SECRETARIA DE ESTADO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
CAMPUS DE NOVA XAVANTINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

Evolução molecular de espécies do gênero *Eptesicus* (Chiroptera:Vespertilionidae)

Manassés da Silva Borges

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* de Nova Xavantina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Fabricius Maia Chaves Bicalho Domingos
Coorientador: Prof. Dr. Joaquim Manoel da Silva

Nova Xavantina-MT
Junho, 2023

SECRETARIA DE ESTADO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
CAMPUS DE NOVA XAVANTINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

Evolução molecular de espécies do gênero *Eptesicus* (Chiroptera:Vespertilionidae)

Manassés da Silva Borges

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* de Nova Xavantina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Fabricius Maia Chaves Bicalho Domingos
Coorientador: Prof. Dr. Joaquim Manoel da Silva

Nova Xavantina-MT
Junho, 2023

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)

This study was partially funded by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazilian Ministry of Education)

Walter Clayton de Oliveira CRB 1/2049

BORGES, Manassés Da Silva.
B732e Evolução Molecular de Espécies do Gênero Eptesicus (Chiroptera: Vespertilionidae)Taxas de Evolução Molecular do Genoma Mitocondrial de Vespertilionidae e Descrição de Quatro Mitogenomas Completos e Inéditos do Gênero Eptesicus (Chiroptera: Vespertilionidae) / Manassés da Silva Borges – Nova Xavantina, 2023.
62 f.; 30 cm. (ilustrações) Il. color. (sim)

Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação/Mestrado) – Curso de Pós-graduação Stricto Sensu (Doutorado) Ecologia e Conservação, Faculdade de Ciências Agrárias Biológicas e Sociais Aplicadas, Câmpus de Nova Xavantina, Universidade do Estado de Mato Grosso, 2023.
Orientador: Fabricius Maia Chaves Bicalho Domingos
Coorientador: Joaquim Manoel da Silva

1. Genoma Mitocondrial. 2. Mammalia. 3. Taxas de Substituição. I. Manassés da Silva Borges. II. Evolução Molecular de Espécies do Gênero Eptesicus (Chiroptera: Vespertilionidae): Taxas de Evolução Molecular do Genoma Mitocondrial de Vespertilionidae e Descrição de Quatro Mitogenomas Completos e Inéditos do Gênero Eptesicus (Chiroptera: Vespertilionidae).
CDU 599.4

TERMO DE APROVAÇÃO

Evolução molecular de espécies do gênero *Eptesicus* (Chiroptera:Vespertilionidae)

Manassés da Silva Borges

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Universidade do Estado de Mato Grosso - *Campus* de Nova Xavantina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Aprovado em [dia] de [mês por extenso] de [ano].

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Fabricius Maia Chaves Bicalho Domingos (Orientador)
Universidade Federal do Paraná

_____

Profa. Dra. Maria Clara Nascimento (Membro titular-Externo)
Universidade Federal de Minas Gerais

_____

Prof. Dr. Juan Pablo Zurano (Membro titular)
Instituto de Biología Subtropical

_____

Profa. Dr. Dilermando Lima (Membro suplente)
Universidade Federal de Mato Grosso

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 13
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL 20
CAPÍTULO 1 24
Taxas de evolução molecular do genoma mitocondrial de Vespertilionidae e descrição de quatro mitogenomas completos e inéditos do gênero *Eptesicus* (Chiroptera: Vespertilionidae) 24
2. MATERIAL E MÉTODOS 28
2.1. Táxons analisados 28
2.2. Extração, purificação, quantificação e sequenciamento 28
2.3. Montagem do genoma mitocondrial 29
2.4. Análise filogenética e estimativa das taxas de mutação 30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 32
4. CONCLUSÃO 46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas marcantes dos morcegos do gênero *Eptesicus* ……2

Figura 2. Exemplar de *Eptesicus brasiliensis* pertencente à família Vespertilionidae. 22

Figura 3. Exemplar de *Eptesicus diminutus* pertencente à família Vespertilionidae. 23

Figura 4. Exemplar de *Eptesicus furinalis* pertencente à família Vespertilionidae. 26

Figura 5. Exemplar de *Eptesicus nilssonii* pertencente à família Vespertilionidae. .....……29

Figura 6. Árvore filogenética da família Vespertilionidae. .....……32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies válidas de morcegos do gênero *Eptesicus* e suas ocorrências de acordo com as regiões biogeográficas mundiais 6

Tabela 2. Características gerais do genoma mitocondrial de *Eptesicus brasiliensis* .....….. 20

Tabela 3. Características gerais do genoma mitocondrial de *Eptesicus diminutus* .....……. 21

Tabela 4. Características gerais do genoma mitocondrial de *Eptesicus furinalis* .....…….. 22

Tabela 5. Taxa de mutação encontrado do gênero *Eptesicus* .....…….. ……24

Tabela 6. Características gerais do genoma mitocondrial de *Eptesicus nilssonii* .....…….. 24

Tabela S1. Link de acesso Genbank para os genomas mitocondriais de morcegos Vespertilionidae .....…….....…….....…….

RESUMO

Dados moleculares constituem, atualmente, fontes importantes de informações para reconstrução da história evolutiva de diferentes organismos. As relações filogenéticas reconstruídas a partir de dados genéticos podem contribuir profundamente para aprimorar a inferência de padrões macroecológicos e biogeográficos, provendo as informações necessárias para testes de hipóteses robustos utilizando métodos de biologia comparada. O objetivo principal deste trabalho foi investigar as taxas de evolução molecular do genoma mitocondrial da família Vespertilionidae, valendo-se da descrição de quatro genomas mitocondriais inéditos de espécies do gênero *Eptesicus*. Assim, descrevemos os genomas mitocondriais completos de quatro espécies de *Eptesicus*: *Eptesicus brasiliensis, Eptesicus diminutus, Eptesicus furinalis* e *Eptesicus nilssonii*. Em relação ao tamanho dos mitogenomas descritos, o morcego *Eptesicus brasiliensis* resultou em um comprimento total de 16.864 bp, *Eptesicus diminutus* com comprimento de 17.027 bp, *Eptesicus furinalis* com comprimento de 16.838 bp e *Eptesicus nilssonii* com comprimento de 17.009 bp. O genoma mitocondrial de *Eptesicus brasiliensis* consiste em 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes de tRNA e dois genes de rRNA e uma região de controle (CR). Enquanto o genoma mitocondrial do *Eptesicus diminutus* consiste em 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes de tRNA, dois genes de rRNA e uma região de controle (CR). *Eptesicus furinalis* possui um mitogenoma com 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes de tRNA, dois genes de rRNA e uma região de controle (CR). O genoma mitocondrial de *Eptesicus nilssonii* possui 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes de tRNA, dois genes de rRNA e uma região de controle (CR). Os resultados indicam que a taxa de mutação média estimada nos genes codificantes foi de 0,01 mutações por sítio por milhão de anos, enquanto nos genes ribossomais foi de cerca de 0,007 mutações por sítio por milhão de anos. Foi observado que os genes ND5, ND6 e ND4 apresentaram maior taxa de mutação relativa, enquanto os genes ND4, ND6, ND1, ND2 e ND4L apresentaram maior taxa de relógio

molecular. Essas informações são importantes recursos para entender a evolução e diversificação dos morcegos da família Vespertilionidae, assim como possibilitar a elaboração de futuras pesquisas na área.

Palavras-chaves: genoma mitocondrial, mammalia, taxas de substituição.

ABSTRACT

Molecular data are currently important sources of information for reconstructing the evolutionary history of different organisms. Phylogenetic relationships reconstructed from genetic data can profoundly contribute to improving the inference of macroecological and biogeographical patterns, providing the necessary information for testing robust hypotheses using comparative biology methods. The main objective of this work was to investigate the rates of molecular evolution of the mitochondrial genome of the family Vespertilionidae, using the description of four unpublished mitochondrial genomes of species of the genus *Eptesicus*. Thus, we describe the complete mitochondrial genomes of four *Eptesicus* species: *Eptesicus brasiliensis*, *Eptesicus diminutus*, *Eptesicus furinalis* and Eptesicus nilssonii. Based on the size of the described mitogenomes, the bat *Eptesicus brasiliensis* resulted in a total length of 16,864 bp, *Eptesicus diminutus* with a length of 17,027 bp, *Eptesicus furinalis* with a length of 16,838 bp and *Eptesicus nilssonii* with a length of 17,009 bp. The mitochondrial genome of *Eptesicus brasiliensis* consists of 13 protein-coding genes, 22 tRNA genes and two rRNA genes, and a control region (CR). While the mitochondrial genome of Eptesicus diminutus consists of 13 protein-coding genes, 22 tRNA genes, two rRNA genes and a control region (CR). Eptesicus furinalis has a mitogenome with 13 protein coding genes, 22 tRNA genes, two rRNA genes and a control region (CR). The mitochondrial genome of Eptesicus nilssonii has 13 protein coding genes, 22 tRNA genes, two rRNA genes and a control region (CR). The results indicate that the estimated mean mutation rate in coding genes was 0.01 mutations per site per million years, while in ribosomal genes it was about 0.007 mutations per site per million years. It was observed that the ND5, ND6 and ND4 genes had a higher relative mutation rate, while the ND4, ND6, ND1, ND2 and ND4L genes had a higher molecular clock rates. These information are important resources to understand the evolution and diversification of bats of the Vespertilionidae family, and will also contribute to future research in the area.

Keywords: mitochondrial genome, Mammalia, substitution rates.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A ordem Chiroptera é a segunda maior entre os mamíferos, possuindo 1.448 espécies distribuídas em 21 famílias, representando cerca de 22% da diversidade de mamíferos em todo o planeta (MAMMAL DIVERSITY, 2022). Dentro da ordem Chiroptera existem duas subordens, Yinpterochiroptera e Yangochiroptera (TEELING et al., 2005). As características morfológicas dos quirópteros estão diretamente relacionadas aos nichos de forrageamento que ocupam (FREYGANG, 2006; REIS, 2007), o que também se reflete em uma ampla diversidade de dietas. De modo geral, as espécies de morcegos podem ser carnívoras, insetívoras, frugívoras, onívoras, piscívoras, hematófagas e nectarívoras (AGUIAR et al., 2016; REIS, 2007; SHI; RABOSKY, 2015; SILVA; PERACCHI, 1995). Os morcegos apresentam grande importância ecológica e são elementos fundamentais da biodiversidade em muitos ecossistemas, pois desempenham funções essenciais para a existências de outros organismos visto que, por voarem a longas distâncias, acabam dispersando as sementes de diversas espécies de plantas (EMILIANO et al., 2017; FUJITA, 1991; MULLER, 1992).

