0,1**																									
4	*D. rotundus*	25,1	29,0	27,1	**2,6**																								
5	*P. discolor*	21,5	23,0	19,4	25,2	**9,3**																							
6	*L. brasiliense*	19,7	24,4	20,2	24,2	20,3	**0,2**																						
7	*A. lituratus*	18,4	21,2	11,8	26,5	21,0	20,2	**0,4**																					
8	*M. minuta*	22,0	23,5	22,8	26,1	22,5	23,0	21,5	-																				
9	*M. schmidtorum*	21,5	23,5	22,5	25,6	22,2	22,5	21,2	0,3	-																			
10	*P. hastatus*	21,6	24,0	19,5	24,5	14,0	21,0	22,3	25,1	25,1	-																		
11	*L. silvicola*	20,6	24,9	20,8	25,3	21,0	18,3	21,5	24,8	24,3	23,3	**0,0**																	
12	*A. obscurus*	19,8	22,0	13,8	28,0	21,6	20,9	5,3	22,6	22,4	23,6	21,7	**0,0**																
13	*D. youngii*	22,5	26,4	24,9	20,5	23,5	23,2	23,5	26,1	25,6	24,7	24,9	24,9	-															
14	*D. gnoma*	18,5	21,4	0,4	26,7	19,6	19,9	11,8	22,6	22,3	20,1	20,5	13,9	25,5	-														
15	*A. planirostris*	18,9	20,9	12,1	26,9	21,1	20,0	2,0	21,1	20,8	21,8	22,1	5,0	24,2	12,1	**3,6**													
16	*M. nigricans*	22,8	24,8	24,1	28,5	22,9	24,0	24,8	23,6	24,2	24,6	26,3	25,2	28,2	23,9	24,6	**9,9**												
17	*P. fusciventris*	22,0	21,5	17,9	22,1	21,1	19,1	16,5	24,4	23,9	21,8	21,5	17,8	20,5	17,6	16,2	25,0	-											
18	*R. pumilio*	22,2	21,0	21,6	29,6	22,5	21,8	20,6	22,2	21,7	23,4	25,3	21,1	27,6	21,4	20,3	26,9	22,1	**0,5**										
19	*L. blossevillii*	25,6	27,3	24,7	29,5	25,8	26,9	23,8	25,4	25,4	25,4	26,8	23,0	30,4	24,7	24,0	22,4	26,2	24,9	**2,0**									
20	*N. laticaudatus*	23,4	27,2	24,3	27,8	23,3	24,0	23,5	25,9	25,3	28,9	23,5	24,1	25,8	24,4	23,1	24,3	24,2	24,5	26,4	**0,4**								
21	*R. fischerae*	22,0	20,8	21,4	29,7	22,3	21,8	20,6	22,3	21,8	23,1	25,5	21,1	27,4	21,2	20,3	26,8	22,1	0,4	24,8	24,2	**0,1**							
22	*L. ega*	25,6	23,4	25,3	32,4	26,8	24,5	26,3	26,2	25,7	28,8	26,7	27,4	30,9	25,4	26,7	24,1	25,9	25,0	22,2	24,8	25,2	**0,7**						
23	*A. fimbriatus*	18,8	21,4	12,0	26,3	21,1	20,2	0,6	21,8	21,5	22,2	21,8	5,2	23,8	12,0	2,1	24,9	16,4	20,8	24,0	23,6	20,8	26,4	**0,9**					
24	*R. naso*	26,6	29,3	25,0	26,5	25,5	27,5	23,9	27,0	26,7	23,3	24,2	23,9	24,1	25,3	24,1	27,0	22,9	24,8	29,6	26,2	24,7	29,1	23,9	-				
25	*M. rufus*	21,0	21,8	23,0	26,4	24,0	24,1	22,9	24,8	24,3	24,9	22,6	25,8	26,6	23,6	22,6	20,7	23,4	24,3	23,7	16,4	24,3	24,0	23,3	25,3	**0,9**			
26	*G. crenulatum*	21,5	23,2	19,2	29,1	17,6	18,8	22,2	23,5	23,5	17,6	22,2	23,9	21,9	19,3	22,5	23,8	18,3	20,4	26,5	23,6	20,2	25,4	22,6	25,8	24,2	-		
27	*P. stenops*	23,2	28,3	24,1	26,6	23,3	22,5	22,1	23,9	23,9	21,5	23,1	22,9	25,1	23,8	21,8	25,3	22,9	25,3	28,2	23,8	25,1	27,0	22,4	27,0	23,5	24,3	-	
28	*T._bidens*	19,2	24,4	18,5	23,7	20,4	15,8	19,9	23,2	22,6	23,2	21,5	19,4	24,2	18,2	19,1	25,2	17,0	21,6	26,2	23,4	21,8	25,3	20,1	25,3	23,4	18,7	21,4	

APÊNDICE C - Fotografias ilustrando rede armada no campo de coleta, processamento de morcegos no laboratório e a caixa contendo os tecidos acondicionados.

