

## **Caracterização genética populacional de *Carollia perspicillata* (Chiroptera: Phyllostomidae)**

**TUANE LETÍCIA CARVALHO<sup>1</sup>; LEONARDO CARREIRA TREVELIN<sup>2</sup>; JULIANA CORDEIRO<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [tuane.lfc@hotmail.com](mailto:tuane.lfc@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal do Pará / Museu Paraense Emílio Goeldi – [leotrevelin@hotmail.com](mailto:leotrevelin@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [tuane.lfc@hotmail.com](mailto:tuane.lfc@hotmail.com)

### **1. INTRODUÇÃO**

A crise da biodiversidade, relacionada a elevadas taxas de extinção de espécies, sobretudo devido a pressões antrópicas, ressalta o problema do impedimento taxonômico, uma vez que o número de taxonomistas é reduzido quando comparado com o elevado número de espécies a serem descritas. No ritmo de extinção atual, muitas espécies serão perdidas antes mesmo que sejam conhecidas e que medidas para protegê-las sejam adotadas (BUTCHART *et al.*, 2010). A delimitação e descrição das espécies é um ponto crucial para compreensão da biodiversidade, contudo é um processo demorado e minucioso. Idealmente, busca-se que as descrições sejam realizadas em uma abordagem integrativa, incorporando múltiplos aspectos como filogeografia, morfologia comparativa, ecologia e comportamento (DAYRAT, 2005; WILL *et al.*, 2005). Na prática, entretanto, a maioria dos taxonomistas utiliza principalmente aspectos morfológicos nesse contexto.

O uso de sequências de DNA que auxiliem na discriminação de espécies vem se mostrando uma ferramenta de grande auxílio na taxonomia morfológica nos últimos anos. Segundo Hebert *et al.* (2004), o uso destas técnicas tem sido eficaz na delimitação de espécies identificadas como espécies crípticas e/ou que pertencem a um complexo de espécies. O conceito de espécie críptica é entendido como um grupo de espécies que são morfológicamente idênticas, isoladas reprodutivamente e muito frequentemente simpátricas. Neste conceito enquadram-se as espécies do gênero *Carollia* sp. (Chiroptera: Phyllostomidae). Este gênero é composto por morcegos de pequeno a médio porte, com hábitos frugívoros, que se encontram amplamente distribuídos desde o México até o norte da Argentina, incluindo Brasil e Paraguai (PAVAN *et al.*, 2011). Atualmente o gênero inclui oito espécies: *C. benkeithi*, *C. brevicauda*, *C. castanea*, *C. manu*, *C. monohernandezii*, *C. perspicillata*, *C. sowelli* e *C. subrufa* (VELAZCO *et al.*, 2013). A taxonomia deste gênero tem sido um desafio para muitos especialistas, visto que a morfologia dos principais caracteres diagnósticos apresentam variação fenotípica populacional (JARRIN *et al.*, 2011).

*Carollia perspicillata* e *C. brevicauda* são espécies irmãs mais amplamente distribuídas do seu gênero, e de fundamental importância para os processos de regeneração de florestas tropicais, visto que são dispersores de sementes de plantas pioneiras. Estas duas espécies são caracterizadas por apresentarem baixa divergência genética interespecífica (VELAZCO, 2013). Estudos recentes justificam esta baixa variabilidade à uma origem recente com distribuição simpátrica dentro da região da Amazônia (HOFFMAN; BAKER, 2003; PAVAN *et al.*, 2011). Devido ao desafio que tem sido distinguir corretamente *C. brevicauda* e *C. perspicillata*, este trabalho tem como objetivo determinar a eficiência da análise

de rede de haplótipos para auxiliar a identificação e delimitação destas duas espécies crípticas.

## 2. METODOLOGIA

Amostras de tecidos (bíceps ou pedaço da asa) dos espécimes de *Carollia* sp. aqui analisados foram obtidas em coletas realizadas em sete localidades dos estados do Pará e Maranhão, representando uma porção da área de distribuição simpátrica de *C. perspicillata* e *C. brevicauda* na Amazônia. A coleta e a identificação prévia dos espécimes foram realizadas pela equipe de pesquisadores do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), coordenada por LCT. As amostras foram preservadas em álcool absoluto e armazenadas em freezer.

Para isolamento do DNA total, foi utilizado o kit de extração *DNeasy® Blood and Tissue* (Qiagen), seguindo o protocolo padrão informado pelo fabricante. O fragmento do gene mitocondrial *citocromo oxidase I* (*COI*) foi amplificado utilizando o par de *primer* universal LCO1490 e HCO2198 (FOLMER et al, 1994). As amplificações foram feitas por PCR em um volume final 25ul usando aproximadamente 150ng de DNA, 0,6mM de cada *primer*, 1U de *Taq DNA polymerase recombinant* (Invitrogen), 0,4mM de cada dNTP, 1X de tampão e 3mM de MgCl<sub>2</sub>. O programa de PCR seguiu as seguintes etapas: 5min de desnaturação a 95°C, 35 ciclos de 1min a 95°C (etapa de desnaturação), 1min à 50°C (etapa de extensão), finalizando com uma etapa de alongação de 5min à 72°C. Os amplicons foram conferidos em gel de agarose 1%, corados com GelRed (Biotium). As amostras positivas para o tamanho de aproximadamente 700pb foram purificadas seguindo o protocolo do *kit Illustra™ GFX™ DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). As amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa Macrogen (<http://dna.macrogen.com/eng/>). Ambas as fitas (*forward* e *reverse*) foram sequenciadas.