A família Vespertilionidae pertence à subordem Yangochiroptera, e apresenta uma grande diversidade de espécies, sendo a maior família em número de espécies da ordem Chiroptera (MAMMAL DIVERSITY DATABASE, 2022). A família se caracteriza por espécies de porte pequeno e majoritariamente de dieta insetívora (KUNZ et al., 2011). Nesta família, temos o gênero de morcegos insetívoros *Eptesicus*, descrito pelo naturalista e arqueólogo Constantine Samuel Rafinesque em 1820, sendo que atualmente são reconecidas 26 espécies descritas (MAMMAL DIVERSITY DATABASE, 2022). As espécies do gênero apresentam cauda longa, contida no uropatágio, raramente ultrapassando sua borda distal em uma vértebra, formando um “V” bem definido, não apresentando folha nasal e com focinho alongado (Figura 1). Caracterizam-se pela coloração variando de pardo-avermelhada a negra

no dorso e ventre em tons mais claros (REIS, 2007). Todos os morcegos do gênero possuem hábitos alimentares exclusivamente insetívoros (KEARNEY et al., 2002). Atualmente, espécies do gênero *Eptesicus* são encontradas em praticamente todo o globo, sendo ausentes apenas em regiões polares e algumas ilhas isoladas (JUSTE et al., 2013), atingindo uma grande diversidade na região Paleártica (IUCN, 2022; Tabela 1). No Brasil, há registro da ocorrência de cinco espécies, de tamanhos que podem variar de pequeno a médio, com antebraços variando de 30 a 50 mm (GARBINO et al, 2020). O gênero possui hábitos noturnos e são amplamente estudados devido à sua importância ecológica, como controladores de insetos.



Figura 1. Características morfológicas marcantes dos morcegos do gênero *Eptesicus*. (Fonte:https://www.ufrgs.br/faunadigitalrs/mamiferos/ordem-chiroptera/familia-vespetilionidae/morcego-borboleta-eptesicus-furinalis/)

Tabela 1. Espécies válidas de morcegos do gênero *Eptesicus* e suas ocorrências de acordo com as regiões biogeográficas mundiais. Fonte (IUCN, 2022)

Espécies	**Regiões Biogeográficas**
Eptesicus anatolicus (Felten,1971)	Paleártica
Eptesicus andinus (Jaallen, 1914)	Neotropical
Eptesicus bottae (Peters,1869)	Paleártica e Oriental
Eptesicus brasiliensis (Desmarest, 1819)	Neotropical
Eptesicus chiriquinus (Thomas, 1920)	Neotropical
Eptesicus diminutus (Osgood,1915)	Neotropical
Eptesicus floweri (De Winton, 1901)	Etiópica
*Eptesicus furinalis (*D'orbigny, 1847)	Neotropical e Neártica
Eptesicus fuscus (Palisot de Beauvois, 1796)	Neotropical e Neártica
Eptesicus gobiensis (Bobrinskoy, 1926)	Paleártica e Oriental
Eptesicus guadeloupensis (Genoways e Baker, 1975)	Neotropical
Eptesicus hottentotus (A. Smith, 1833)	Etiópica
Eptesicus innoxius (Gervais, 1841)	Neotropical
Eptesicus isabellinus (Temminck, 1840)	Paleártica
Eptesicus japonensis (Imaizumi, 1953)	Paleártica
Eptesicus langeri (Acosta, 2021)	Neotropical
Eptesicus nilssonii (Keyserling e Blasius, 1939)	Paleártica
Eptesicus ognevi (Bobrinskii, 1918)	Paleártica e Oriental
Eptesicus orinocensis (Ramírez-Chaves et al, 2021)	Neotropical
Eptesicus pachyomus (Tomes, 1857)	Paleártica e Oriental
Eptesicus pachyotis (Dobson, 1871)	Paleártica e Oriental
Eptesicus platyops (Thomas, 1901)	Etiópica
Eptesicus serotinus (Schreber, 1774)	Paleártica e Oriental
Eptesicus taddeii (Miranda, Bernardi e Passos, 2006)	Neotropical
Eptesicus tatei (Ellerman e Morrison-Scott, 1951)	Paleártica e Oriental
Eptesicus ulapesensis (Sánchez, 2019)	Neotropical

Os morcegos insetívoros representam cerca de 70% do número total das espécies de morcegos e desempenham um papel importante no combate às pragas e consequentemente influenciam positivamente a preservação ambiental (AGUIAR et al., 2021; AGUIAR; ANTONINI, 2008; KUNZ et al., 2011). Além disso, também agem como predadores de topo em sistemas de restauração, consumindo e reduzindo as quantidades de insetos herbívoros, diminuindo os danos foliares às árvores plantadas (KALKA; KALKO, 2006; MORRISON; LINDELL, 2012). As pragas de insetos são um grande problema também na agricultura e silvicultura (HILL, 2008; RICCUCCI; LANZA, 2018), e um dos serviços ecossistêmicos mais importantes de morcegos insetívoros é o controle de artrópodes herbívoros, incluindo insetos-praga (GHANEM; VOIGT, 2012; KUNZ et al., 2011). Ao longo dos últimos anos, foi dada especial atenção ao valor econômico dos morcegos na agricultura e silvicultura, também objeto de várias revisões sistemáticas (GHANEM; VOIGT, 2012; KASSO; BALAKRISHNAN, 2013; KUNZ et al., 2011), e uma das vantagens da presença dos morcegos insetívoros nas plantações incluem a diminuição dos custos de aplicações de pesticidas reduzindo o desenvolvimento de resistência a pesticidas (KUNZ et al., 2011; RICCUCCI; LANZA, 2018).

A evolução molecular das espécies do gênero *Eptesicus* tem sido objeto de estudos recentes para entender a diversidade e filogenia desses animais. O gênero possui uma história taxonômica complexa: por serem altamente diversos, e muito similares morfologicamente a seus gêneros irmão, por muito tempo suas espécies formaram um grupo parafilético, que só foi ajustado com o uso de filogenias moleculares (JONES et al., 2002; JUSTE et al., 2013). Além da importância intrínseca no reconhecimento das relações evolutivas entre os morcegos *Eptesicus,* análises filogenéticas modernas se tornaram um elemento central em diversas áreas da biologia, possibilitando a investigação de diferentes processos em escalas evolutivas, biogeográficas e ecológicas (UPHAM; ESSELSTYN; JETZ, 2019; WILKINSON; ADAMS, 2019).

As análises de dados moleculares foram particularmente úteis para esclarecer relações em Chiroptera, ajudando a decifrar arranjos morfológicos de difícil solução e desvendar diversidade críptica (BURGIN, 2018; MURRAY et al., 2012). A maioria das subdivisões tradicionais de morcegos vespertilionídeos foram baseadas principalmente em caracteres de crânio e dentais (Ruedi & Mayer 2001; Just et al 2013;Tate 1942; Koopman 1994), e as maiores mudanças em relação a esse gênero foram realizadas após a obtenção de dados moleculares, mudando marcadamente a estrutura taxonômica e a história evolutiva do gênero (AMADOR et al., 2018; JUSTE et al., 2013; ARTYUSHIN et al., 2009).

As espécies pertencentes à família Vespertilionidae apresentam pouca variação morfológica, tornando difícil o estabelecimento de hipóteses filogenéticas robustas dentro da família através do uso exclusivo da morfologia (JONES et al., 2002). Assim, a Biologia Molecular trouxe um grande conjunto de ferramentas que permitiu avançar em uma melhor compreensão da biodiversidade real dentro de alguns grupos de organismos. O gênero *Eptesicus*, dada a similaridade com outros gêneros de Vespertilionidae, e a sua ampla distribuição, ainda apresenta grandes incertezas taxonômicas (JUSTE et al., 2013) e muitas realocações genéricas aconteceram nos últimos anos. Por exemplo, na mais recente publicação que considerou todas as espécies descritas de mamíferos (BURGIN et al., 2018), constavam 27 espécies descritas do gênero. Em apenas três anos, as mudanças taxonômicas reduziram o número total de espécies para 25 espécies e, finalmente, para 26 espécies em 2022 (MAMMAL DIVERSITY, 2022, Tabela 1).

Como exemplo dessas mudanças no gênero, recentemente foram incluídas mais duas novas espécies, *Eptesicus ulapesensis* (SÁNCHEZ et al., 2019), endêmica da Argentina, e *Eptesicus langeri* (ACOSTA et al., 2021), endêmica da Bolívia. Já resultados baseados em análises de dados morfológicos e moleculares reconheceram a espécie *Eptesicus anatolicus*

Felten, 1971 como uma espécie distinta dentro do grupo de *Eptesicus bottae*, e também validaram a descrição das espécies *Eptesicus isabellinus* e *Eptesicus pachyomus* dentro do grupo de *Eptesicus serotinus* (JUSTE et al., 2013). Estudos examinando características baculares de vespertilionídeos propuseram subdividir o gênero *Eptesicus* em vários gêneros, excluindo os subgêneros *Vespadelus* e *Neoromicia* de dentro de *Eptesicus* (HILL; HARRISON, 1987). Com isso, algumas espécies anteriormente classificadas em *Eptesicus* sofreram realocações, como no caso das espécies *Eptesicus vulturnus*, *Eptesicus sagittula* e *Eptesicus regulus*, pertencentes agora ao gênero *Vespadelus*. Outro exemplo importante, *Rhyneptesicus nasutus*, anteriormente classificado como *Eptesicus*, teve este nome proposto primeiramente por BIANCHI (1917) para distinguir a espécie *Eptesicus nasutus* (VOLLETH; HELLER, 2009). Recentes estudos moleculares apoiaram a separação da espécie do gênero *Eptesicus* (AMADOR et al., 2018). Os caracteres morfológicos válidos que diferenciam o gênero *Rhyneptesicus* são as orelhas pontudas relativamente estreitas, tragus longos e pêlo relativamente curto (HILL; HARRISON, 1987; JUSTE et al., 2013).