APÊNDICE D - Fotografias de morcegos coletados da APA do Inhamum.

Molossus rufus

Artibeus lituratus

Medição de antebraço de *Tonatia bidens* com auxílio de paquímetro manual.

Lasiurus blossevillii, também conhecido como yellow-bat.

Carollia perspicillata

Desmodus rotundus

ANEXOS

ANEXO A - Descrição dos protocolos de extração de DNA, amplificação via PCR e da reação de sequenciamento.

Análises Genéticas

A partir do tecido muscular retirado dos animais, procedeu-se com o processo de extração do DNA total por meio do kit da Promega e do protocolo fenol/clorofórmio modificado por Sambrook e Russel (2001). O protocolo de fenol clorofórmio adaptado para microtubos de 1,5 ml consistiu das seguintes etapas:

- Adicionar 20 mg de tecido muscular em um microtubo de 1,5 ml;
- Adicionar 600 µl de tampão de lise 5 µl de RNAse. Incubar por 40 minutos a 37º C na estufa;
- Adicionar 15 µl de proteinase K e agitar delicadamente os tubos em um agitador, a uma temperatura de 55º C por 30 minutos; deixar esfriar até a temperatura ambiente;
- Adicionar 700 µl de fenol-clorofórmio-álcool-isoamil a uma concentração de 25:24:1, para precipitação de proteínas. Os tubos foram agitados delicadamente por cerca de 10 minutos;
- Centrifugar a 10.000 rotações por minutos (rpm) por 10 minutos;
- Transferir cuidadosamente a camada superior formada após a centrifugação para um novo tubo de 1,5 ml;
- Adicionar 700 µl de clorofómio-álcool-isoamílico a uma concentração de 24:1 e agitar delicadamente por 10 minutos;
- Centrifugar a 10.000 rpm por mais 10 minutos;
- Transferir a camada sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml;
- Adicionar 100 µl de acetato de sódio (AcNa) 3M pH 4.8 e 700 µl de isopropanol (100%) para precipitação do DNA. A mistura foi agitada gentilmente até a visualização da nuvem de DNA;
- A mistura foi congelada a uma temperatura de -20º por no mínimo uma hora;
- Após o congelamento, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm e descartou-se o material sobrenadante cuidadosamente para não perder o *pellet* de DNA precipitado;
- Adicionar 200 µl de etanol a 70% e centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente para não perder o *pellet* de DNA;

Colocar o tubo aberto na estufa a 37º C por cerca de 30 minutos, para a completa evaporação do álcool;

- Adicionar 25 µl de água de injeção para hidratar;

O DNA foi visualizado em gel de agarose a 1% (50mg de agarose/50ml de tampão de TBE 1X) em uma proporção de 3µl do tampão (azul de bromofenol e xilenocianol) para 5 µl de DNA.

Amplificações via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Primers específicos foram usados para isolar e amplificar o gene rRNA16S e Citocromo Oxidase Subunidade 1 (CO1) a partir do DNA total. A PCR foi realizada com um volume final de 25 µl usando os seguintes reagentes:

- ✓ 4µl de DNTPs (1,25M) (nucleotídeos);
- ✓ 2,5 µl de solução tampão (10X);
- ✓ 0,5 µl de solução de $MgCl_2$;
- ✓ 1 µl de DNA (250ng/µl);
- ✓ 0,2 µl da enzima Taqpolimerase (5u/µl);
- ✓ 0,25 µl de cada primer (200 ng/µl);
- ✓ Água de injeção para completar o volume final da reação.