A qualidade dos cromatogramas do sequenciamento foi verificada com o programa FinchTV v1.4.0 (Geopiza, Inc.). As sequências consenso foram montadas com auxílio do pacote de programas Stadem Package (STADEM, 1996), e o alinhamento das sequências com a ferramenta ClustalW (HIGGIS et al, 1994) contida no programa MEGA6 (TAMURA et al, 2013). Para evitar o uso nas análises de cópias de DNA mitocondrial presentes no genoma nuclear (NUMT's), as sequências utilizadas foram analisadas de duas formas: identificação de amostras que apresentavam tamanho esperado de 700pb do amplicon e ausência de *stop* códons. As estimativas de diversidade genética foram calculadas no programa DnaSP5.19 (LIBRADO e ROZAS, 2009). A rede de haplótipos foi construída usando o algoritmo median-joining no programa Network (BANDELT et al, 1999).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 43 sequências de *COI* de *Carollia* sp. todas com tamanho amplificado próximo do esperado de 700pb. As sequências analisadas não apresentaram *stop* códon, sendo que a matriz de dados finalizou com um tamanho total de 666pb e 41 sítios polimórficos, sendo 12 parcimoniosamente informativos e 29 mutações únicas (*singletons*). Foram encontrados 29 haplótipos representando uma diversidade haplotípica (*Hd*) de 0,9502 e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,00607.

A análise de rede de haplótipos (Figura 1) revelou a formação de dois agrupamentos principais, conectados por alguns haplótipos não amostrados e

alguns poucos passos mutacionais. O grupo I é formado por haplótipos presentes nas amostras da ReBio Gurupi Norte, ReBio Gurupi Sul, Moju, Tailândia, Paragominas, Nova Ipixuna e Vizeu. O grupo II é formado por haplótipos presentes em amostras da ReBio Gurupi Norte, Tailândia, Paragominas e Vizeu.

Houve compartilhamento de haplótipos entre as populações de ReBio Gurupi Norte, Paragominas, Tailândia e Vizeu. Dentro de cada grupo verificou-se o compartilhamento de haplótipos entre indivíduos de diferentes localidades, totalizando cinco haplótipos compartilhados.

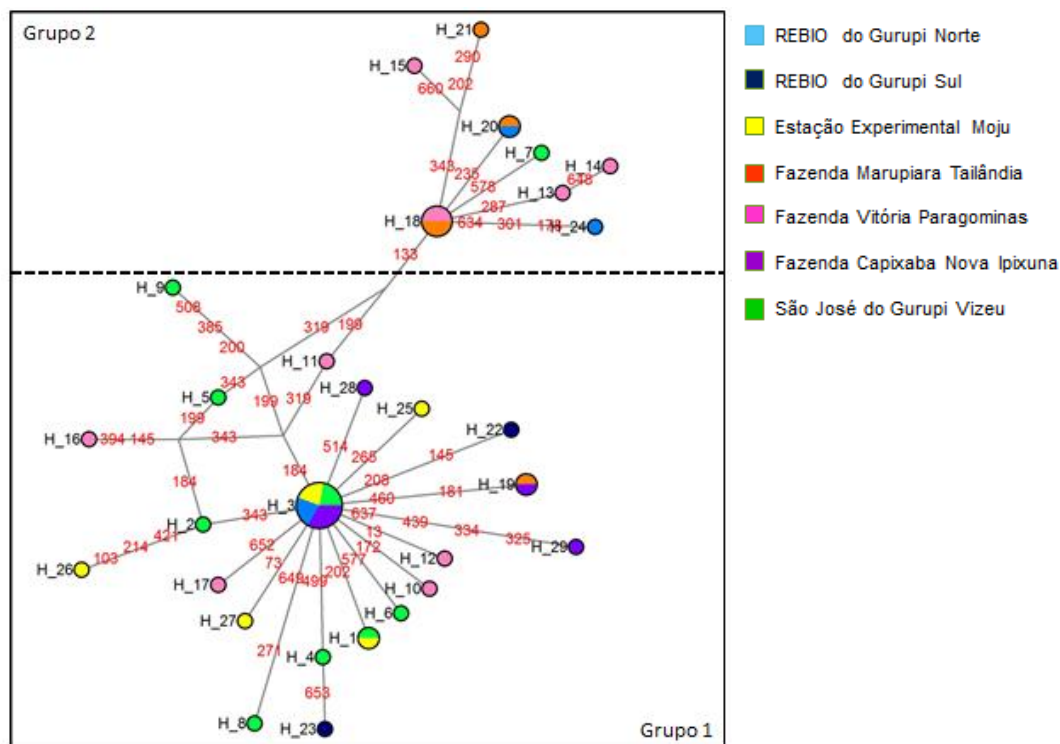


Figura 1 - Rede de haplótipos construída usando o algoritmo median-joining no programa Network. Os círculos representam diferentes haplótipos, os diâmetros são proporcionais à frequência dos haplótipos.

## 4. CONCLUSÕES

Nessa análise inicial, as nossas sequências aparentemente demonstraram uma estruturação populacional representado por dois grandes agrupamentos de haplótipos. Além disso, parece existir fluxo gênico entre as populações representado pelo compartilhamento de haplótipos por indivíduos de uma mesma população. Apesar disso, não foi possível delimitar *C. perspicillata* de *C. brevicauda*, por esta metodologia.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

Higgins D., Thompson J., Gibson T. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, **Nucleic Acids**, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

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

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

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

PAVAN, A. C. et al. Patterns of diversification in two species of short-tailed bats (*Carollia* Gray, 1838): the effects of historical fragmentation of Brazilian rainforests. **Biological Journal of the Linnean Society**, n. 102, p. 527-539, 2011.

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

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