Outras mudanças recentes em nível genérico também alteraram de forma importante a diversidade do gênero *Eptesicus*. *Cassistrellus dimissus* possui características morfológicas semelhantes às espécies de *Eptesicus*, e era até recentemente alocada ao gênero. Porém, estudos moleculares indicaram relação filogenética distante com outras espécies do gênero (FRANCIS et al., 2010; LACK et al., 2010). Para resolver a parafilia, foi proposto um novo gênero (*Cassistrellus*), visto que não havia nenhum gênero ou combinação disponível para esse epíteto (RUEDI et al., 2018). O novo gênero se assemelha a *Nyctalus*, *Philetor*, ou mesmo à espécie *Hypsugo joffrei*, devido à sua coloração marrom-castanha bastante uniforme, orelhas curtas e asas estreitas e pontudas. Esta espécie é aparentemente extremamente rara, e era anteriormente conhecida apenas pelo espécime-tipo capturado na península da Tailândia (RUEDI et al., 2018).

Outra característica marcante do gênero é o focinho particularmente curto e largo devido às glândulas faciais infladas, possuindo nas suas partes nuas de pele cor castanho rosado, não tão escuro quanto na maioria das espécies do gênero *Eptesicus*. Seu crânio foi a base para a criação de um grupo separado para *E. dimissus* (RUEDI et al., 2018), devido a presença de fossetas funda-fenóides profundas e bem definidas (também chamadas de fossetas basiais) situadas entre as cócleas. Esses poços estão ausentes ou rasos e mal delimitados em *Eptesicus*, mas bem desenvolvidos em gêneros como *Nyctalus*, *Hesperoptenus* e *Hypsugo*. Já a dentição de *Cassistrellus* é mais delicada do que em *Eptesicus* (RUEDI et al., 2018).

A alta diversidade da família Vespertilionidae faz com que a disponibilidade de dados genéticos seja deficiente, frente ao enorme número de espécies. Em particular, apesar dos esforços recentes concentrados na obtenção de maiores amostragens genômicas deste grupo, existem poucos dados de genomas mitocondriais completos disponíveis. Neste trabalho tivemos como objetivos principais investigar as taxas de evolução molecular do genoma mitocondrial (mitogenoma) da família Vespertilionidae, e descrever mitogenomas inéditos de algumas espécies do gênero *Eptesicus*. Geramos dados inéditos de quatro espécies de *Eptesicus* e descrevemos pela primeira vez os genomas mitocondriais completos de *Eptesicus brasiliensis*, *Eptesicus diminutus*, *Eptesicus furinalis* e *Eptesicus nilssonii*, além de inferir as taxas de evolução molecular do genoma mitocondrial de Vespertilionidae utilizando análises filogenéticas Bayesianas calibradas com fósseis. Nesta dissertação, a formatação do capítulo segue as normas padrão da ABNT, e esperamos submeter o artigo para o periódico *Molecular Phylogenetics and Evolution*.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ACOSTA, L. et al. A new species of Eptesicus (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae), from the sub-Andean Forest of Santa Cruz, Bolivia. v. 12, p. 391–409, 29 jul. 2021.

AMADOR, L. I. et al. Bat Systematics in the Light of Unconstrained Analyses of a Comprehensive Molecular Supermatrix. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 25, n. 1, p. 37–70, mar. 2018.

AMADOR, L. I. et al. Bat Systematics in the Light of Unconstrained Analyses of a Comprehensive Molecular Supermatrix. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 25, n. 1, p. 37–70, mar. 2018.

BISSON, I.-A.; SAFI, K.; HOLLAND, R. A. Evidence for Repeated Independent Evolution of Migration in the Largest Family of Bats. **PLOS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7504, 21 out. 2009.

BOAS, D. S. V. Bases moleculares de mutação gênica: mecanismos e classificação. **Revista Ceciliana**, n. 27, p. 79–92, 2007.

BOZINOVIC, F.; CALOSI, P.; SPICER, J. I. Physiological Correlates of Geographic Range in Animals. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, n. 1, p. 155–179, 2011.

BROCKERHOFF, E. G. et al. Forest biodiversity, ecosystem functioning and the provision of ecosystem services. **Biodiversity and Conservation**, v. 26, n. 13, p. 3005–3035, 1 dez. 2017.

CALOSI, P. et al. What determines a species' geographical range? Thermal biology and latitudinal range size relationships in European diving beetles (Coleoptera: Dytiscidae). **Journal of Animal Ecology**, v. 79, n. 1, p. 194–204, 2010.

CRYAN, P. M.; STRICKER, C. A.; WUNDER, M. B. Continental-scale, seasonal movements of a heterothermic migratory tree bat. **Ecological Applications**, v. 24, n. 4, p. 602–616, 2014.

DAVENPORT, M. P. et al. Rates of HIV immune escape and reversion: implications for vaccination. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 561–566, dez. 2008.

DENAMUR, E.; MATIC, I. Evolution of mutation rates in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 820–827, 2006.

GHANEM, S. J.; VOIGT, C. C. Chapter 7 - Increasing Awareness of Ecosystem Services Provided by Bats. In: BROCKMANN, H. J. et al. (Eds.). . **Advances in the Study of Behavior**. [s.l.] Academic Press, 2012. v. 44p. 279–302.

HAAG-LIAUTARD, C. et al. Direct Estimation of the Mitochondrial DNA Mutation Rate in Drosophila melanogaster. **PLOS Biology**, v. 6, n. 8, p. e204, 19 ago. 2008.

HEDENSTRÖM, A.; JOHANSSON, L. C. Bat flight. **Current Biology**, v. 25, n. 10, p. R399–R402, 18 maio 2015.

HILL, D. S. **Pests of Crops in Warmer Climates and Their Control**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2008.

HOOFER, S. R.; BUSSCHE, R. A. V. D. Molecular Phylogenetics of the Chiropteran Family Vespertilionidae. **Acta Chiropterologica**, v. 5, n. suppl, p. 1–63, jan. 2003.

KALKA, M.; KALKO, E. K. V. Gleaning bats as underestimated predators of herbivorous insects: diet of Micronycteris microtis (Phyllostomidae) in Panama. **Journal of Tropical Ecology**, v. 22, n. 1, p. 1–10, jan. 2006.

KASSO, M.; BALAKRISHNAN, M. Ecological and Economic Importance of Bats (Order Chiroptera). **ISRN Biodiversity**, v. 2013, p. e187415, 10 nov. 2013.

KIM, J. Y.; PARK, Y. C. Gene organization and characterization of the complete mitogenome of Hypsugo alaschanicus (Chiroptera: Vespertilionidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 16325–16331, 2015.

KIM, Y. M. et al. Complete mitochondrial genome of the Hodgson's bat Myotis formosus (Mammalia, Chiroptera, Vespertilionidae). **Mitochondrial DNA**, v. 22, n. 4, p. 71–73, 1 ago. 2011.

KUMAR, S.; SUBRAMANIAN, S. Mutation rates in mammalian genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 2, p. 803–808, 22 jan. 2002.

KUNZ, T. H. et al. Ecosystem services provided by bats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, p. 1–38, mar. 2011.

LUO, B. et al. Wing morphology predicts geographic range size in vespertilionid bats. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4526, 14 mar. 2019.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 11 fev. 1988.

MORRISON, E. B.; LINDELL, C. A. Birds and bats reduce insect biomass and leaf damage in tropical forest restoration sites. **Ecological Applications**, v. 22, n. 5, p. 1526–1534, 2012.

MURRAY, S. W. et al. Molecular phylogeny of hipposiderid bats from Southeast Asia and evidence of cryptic diversity. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 2, p. 597–611, 1 fev. 2012.

NORBERG, U. M.; RAYNER, J. M. V.; LIGHTHILL, M. J. Ecological morphology and flight in bats (Mammalia; Chiroptera): wing adaptations, flight performance, foraging strategy and echolocation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 316, n. 1179, p. 335–427, 16 set. 1987.

PEIXOTO, F. P.; VILLALOBOS, F.; CIANCIARUSO, M. V. Phylogenetic conservatism of climatic niche in bats. **Global Ecology and Biogeography**, v. 26, n. 9, p. 1055–1065, 2017.

PEREIRA, M. J. R.; PALMEIRIM, J. M. Latitudinal Diversity Gradients in New World Bats: Are They a Consequence of Niche Conservatism? **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69245, 23 jul. 2013.

PINZARI, C. A. et al. Analysis of Genomic Sequence Data Reveals the Origin and Evolutionary Separation of Hawaiian Hoary Bat Populations. **Genome Biology and Evolution**, v. 12, n. 9, p. 1504–1514, 1 set. 2020.

PLATT, R. N., II et al. Conflicting Evolutionary Histories of the Mitochondrial and Nuclear Genomes in New World Myotis Bats. **Systematic Biology**, v. 67, n. 2, p. 236–249, 1 mar. 2018.

RAWAT, U. S.; AGARWAL, N. K. Biodiversity: Concept, threats and conservation. **Environment Conservation Journal**, v. 16, n. 3, p. 19–28, 15 dez. 2015.

RICCUCCI, M.; LANZA, B. Bats and insect pest control: a review. v. 17, p. 161–169, 7 out. 2018.

SANJUÁN, R. et al. Viral Mutation Rates. **Journal of Virology**, out. 2010.

SNIEGOWSKI, P. D. et al. The evolution of mutation rates: separating causes from consequences. **BioEssays**, v. 22, n. 12, p. 1057–1066, 2000.
SPAdes – Centro de Biotecnologia Algorítmica. , [s.d.]. Disponível em: <http://cab.spbu.ru/software/spades/>. Acesso em: 2 mar. 2022

STADELMANN, B. et al. Molecular phylogeny of New World Myotis (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, n. 1, p. 32–48, abr. 2007.