O processo de amplificação ocorreu em um termociclador e o protocolo para amplificação do gene rRNA 16S consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 30 ciclos com os seguintes parâmetros: 94°C por um minuto (Desnaturação), 50°C por um minuto (Anelamento) e 72°C por dois minutos (Extensão) e extensão final, a 72°C por sete minutos. O protocolo de amplificação para o gene COI (Citocromo Oxidase Subunidade 1) consistiu de 35 ciclos com os seguintes parâmetros: 94°C por 45 segundos (Desnaturação), 50°C por um minuto (Anelamento) e 72°C por um minuto (Extensão). Inicialmente ocorreu um ciclo de desnaturação de cinco minutos a 94°C e no final uma extensão de cinco minutos a 72°C. Os produtos das PCRs foram visualizados em minigel de agarose a 1%

Reação de Sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados com o uso da enzima ExoSap- IT (USB Corporation)conforme fabricante e submetidos à reação de sequenciamento de DNA segundo o método de Sanger et al. (1977). Para reação de sequência foram utilizados: 4µl de H2O, 1,5µl de Buffer, 2µl de Primer (0,8 pmol/µl), 1,5µl de DNA e 1µl de Big Dye. As reações de sequenciamento foram realizadas em uma placa com 96 poços, utilizando-se um termocicladore um programa com os seguintes ciclos: 35 ciclos de 96°C por 60 segundos,

96°C por 15 segundos, 60°C por quatro minutos. Após a reação de sequência, as amostras foram precipitadas para a retirada do excesso de reagentes não incorporados. De acordo com o protocolo descrito abaixo:

- ✓ Submissão da placa a um spin (centrífuga de placa);
- ✓ Adição de 2,5µl de EDTA (125 mM);
- ✓ Vedação da placa e ação de um spin;
- ✓ Adição de 30µl de Etanol 100%;
- ✓ Vedação da placa e mistura-se com inversão 4-5x;
- ✓ Envolvimento da placa em papel alumínio e deixar em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos (centrífuga refrigerada 4º C);
- ✓ Centrifugação a 4.000 rpm por 30 minutos;
- ✓ Inversão brusca da placa para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente;
- ✓ Centrifugação da placa invertida por 15 segundos a 1.150 rpm;
- ✓ Adição de 30µl de Etanol a 70%;
- ✓ Vedação da placa;
- ✓ Centrifugação a 3.440 rpm por 15 segundos (centrífuga refrigerada 4º C);
- ✓ Inversão brusca para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente;
- ✓ Centrifugação da placa invertida por 1 minuto a 1.150 rpm;
- ✓ Deixar a placa na estufa a 37º C por aproximadamente 10 minutos para evaporar o excesso de álcool;
- ✓ Adição de Formamida (10µl) e levar a placa a 94º C por cerca de 3 minutos e coloca-la no sequenciador automático de DNA (ABI 3500/Life Technologies) onde ocorrerá a eletroforese.

ANEXO B - Protocolo do Laboratório de virologia da Universidade Estadual do Maranhão/UEMA, para realização do Teste de Imunofluorescência direta.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CENTRO DE MEDICINA VETERINÁRIAS
NÚCLEO DE ESTUDOS EM ZOONOSE

TÉCNICA DE PREPARO DE 01 LÂMINA PARA LEITURA ATRAVÉS DA IFD
01 Lâmina x 0,03 mL (30 µm) = 0,03 mL
0,03 x 5 = 0,006mL (Conjugado + SST)
0.006 x 4 = 0,024 mL (CVS ou CCN)

0,006 + 0,024 = 0,03mL ou 30 µm - CVS

0,006 + 0,024 = 0,03mL ou 30 µm - CCN

Diluição (150)
1 :5
150 /5 = 30
1: 30 = 1+29

0,006 x **02 impressões lâmina = 0,012 mL ou 12 µm (Conjugado + SST)**
0,012 / 30 = 0,0004 mL ou **0,4 µm (Conjugado)**
0,0004 x 29 = 0,0116 mL ou 12 **µm (Conjugado + SST)**
Então:
0,0004 + 0,116 = 0,012 **mL ou 12 µm (Conjugado + SST)**

RESUMO

Para 01 lâmina:

- 0,03mL ou 30 **µm - CVS**
- 0,03mLou **30 um - CCN**
- 0,0004 mL ou **0,4 µm – Conjugado**
- 0,0116mLou **11,6 µm- SST**

TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

- Colocar na acetona por 30 MIN.
- Retirar da acetona e colocar para secar.
- Colocar o conjugado e CVS/CCN.

- Colocar na estufa por 30 MIN.
- Colocar na câmara unida por 10 MIN.
- Lavar com SST 2x, sendo que, na segunda vez, deixar por 10 MIN;
- Lavar 2x com água destilada;
- Colocar para secar;
- Gotejar glicerina
- Colocar lamínula;
- Leitura.