VARZINCZAK, L. H.; MOURA, M. O.; PASSOS, F. C. Shifts to multiple optima underlie climatic niche evolution in New World phyllostomid bats. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 128, n. 4, p. 1008–1020, 6 dez. 2019.

VARZINCZAK, L. H.; MOURA, M. O.; PASSOS, F. C. Strong but opposing effects of climatic niche breadth and dispersal ability shape bat geographical range sizes across phylogenetic scales. **Global Ecology and Biogeography**, v. 29, n. 11, p. 1929–1939, 2020.

WIENS, J. J.; GRAHAM, C. H. Niche Conservatism: Integrating Evolution, Ecology, and Conservation Biology. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 36, n. 1, p. 519–539, 2005.

YOON, K. B.; PARK, Y. C. Short Communication Complete mitochondrial genome and codon usage of the Nepalese whiskered bat Myotis muricola (Vespertilionidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 14637–14645, 2015.

FRANCIS, C. M. et al. The Role of DNA Barcodes in Understanding and Conservation of Mammal Diversity in Southeast Asia. **PLOS ONE**, v. 5, n. 9, p. e12575, 3 set. 2010.

HILL, J. E.; HARRISON, D. L. The baculum in the Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) with a systematic review, a synopsis of Pipistrellus and Eptesicus, and the

descriptions of a new genus and subgenus. **Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology**, v. 52, p. 225–305, 30 jul. 1987.

JONES, K. E. et al. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 77, n. 2, p. 223–259, maio 2002.

JUSTE, J. et al. Phylogeny and systematics of Old World serotine bats (genus Eptesicus, Vespertilionidae, Chiroptera): an integrative approach. **Zoologica Scripta**, v. 42, n. 5, p. 441–457, 2013.

LACK, J. B. et al. Molecular phylogenetics of Myotis indicate familial-level divergence for the genus Cistugo (Chiroptera). **Journal of Mammalogy**, v. 91, n. 4, p. 976–992, 16 ago. 2010.

MURRAY, S. W. et al. Molecular phylogeny of hipposiderid bats from Southeast Asia and evidence of cryptic diversity. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 2, p. 597–611, 1 fev. 2012.

RUEDI, M. et al. A new genus and species of vespertilionid bat from the Indomalayan Region. **Journal of Mammalogy**, v. 99, n. 1, p. 209–222, 1 fev. 2018.

SÁNCHEZ, R. T. et al. A new species of Eptesicus (Chiroptera, Vespertilionidae) from Argentina. **Journal of Mammalogy**, v. 100, n. 1, p. 118–129, 28 fev. 2019.

VOLLETH, M.; HELLER, K.-G. Phylogenetic relationships of vespertilionid genera (Mammalia: Chiroptera) as revealed by karyological analysis. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 32, n. 1, p. 11–34, 27 abr. 2009.

CAPÍTULO 1

Taxas de evolução molecular do genoma mitocondrial de Vespertilionidae e descrição de quatro mitogenomas completos e inéditos do gênero *Eptesicus* (Chiroptera: Vespertilionidae)

Periódico alvo: *Molecular Phylogenetics and Evolution*

1. INTRODUÇÃO

O mitogenoma (DNA mitocondrial, mDNA) está localizado na mitocôndria dentro das células eucarióticas e é herdado da mãe (KIM; PARK, 2015), sendo uma molécula circular, pequena, que possui entre 16–20 kilobases de comprimento (AVISE et al., 1987). O DNA mitocondrial dos animais contém 37 genes codificantes: 13 RNAs mensageiros (RNAm), 22 RNAs de transferência (RNAt) e 2 RNAs ribossomais (RNAr), constituindo-se em uma importante fonte de informação genética extra-nuclear (AVISE et al., 1997; BOORE, 1999). Dentre os genomas organelares, o mDNA é um dos mais bem estudados entre os seres vivos, pois tem permitido desvendar vários aspectos da evolução de organismos e de seus genomas. Em humanos, mutações no mDNA podem causar diversos tipos de doenças, quase todas afetando processos neuromusculares (DENVER et al., 2000; HOWELL et al., 2003).

Em animais o mDNA evolui mais rápido que o DNA nuclear (BROWN; HEAL, 1979), pois a molécula não possui mecanismos eficientes de reparo, acumulando mais mutações que o DNA nuclear (CLAYTON; DODA; FRIEDBERG, 1974) e, além disso, ocorre em um grande número de cópias por célula. A alta taxa de mutação quando comparado com o genoma nuclear fazem do mDNA um bom marcador em estudos comparativos entre espécies de divergência recente (BOORE, 1999; HARISRIDHAR, 2018; YAMAZAKI; SHIMADA, 1997).

As taxas de mutação dos genomas dos organismos são uma característica que irá influenciar diferentes aspectos da história evolutiva dos mesmos e podem ser influenciadas pelas características genéticas intrínsecas de cada organismo, além das relações destes com o ambiente externo (HAAG-LIAUTARD et al., 2008). As taxas de mutação são, por exemplo, bastante utilizadas como um importante parâmetro para a compreensão da evolução viral, e possuem importantes implicações práticas, pois estimativas precisas das taxas de mutação dos vírus podem ajudar a traçar estratégias para a vacinação humana (DAVENPORT et al., 2008;

SANJUÁN et al., 2010). Para outros microorganismos, como no caso das bactérias, seu sucesso evolutivo está associado às mudanças constantes nas taxas de mutações, frente às condições ambientais contrastantes às quais são submetidas (DENAMUR; MATIC, 2006). Além de sua clara influência na evolução dos organismos, as taxas de mutação de determinados sítios de DNA podem ser utilizadas para inferir estatisticamente eventos de diferenciação genética (BOAS, 2007; SNIEGOWSKI et al., 2000). Tais cálculos são muito usados em modelos filogenéticos, onde o número de substituições de nucleotídeos que ocorrem entre sítios de diferentes indivíduos são utilizados para estimar árvores filogenéticas, bem como para estimar tempos de divergência entre os grupos de interesse (BOAS, 2007; HAAG-LIAUTARD et al., 2008). Alem disso dados dos genomas mitocondriais têm sido muito utilizados no campo da biologia da conservação (AMADOR et al., 2018; KIM; PARK, 2015), além de serem importante fonte de informação para subsidiar estudos sobre genética de populações, processos de evolução molecular (KIM et al., 2011; YOON; PARK, 2015) , análises utilizando genomas mitocondriais também têm implicações importantes para a compreensão dos fenótipos de doenças mitocondriais que diferem entre os sexos (DOWLING, 2014; GORMAN et al., 2016).

Esclarecer os processos que atuam em suas taxas de mutação, alterações de tamanho populacional e relações filogenéticas pode gerar importantes informações que irão contribuir para a conservação ambiental (BROCKERHOFF et al., 2017; HOOFER; BUSSCHE, 2003). Contudo, apesar dos esforços recentes para coletar e analisar dados genéticos e genômicos destes organismos, tais iniciativas são ainda deficientes frente à enorme diversidade do grupo (MURRAY et al., 2012; PINZARI et al., 2020).

No passado, genomas mitocondriais (mitogenomas) eram geralmente obtidos através do sequenciamento de DNA de forma tradicional (*sanger-sequencing*) realizado com uma série de primers conservados desenhados de maneira a se sobreporem, completando assim todo o DNA mitocondrial. Através do uso de métodos de sequenciamento de última geração, pudemos

obter quatro genomas mitocondriais completos do gênero *Eptesicus* de forma mais rápida e precisa. Além da importância intrínseca para o conhecimento da biologia das espécies em questão, tais mitogenomas podem ser de grande valia para a compreensão dos processos evolutivos que atuaram ao longo da evolução metabólica de Chiroptera (BOTERO-CASTRO et al., 2018; SHEN et al., 2010) visto que os morcegos do gênero *Eptesicus por serem espécies cripticas* encontrados em áreas florestais, onde a vegetação densa e a falta de luz dificultam a observação e a distinção visual de suas características distintivas, a análise de DNA permite identificar diferenças genéticas sutis entre as espécies e, assim, distinguir morcegos aparentemente semelhantes. Ademais, mitogenomas têm sido uma fonte valiosa de informação filogenética, auxiliando na compreensão dos padrões de relacionamento dos grupos de Chiroptera (MEGANATHAN et al., 2012).

No presente trabalho, descrevemos os genomas mitocondriais completos de quatro espécies do gênero *Eptesicus*: *E. brasiliensis* com 16.864 bp, *E. diminutus* com 17.027 bp, *E. furinalis* com 16.838 bp e *E. nilssonii* com 17.009 bp. Além destas descrições inéditas, também estimamos as taxas de mutação de cada gene mitocondrial da família Vespertilionidae, utilizando todos os genomas mitocondriais de espécies da família disponíveis em bancos de dados de livre acesso. Desta forma, nosso objetivo geral foi sequenciar, montar e realizar a anotação completa do genoma mitocondrial de espécies do gênero *Eptesicus* para investigar aspectos de sua evolução molecular. *N*ossos objetivos específicos foram utilizar as sequências mitocondriais completas de *Eptesicus brasiliensis*, *Eptesicus diminutus*, *Eptesicus furinalis* e *Eptesicus nilssonii*, estruturadas neste estudo, em análises comparativa e filogenética com outros membros da família Vespertilionidae, com a finalidade de investigar as taxas de evolução dos diferentes genes dos mitogenomas da família.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Táxons analisados

Coletamos um espécime de cada espécies de: *Eptesicus brasiliensis* (Desmarest, 1819), *Eptesicus diminutus* (Osgood, 1915), *Eptesicus furinalis (*D'orbigny, 1847) e *Eptesicus nilssonii* (Keyserling e Blasius, 1939). Todas as espécies se encontram na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN como de menor preocupação.

As sequências completas do genoma mitocondrial destas espécies foram combinados a outros 57 mitogenomas de espécies da família Vespertilionidae disponíveis no GenBank (National Center for Biotechnology Information (NCBI), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Utilizamos também o mitogenoma de *Miniopterus fuliginosus* como grupo externo nas análises filogenéticas descritas a seguir. Informações sobre os números de acesso do GenBank de cada espécie estão disponíveis na Tabela S1 do Material Suplementar.

2.2. Extração, purificação, quantificação e sequenciamento

As etapas de extração de DNA das espécies *Eptesicus brasiliensis, Eptesicus diminutus* e *Eptesicus furinalis* foram realizadas no laboratório de genética da Universidade do Estado de Mato Grosso, *campus* de Nova Xavantina (UNEMAT). Exemplares das três espécies foram capturados em campo pelo projeto "Variabilidade Genética, segurança alimentar e meio ambiente: estratégia para a conservação do etnoecossistema no Assentamento Santa Maria, município de Água Boa, Mato Grosso". Os indivíduos foram medidos, pesados, processados para a remoção de tecido para extração de DNA e depositados na coleção de quirópteros da UNEMAT, *campus* de Nova Xavantina, MT. As extrações de DNA seguiram o protocolo padrão estabelecido (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988; STADELMANN et al., 2007). O método envolve o rompimento celular e, para isso, empregamos um tampão de lise (10mM de

Tris, 1mM de EDTA, 100mM NaCl, 0,5% de Tween 20 ou SDS 20%), seguido de digestão enzimática com proteinase K, etapas de centrifugação e precipitação do DNA em etanol. A ressuspensão do DNA foi feita em tampão TE (10mM Tris/1mM EDTA). A qualidade e quantificação do DNA extraído foi verificada em eletroforese de gel de agarose e por espectrofotometria. As etapas de construção de bibliotecas e sequenciamento foram realizadas por empresa terceirizada, no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD - Unicamp). Para a preparação de bibliotecas paired-end (2X100bp), o DNA total das amostras foi padronizado em 0,04 **µ**g/**µ**l e foi utilizado o kit Illumina TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation kit LT(F-121-3001) de acordo com os protocolos do fabricante (Illumina doc. TruSeq DNA PCR-Free Reference Guide (1000000039279 v00)). O sequenciamento de DNA foi realizado no equipamento Illumina HISEQ-2500 no modo paired-end com 200 ciclos. O mitogenoma de *Eptesicus nilssonii* foi sequenciado independentemente e cedido por colaboradores do projeto (Thomas Lilley & Veronika Laine, BatLabFinland, Univeristy of Helsinki, Finnish Museum of Natural History. Os métodos utilizados foram de acordo com o trabalho de (LAINE et al., 2023) sendo as amostras do morcego *Eptesicus nilssonii* coletadas do plagiopatágio usando bisturi estéril e armazenados em tubos de 1,5 ml com EtOH 95% a -20°C. O DNA foi extraído usando QIAmp DNA Mini Kits e armazenado em freezer −80 °C. O sequenciamento foi realizado com Bibliotecas TruSeq Nano com tamanho de inserção de 350 bp e executado em uma plataforma HiSeq4000 para gerar leituras de 2 × 150 bp.

2.3. Montagem do genoma mitocondrial

A montagem do genoma seguiu os mesmos passos para as quatro espécies. Para a análise da qualidade das sequências geradas, utilizamos o *software* Trimmomatic (BOLGERet al, 2014) com a finalidade de eliminar as bases sequenciadas com baixa qualidade. Os arquivos gerados com alta qualidade pelo Trimmomatic foram utilizados no processo de montagem

utilizando o programa SPAdes (“SPAdes – Centro de Biotecnologia Algorítmica”, 2022). A partir das sequências de montagem, foi realizada a predição de genes utilizando o *software* MITOS *webserver* (HOFF & STANKE, 2013).

2.4. Análise filogenética e estimativa das taxas de mutação

Alinhamos os mitogenomas das espécies da família Vespertilionidae usando o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) com configuração padrão no programa Geneious v.2021.2.2. Eliminamos manualmente regiões do genoma mitocondrial pobremente alinhadas (i.e., os genes não codificantes tRNA e região D-loop). Nas análises, também eliminamos os códons de parada dos genes codificantes, exceto para cinco genes que se sobrepõem com outros genes (i.e., ATP8, ATP6, ND4L, ND5 e ND6). O alinhamento final de 14.092 bp abrangeu 13 genes codificantes e dois genes de rRNA (16S e 12S). Estimamos os modelos de substituição para cada gene usando ModelFinder (KALYAANAMOORTHY et al., 2017) no webserver do IQ-TREE (TRIFINOPOULOS et al., 2016). GTR+I+G foi considerado o melhor modelo de substituição para todos os genes, exceto para ATP8 (TN+I+G) e ND6 (HKY+I+G).

Estimamos as relações filogenéticas juntamente com o tempo de divergência e a taxa de mutação de cada gene mitocondrial através de uma abordagem Bayesiana usando BEAST v.1.8 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007). Para permitir que as taxas de substituição fossem independentes em cada ramo, usamos um *relaxed uncorrelated lognormal clock*. Além disso, usamos *birth-death speciation model* como *tree prior*, uma vez que é razoável assumir que a extinção tem um impacto importante no padrão de diversificação das linhagens (SOTO-CENTENO; STEADMAN, 2015; VALENTE; ETIENNE; DÁVALOS, 2017). Para datar a árvore, usamos sete fósseis como pontos de calibração: (i) origem de Verpertilionidae à 48.6 Ma; (ii) origem de *Myotis* à 28.4 Ma; (iii) origem de *Nyctalus* à 28.4 Ma; (iv) origem de *Eptesicus* à 20.4 Ma; (v) origem de *Plecotus* à 16 Ma; (vi) origem de *Vespertilio* à 16 Ma; e (vii) origem de *Murina* à 5.3 Ma (informações detalhadas sobre os fósseis encontram-se na

Tabela S2 do Material Suplementar). Com base na filogenia mais recente de Chiroptera (SHI; RABOSKY, 2015), forçamos a monofilia de cada clado usado na calibração. Em seguida, aplicamos restrições de tempo usando distribuição lognormal para que as idades dos fósseis representassem o limite mais jovem de divergência para o respectivo nó, sem definir um limite rígido para divergências mais antigas. Deste modo, os *priors* de distribuições de 5 a 95% utilizados foram: 48.6–98 Ma (Vespertilionidae), 28.4–78 Ma (*Myotis* e *Nyctalus*), 20.4–70 Ma (*Eptesicus*), 16–66 Ma (*Plecotus* e *Vespertilio*) e 5.3–55 Ma (*Murina*). Corremos duas corridas independentes de 500 milhões de gerações, amostrando a cada 50 mil gerações. Avaliamos a convergência das corridas e valores de ESS (≥200) usando TRACER v1.7 (RAMBAUT et al., 2018). Os primeiros 20% das genealogias amostradas foram descartados como *burn-in*, e a árvore de credibilidade máxima foi inferida com TREEANNOTATOR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sequenciamento do mitogenoma completo para a espécie *Eptesicus brasiliensis* (Fig. 2) resultou em um tamanho total de 16.864 bp e composição de base total de 31.1% A, 30.0% T, 22.6% C e 14.2% G. O genoma mitocondrial consiste em 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes de tRNA e dois genes de rRNA e uma região de controle (CR). Os genes codificadores de proteínas iniciam frequentemente com ATG, exceto nos genes ND2, ND3, ND5 que começam com ATA. Códons de parada incompletos foram encontrados em ND1, ND2, COX3, ND3 e ND4; os genes COX2, ATP8, ATP6, ND4L, ND5 e ND6 possuem códons de parada completos (TAA), enquanto que no gene COX1 é TAG e no CYTB é AGA (Tabela 2).



Figura 2. Exemplar de *Eptesicus brasiliensis* pertencente à família Vespertilionidae. (Fonte: https://www.ufrgs.br/faunadigitalrs/mamiferos/ordem-chiroptera/familia-vespetilionidae/morcego-borboleta-eptesicus-brasiliensis/)

Tabela 2. Características gerais do genoma mitocondrial de *Eptesicus brasiliensis*.

	Position				Codon	
Locus	**From**	**To**	**Strand**	**Length (bp)**	**Start**	**Stop**
tRNA-Phe	1	68	+	68		
12S rRNA	69	1025	+	957		
tRNA-Val	1026	1093	+	68		
16S rRNA	1093	2653	+	1561		
tRNA-Leu(UUR)	2654	2728	+	75		
ND1 gene	2734	3688	+	955	ATG	T--
tRNA-lle	3689	3757	+	69		
tRNA-Gln	3755	3828	-	74		
tRNA-Met	3829	3897	+	69		
ND2 gene	3898	4939	+	1042	ATA	T--
tRNA-Trp	4940	5006	+	67		
tRNA-Ala	5011	5077	-	67		
tRNA-Asn	5081	5153	-	73		
rep_origin	5154	5188	+	35		
tRNA-Cys	5186	5251	-	66		
tRNA-Tyr	5252	5318	-	67		
COX1 gene	5320	6864	+	1545	ATG	TAG
tRNA-Ser(UCN)	6874	6942	-	69		
tRNA-Asp	6950	7016	+	67		
COX2 gene	7017	7700	+	684	ATG	TAA
tRNa-Lys	7704	7770	+	67		
ATP8 gene	7774	7977	+	204	ATG	TAA
ATP6 gene	7935	8615	+	681	ATG	TAA
COX3 gene	8615	9398	+	784	ATG	T--
tRNA-Gly	9399	9468	+	70		
ND3 gene	9469	9814	+	346	ATA	T--
tRNA-Arg	9816	9885	+	70		
ND4L gene	9887	10183	+	297	ATG	TAA
ND4 gene	10177	11554	+	1378	ATG	T--
tRNA-His	11555	11621	+	67		
tRNA-Ser(AGY)	11622	11680	+	59		
tRNA-Leu(CUN)	11682	11751	+	70		
ND5 gene	11752	13569	+	1818	ATA	TAA
ND6 gene	13553	14080	-	528	ATG	TAA
tRNA-Glu	14081	14151	-	71		
CYTB gene	14155	15294	+	1140	ATG	AGA
tRNA-Thr	15295	15363	+	69		
tRNA-Pro	15363	15429	-	67		

O morcego *Eptesicus diminutus* (Fig. 3) possui comprimento de 17.027 bp e uma composição de base total de 33.3% A, 30.0% T, 22.6% C e 14.0% G. O genoma mitocondrial consiste em 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes de tRNA, dois genes de rRNA e uma região de controle (CR). Os genes codificadores de proteínas iniciam frequentemente com

ATG, exceto nos genes ND2, ND3, ND5 que começam com ATA (Tabela 3). Códons de parada incompletos foram encontrados em ND1, ND2, COX3, ND3 e ND4, e códons de parada completos foram encontrados nos genes COX1, COX2, ATP8, ATP6, ND4L, ND5 e ND6 (todos TAA) e no gene CYTB (AGA) (Tabela 3).



Figura 3. Exemplar de *Eptesicus diminutus* pertencente à família Vespertilionidae. (Fonte: https://www.ufrgs.br/faunadigitalrs/mamiferos/ordem-chiroptera/familia-vespetilionidae/morcego-borboleta-eptesicus-diminutus/).

Tabela 3. Características gerais do genoma mitocondrial de *Eptesicus diminutus*.

	Position				Codon	
Locus	**From**	**To**	**Strand**	**Length (bp)**	**Start**	**Stop**
tRNA-Phe	1	68	+	68		
12S rRNA	69	1026	+	958		
tRNA-Val	1027	1094	+	68		
16S rRNA	1094	2654	+	1561		
tRNA-Leu(UUR)	2655	2729	+	75		
ND1 gene	2735	3689	+	955	ATG	T--
tRNA-lle	3690	3758	+	69		
tRNA-Gln	3756	3829	-	74		
tRNA-Met	3830	3898	+	69		
ND2 gene	3899	4940	+	1042	ATA	T--
tRNA-Trp	4941	5007	+	67		
tRNA-Ala	5012	5078	-	67		
tRNA-Asn	5082	5154	-	73		
rep_origin	5155	5189	+	35		
tRNA-Cys	5187	5252	-	66		
tRNA-Tyr	5253	5319	-	67		
COX1 gene	5321	6865	+	1545	ATG	TAA
tRNA-Ser(UCN)	6873	6941	-	69		
tRNA-Asp	6949	7015	+	67		
COX2 gene	7016	7699	+	684	ATG	TAA
tRNa-Lys	7703	7769	+	67		
ATP8 gene	7773	7976	+	204	ATG	TAA
ATP6 gene	7934	8614	+	681	ATG	TAA
COX3 gene	8614	9397	+	784	ATG	T--
tRNA-Gly	9398	9467	+	70		
ND3 gene	9468	9813	+	346	ATA	T--
tRNA-Arg	9815	9885	+	71		
ND4L gene	9887	10183	+	297	ATG	TAA
ND4 gene	10177	11554	+	1378	ATG	T--
tRNA-His	11555	11621	+	67		
tRNA-Ser(AGY)	11622	11680	+	59		
tRNA-Leu(CUN)	11682	11751	+	70		
ND5 gene	11752	13569	+	1818	ATA	TAA
ND6 gene	13553	14080	-	528	ATG	TAA
tRNA-Glu	14081	14151	-	71		
CYTB gene	14155	15294	+	1140	ATG	AGA
tRNA-Thr	15295	15363	+	69		
tRNA-Pro	15363	15429	-	67		

O morcego *Eptesicus furinalis* (Fig. 4) seu genoma mitocondrial possui comprimento total de 16.838 bp e uma composição de base total de 33.0% A, 30.0% T, 22.7% C e 14.3% G. Este mitogenoma consiste em 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes de tRNA, dois genes de rRNA e uma região de controle (CR) (Tabela 4). Os genes codificadores de proteínas

iniciam frequentemente com ATG, exceto nos genes ND2, ND3 e ND5 que começam com ATA. Os genes ND1, ND2, COX3, ND3, e ND4 possuem códons de parada incompletos. Os genes COX2, ATP8, ATP6, ND4L, ND5 e ND6, enquanto que no gene COX1 é TAG e no gene CYTB é AGA (Tabela 4).



Figura 4. Exemplar de *Eptesicus furinalis* pertencente à família Vespertilionidae. (Fonte: https://www.ufrgs.br/faunadigitalrs/mamiferos/ordem-chiroptera/familia-vespetilionidae/morcego-borboleta-eptesicus-furinalis/)

Tabela 4. Características gerais do genoma mitocondrial de *Eptesicus furinalis*

	Position				Codon	
Locus	**From**	**To**	**Strand**	**Length (bp)**	**Start**	**Stop**
tRNA-Phe	1	68	+	68		
12S rRNA	69	1025	+	957		
tRNA-Val	1026	1093	+	68		
16S rRNA	1093	2652	+	1560		
tRNA-Leu(UUR)	2653	2727	+	75		
ND1 gene	2733	3687	+	955	ATG	T--
tRNA-lle	3688	3756	+	69		
tRNA-Gln	3754	3827	-	74		
tRNA-Met	3828	3896	+	69		
ND2 gene	3897	4938	+	1042	ATA	T--
tRNA-Trp	4939	5005	+	67		
tRNA-Ala	5010	5076	-	67		
tRNA-Asn	5080	5152	-	73		
rep_origin	5153	5187	+	35		
tRNA-Cys	5185	5250	-	66		
tRNA-Tyr	5251	5317	-	67		
COX1 gene	5319	6863	+	1545	ATG	TAG
tRNA-Ser(UCN)	6873	6941	-	69		
tRNA-Asp	6949	7015	+	67		
COX2 gene	7016	7699	+	684	ATG	TAA
tRNa-Lys	7703	7769	+	67		
ATP8 gene	7773	7976	+	204	ATG	TAA
ATP6 gene	7934	8614	+	681	ATG	TAA
COX3 gene	8614	9397	+	784	ATG	T--
tRNA-Gly	9398	9467	+	70		
ND3 gene	9468	9813	+	346	ATA	T--
tRNA-Arg	9815	9884	+	70		
ND4L gene	9886	10182	+	297	ATG	TAA
ND4 gene	10176	11553	+	1378	ATG	T--
tRNA-His	11554	11620	+	67		
tRNA-Ser(AGY)	11621	11680	+	60		
tRNA-Leu(CUN)	11682	11751	+	70		
ND5 gene	11752	13569	+	1818	ATA	TAA
ND6 gene	13553	14080	-	528	ATG	TAA
tRNA-Glu	14081	14151	-	71		
CYTB gene	14155	15294	+	1140	ATG	AGA
tRNA-Thr	15295	15363	+	69		
tRNA-Pro	15363	15429	-	67		

O morcego *Eptesicus nilssonii* (Fig. 5) seu genoma mitocondrial completo (Tabela 6) possui comprimento total de 17.009 bp e uma composição de base total de 32.1% A, 29.1% T,

23.9% C e 14.9% G. O genoma mitocondrial de Eptesicus nilssonii consiste em 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes de tRNA, dois genes de rRNA e uma região de controle (CR). Os genes codificadores de proteínas iniciam frequentemente com ATG, exceto nos genes ND2, ND3 e ND5 que começam com ATA (Tabela 4). Códons de parada incompletos foram encontrados em ND1, ND2, COX3, ND3 e ND4. Códons de parada completos foram encontrados nos genes ATP8, ATP6, ND4L, ND5 e ND6 (todos TAA), em COX1 e COX2 (ambos TAG) e no gene CYTB (AGA).



Figura 5. Exemplar de *Eptesicus nilssonii* pertencente à família Vespertilionidae. (Fonte: https://www.biodiversity4all.org/taxa/74314-Eptesicus-nilssonii).

Tabela 6. Características gerais do genoma mitocondrial de *Eptesicus nilssonii.*

	Position				Codon	
Locus	**From**	**To**	**Strand**	**Length (bp)**	**Start**	**Stop**
tRNA-Phe	1	68	+	68		
12S rRNA	69	1028	+	960		
tRNA-Val	1029	1096	+	68		
16S rRNA	1096	2656	+	1561		
tRNA-Leu(UUR)	2657	2731	+	75		
ND1 gene	2737	3692	+	956	ATG	TA-
tRNA-lle	3693	3761	+	69		
tRNA-Gln	3759	3832	-	74		
tRNA-Met	3833	3901	+	69		
ND2 gene	3902	4943	+	1042	ATA	T--
tRNA-Trp	4944	5010	+	67		
tRNA-Ala	5015	5081	-	67		
tRNA-Asn	5085	5157	-	73		
rep_origin	5158	5192	+	35		
tRNA-Cys	5190	5255	-	66		
tRNA-Tyr	5256	5324	-	69		
COX1 gene	5326	6870	+	1545	ATG	TAG
tRNA-Ser(UCN)	6879	6947	-	69		
tRNA-Asp	6955	7022	+	68		
COX2 gene	7023	7706	+	684	ATG	TAG
tRNa-Lys	7710	7776	+	67		
ATP8 gene	7780	7983	+	204	ATG	TAA
ATP6 gene	7941	8621	+	681	ATG	TAA
COX3 gene	8621	9404	+	784	ATG	T--
tRNA-Gly	9405	9473	+	69		
ND3 gene	9474	9819	+	346	ATA	T--
tRNA-Arg	9821	9890	+	70		
ND4L gene	9892	10188	+	297	ATG	TAA
ND4 gene	10182	11562	+	1381	ATG	T--
tRNA-His	11563	11629	+	67		
tRNA-Ser(AGY)	11630	11688	+	59		
tRNA-Leu(CUN)	11690	11759	+	70		
ND5 gene	11760	13586	+	1827	ATA	TAA
ND6 gene	13570	14097	-	528	ATG	TAA
tRNA-Glu	14098	14168	-	71		
CYTB gene	14172	15311	+	1140	ATG	AGA
tRNA-Thr	15312	15380	+	69		
tRNA-Pro	15380	15445	-	66		

Se compararmos os novos mitogenomas aqui apresentados com os descritos na literatura da família Vespertilionidae podemos observar: O morcego *Myotis bombinus* (Chiroptera, Vespertilionidae), descrito por (KIM et al., 2017), tem 17 128 pares de bases de

comprimento, ligeiramente superior ao tamanho dos nossos, e é composto por 13 genes codificadores de proteínas, 2 RNAs ribossômicos, 22 RNAs de transferência e uma região de controle não codificante idêntica àquela que temos descrita. Foram identificados três códons de iniciação (ATA, ATG e ATT) e quatro códons de terminação (AGA, TAA, TAG e T). Nosso códon de iniciação encontrado foi ATA, embora o códon ATG tenha predominado com maior frequência, e o códon ATT não foi encontrado. Quanto aos códons de terminação, foram semelhantes aos nossos. *Eptesicus serotinus* é um membro da família Vespertilionidae e possui e pertencente ao genero de estudo. O seu mitogenoma completo, descrito por (NAM et al., 2015), apresenta um comprimento de 16.665 pares de bases, menor do que os mitogenomas que aqui descrevemos. Ele contém 13 genes codificadores de proteínas (11.410 pb), 2 genes de RNA ribossômico (12S e 16S RNA) (2524 pb), 22 genes de RNA de transferência (1504 pb) e 1 região de controle (1225 pb), semelhante aos aqui descritos. Foram identificados dois códons de iniciação (ATG e ATT), enquanto nos mitogenomas aqui apresentados encontramos o códon de iniciação ATA, porém o códon ATG foi o mais frequente, enquanto o códon ATT não foi encontrado. Quanto aos códons de parada, foram semelhantes aos nossos códons completos (TAG, TAA, TGA) e dois códons de parada incompletos (T- ou TA-).

De acordo com as análises dos mitogenomas da família Vespertilionidae, observamos que a média da taxa de mutação estimada dos genes codificantes foi de 0.01 mutações por sítio por milhões de anos, exceto para os genes ribossomais em que a média estimada foi de aproximadamente 0.007 mutações por sítio por milhões de anos (TABELA 7). A taxa de mutação relativa foi maior nos genes ND5, ND6 e ND4, enquanto a taxa do relógio molecular foi maior nos genes ND4, ND6, ND1, ND2 e ND4L.

Conhecer as taxas de mutação de diferentes regiões do genoma podem contribuir expressivamente para o nosso conhecimento acerca de biologia evolutiva, e propiciar o

fundamento para estudos mais específicos tanto de biologia molecular quanto acerca dos padrões de divergência e biogeografia das espécies de interesse. Nossos resultados acerca das taxas de mutação para Vespertilionidae fornecem importantes informações sobre o processo evolutivo e os mecanismos genéticos que possivelmente influenciam os atuais padrões de diversidade de morcegos. Comparado com outros grupos de organismos, as taxas de substituição de Vespertilionidae podem ser consideradas relativamente altas. Isso significa que eles são suscetíveis a muitas mudanças em seu material genético em um curto espaço de tempo (HUANG; MADAN, 1999; JONES; TEELING; ROSSITER, 2013; ZHANG et al., 2013). A taxa de mutação que encontramos é consistente com as descobertas encontradas na literatura, onde foi observado que alguns animais apresentam uma taxa de mutação mais rápida do que outros. O ritmo do relógio mitocondrial nos animais não é apenas influenciado pelo tamanho da população, mas principalmente pela taxa de mutação(NABHOLZ; GLÉMIN; GALTIER, 2009). Esse fator tem impacto na diversidade genética dos animais e em sua evolução ao longo do tempo. Outro estudo (BERGERON et al., 2023) investigou diversos grupos de animais e revelou que a taxa de mutação varia entre eles, principalmente o tamanho do animal, seguido da sua expectativa de vida e estratégias reprodutivas foram identificados como fatores que influenciam na alta taxa de mutação. Essas mudanças genéticas podem gerar diferenças notáveis entre os animais, auxiliando em sua adaptação ao ambiente em que vivem. Investigando a população de morcegos vampiros comuns (*Desmodus rotundus*) em várias regiões. Utilizando análises de DNA mitocondrial (mtDNA), os pesquisadores(MARTINS et al., 2009) descobriram que o mtDNA dos morcegos de diferentes regiões, tiveram uma taxa de mutação maior que o DNA nuclear. A falta de correspondência dessas diferenças no DNA nuclear pode ser atribuída ao isolamento geográfico passado entre as populações, que limitou a mistura genética e resultou em divergências específicas no mtDNA. Caso as taxas de mutação nuclear sejam correlacionadas às do genoma mitocondrial, tais taxas de mutação podem ajudar

a explicar porque os morcegos Vespertilionidae são tão adaptáveis e diversos (JONES; TEELING; ROSSITER, 2013; LU et al., 2013). Acredita-se que a capacidade de adaptação dos morcegos Vespertilionidae esteja relacionada a sua diversidade genética e sua capacidade de explorar diferentes recursos alimentares e habitats (CHENG et al., 2018; GONCALVES; QUINTELA; FREITAS, 2014; ZHANG et al., 2013).

Tabela 7. Taxas de mutação encontradas nos genes mitocondriais da família Vespertilionidae

	Genes	Taxa de mutação relativa	Taxa de relógio molecular
Ribossomais	12S	0,556	0,0062
	16S	0,694	0,0077
Codificantes	ATP6	1,001	0,0111
	ATP8	0,688	0,0076
	COX1	1,031	0,0114
	COX2	0,9	0,01
	COX3	0,894	0,0099
	CYTB	1,064	0,0118
	ND1	1,094	0,0121
	ND2	1,073	0,0119
	ND3	1,009	0,0112
	ND4	1,217	0,0135
	ND4L	1,07	0,0119
	ND5	1,257	0,014
	ND6	1,213	0,0135

A análise molecular de espécies do gênero *Eptesicus* tem sido realizada principalmente por meio do sequenciamento de DNA mitocondrial e de DNA nuclear. O

mDNA tem sido amplamente utilizado em estudos de filogenia molecular devido à sua taxa de mutação relativamente alta e sua herdabilidade materna, o que permite a diferenciação entre espécies e a reconstrução de relações filogenéticas. O DNA nuclear, por sua vez, tem sido utilizado para inferir a história evolutiva de populações e espécies, especialmente quando combinado com dados de mDNA. O Trabalho realizado por (JUSTE et al., 2009) destaca a importância da utilização de sequências de DNA mitocondrial para investigar a estrutura populacional de morcegos do gênero *Eptesicus* em diferentes escalas geográficas, desde a influência de fatores geográficos como os Estreitos de Gibraltar até a estrutura populacional em pequenas áreas. Os resultados mostram que a diversificação da espécie *Eptesicus serotinus* está em curso e que existe uma barreira genética entre as populações de *Eptesicus* em ambos os lados dos Estreitos de Gibraltar, o que sugere que esses estreitos podem atuar como uma barreira para o fluxo gênico entre essas populações. Outro estudo realizado por (JUSTE et al., 2013), analisou a filogenia molecular de morcegos do gênero *Eptesicus* na região mediterrânea. Os resultados indicaram que as espécies *Eptesicus isabellinus* e *Eptesicus serotinus* formam um clado monofilético, enquanto *Eptesicus bottae* e *Eptesicus gobiensis* são espécies irmãs de todas as outras espécies. Além disso, o estudo sugeriu que as espécies *E. isabellinus* e *E. serotinus* apresentam um processo de especiação recente, provavelmente associado a eventos geológicos que afetaram a região.

O mDNA tem sido amplamente utilizado em estudos de filogenia molecular devido à sua taxa de mutação relativamente alta e sua herdabilidade materna, o que permite a diferenciação entre espécies e a reconstrução de relações filogenéticas. O DNA nuclear, por sua vez, tem sido utilizado para inferir a história evolutiva de populações e espécies, especialmente quando combinado com dados de mDNA. O Trabalho realizado por (JUSTE et al., 2009)

destaca a importância da utilização de sequências de DNA mitocondrial para investigar a estrutura populacional de morcegos do gênero *Eptesicus* em diferentes escalas geográficas.

A árvore filogenética que construímos, mostrada na (Figura 6), confirma a inclusão das espécies *Eptesicus brasiliensis*, *Eptesicus diminutus, Eptesicus furinalis e Eptesicus nilssonii* dentro do mesmo gênero, claramente formando um clado monofilético em relação às outras linhagens amostradas. *Eptesicus* é um gênero de morcegos que é conhecido por sua natureza críptica, existindo várias espécies que se assemelham de maneira notável. Muitas delas possuem cores, tamanhos e padrões de voo semelhantes, o que torna sua identificação uma tarefa desafiadora para os pesquisadores e observadores de morcegos. Essas semelhanças podem ser ainda mais acentuadas em regiões geográficas onde várias espécies coexistem. Uma das razões para essa cripticidade é a necessidade de sobrevivência e adaptação ao ambiente. Com base em nossa análise filogenética, podemos concluir também que todas as espécies de *Myotis* encontradas no continente americano formam um grupo monofilético consistente, o qual inclui duas linhagens provenientes da região paleártica. Dentro do clado americano, são observados dois subgrupos distintos, ambos bem definidos e com forte suporte filogenético. Os resultados desta análise mostraram que o morcego *M. albescens* não foi encontrado como intimamente relacionado a *Myotis levis* e *Myotis nigricans* no gênero *Myotis*. Por outro lado, é possível que *M. albescens* seja um membro do complexo *Myotis nigricans*, que inclui várias espécies de morcegos estreitamente relacionados.

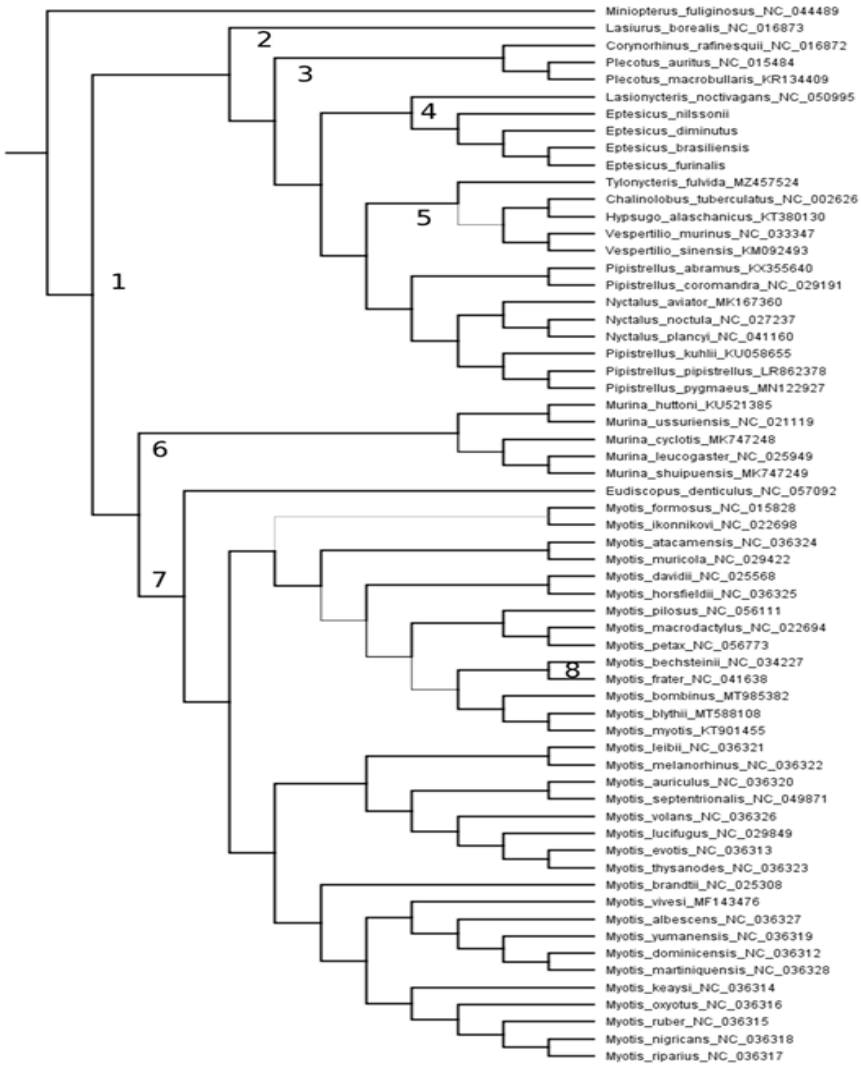


Figura 6. Árvore filogenética da família Vespertilionidae obtida utilizando as sequências de mitogenomas utilizadas neste estudo. Os números indicam os fósseis e suas posições utilizadas para calibrar a árvore: 1) *Khonsunycteris*, 2) *Lasiurus*, 3) *Corynorhinus*, 4) *Lasionycteris*, 5) *Vespertilio*, 6) *Kerivoula*, 7) *Submyotodon*, 8) *Myotis paradaubentonii.*

4. CONCLUSÃO

Este estudo descreveu e analisou pela primeira vez os genomas mitocondriais completos das espécies *Eptesicus brasiliensis*, *Eptesicus diminutus*, *Eptesicus furinalis* e *Eptesicus nilssonii*. Esperamos que os resultados utilizando morcegos do gênero *Eptesicus* como organismos modelo possam ser usados posteriormente para fornecer novas respostas e percepções para outras questões ecológicas e evolutivas, como os determinantes do tamanho das áreas de distribuição. Os resultados obtidos com este trabalho também poderão fornecer indícios de como tais organismos responderão às alterações ambientais, particularmente climáticas, que estão ocorrendo e ocorrerão nas próximas décadas. Sendo a maior família de Chiroptera, as estimativas de taxas de mutação serão de grande valia para a comunidade científica, pois possibilitarão a utilização de calibrações realistas em futuras análises filogenéticas de grupos mais inclusivos, isto é, dentro de gêneros ou entre populações em análises filogeográficas, onde a calibração com fósseis usualmente não é possível. Finalmente, visto que há um grande déficit de dados de mitogenomas de morcegos, em particular frente à alta diversidade de Vespertilionidae, tais genomas mitocondriais podem ser de grande valia para futuros estudos comparativos em larga escala.

Em suma, a descrição de mitogenomas completos representa uma área importante e em constante desenvolvimento na pesquisa genômica. Com a tecnologia de sequenciamento de próxima geração cada vez mais acessível, estamos vendo um número crescente de mitogenomas sendo sequenciados e descritos em uma ampla variedade de espécies. Essas descrições detalhadas permitem uma melhor compreensão da genética e biologia dessas espécies, além de fornecer informações valiosas para a conservação e uso sustentável da biodiversidade. A análise comparativa de mitogenomas também está ajudando a elucidar a evolução da vida na Terra, fornecendo informações sobre as relações filogenéticas entre espécies. À medida que a

tecnologia continua a avançar, podemos esperar ainda mais informações emocionantes e valiosas sendo reveladas pelos estudos de mitogenomas completos.

As espécies de *Eptesicus* através de analises do mDNA formam um clado monofilético dentro do gênero e estudar e compreender essas espécies cripticas é fundamental para preservar a biodiversidade e garantir a conservação adequada dos habitats em que vivem. A descoberta de novas espécies e subespécies, assim como a revisão taxonômica, são processos em constante evolução à medida que a ciência avança e novas técnicas de análise são desenvolvidas. A posição filogenética do gênero *Eptesicus* dentro da família Vespertilionidae tem sido objeto de constantes mudanças em estudos morfológicos, citogenéticos e moleculares, o que sugere incerteza em relação à monofilia do gênero. Essa falta de clareza evidencia a necessidade de estudos adicionais para elucidar a posição das espécies de *Eptesicus* e de outros gêneros aparentados, a fim de esclarecer as questões filogenéticas pendentes na família Vespertilionidae. Portanto, futuras investigações que se concentrem em tribos, subfamílias, gêneros e espécies relacionadas permitirão contribuições valiosas para lançar mais luz sobre a compreensão das relações filogenéticas nesta família.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, L. et al. A new species of Eptesicus (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae), from the sub-Andean Forest of Santa Cruz, Bolivia. v. 12, p. 391–409, 29 jul. 2021.

ASSESSOR), B. M. (CHIROPTERAN et al. IUCN Red List of Threatened Species: Eptesicus furinalis. IUCN Red List of Threatened Species, 20 jul. 2015.

AVISE, J. C. et al. INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, v. 18, n. 1, p. 489–522, 1987.

AVISE, J. C. et al. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences, v. 312, n. 1154, p. 325–342, jan. 1997.

AMADOR, L. I. et al. Bat Systematics in the Light of Unconstrained Analyses of a Comprehensive Molecular Supermatrix. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 25, n. 1, p. 37–70, mar. 2018.

AMADOR, L. I. et al. Bat Systematics in the Light of Unconstrained Analyses of a Comprehensive Molecular Supermatrix. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 25, n. 1, p. 37–70, mar. 2018.

BERGERON, L. A. et al. Evolution of the germline mutation rate across vertebrates. **Nature**, v. 615, n. 7951, p. 285–291, mar. 2023.

BISSON, I.-A.; SAFI, K.; HOLLAND, R. A. Evidence for Repeated Independent Evolution of Migration in the Largest Family of Bats. **PLOS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7504, 21 out. 2009.

BOAS, D. S. V. Bases moleculares de mutação gênica: mecanismos e classificação. **Revista Ceciliana**, n. 27, p. 79–92, 2007.

BOTERO-CASTRO, F. et al. In Cold Blood: Compositional Bias and Positive Selection Drive

the High Evolutionary Rate of Vampire Bats Mitochondrial Genomes. **Genome Biology and Evolution**, v. 10, n. 9, p. 2218–2239, 1 set. 2018.

BOZINOVIC, F.; CALOSI, P.; SPICER, J. I. Physiological Correlates of Geographic Range in Animals. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, n. 1, p. 155–179, 2011.

BARQUEZ, R. IUCN Red List of Threatened Species: Eptesicus brasiliensis. IUCN Red List of Threatened Species, 20 jul. 2015.

BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acids Research, v. 27, n. 8, p. 1767–1780, 1 abr. 1999.

BOTERO-CASTRO, F. et al. Next-generation sequencing and phylogenetic signal of complete mitochondrial genomes for resolving the evolutionary history of leaf-nosed bats (Phyllostomidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 69, n. 3, p. 728–739, 1 dez. 2013.

BROWN, D. J.; HEAL, G. Equity, Efficiency and Increasing Returns. The Review of Economic Studies, v. 46, n. 4, p. 571–585, 1 out. 1979.

BROCKERHOFF, E. G. et al. Forest biodiversity, ecosystem functioning and the provision of ecosystem services. **Biodiversity and Conservation**, v. 26, n. 13, p. 3005–3035, 1 dez. 2017.

CALOSI, P. et al. What determines a species' geographical range? Thermal biology and latitudinal range size relationships in European diving beetles (Coleoptera: Dytiscidae). **Journal of Animal Ecology**, v. 79, n. 1, p. 194–204, 2010.

CASTRESANA, J. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 4, p. 540–552, 1 abr. 2000.

CASTRO-INSUA, A. et al. Climatic niche divergence drives patterns of diversification and richness among mammal families. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8781, 8 jun. 2018.

CLAYTON, D. A.; DODA, J. N.; FRIEDBERG, E. C. The Absence of a Pyrimidine Dimer Repair Mechanism in Mammalian Mitochondria. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 71, n. 7, p. 2777–2781, jul. 1974.

COROIU, I. IUCN Red List of Threatened Species: Eptesicus nilssonii. IUCN Red List of Threatened Species, 25 abr. 2016.

CHANG, J.; RABOSKY, D. L.; ALFARO, M. E. Estimating Diversification Rates on Incompletely Sampled Phylogenies: Theoretical Concerns and Practical Solutions. **Systematic Biology**, v. 69, n. 3, p. 602–611, 1 maio 2020.

CRYAN, P. M.; STRICKER, C. A.; WUNDER, M. B. Continental-scale, seasonal movements of a heterothermic migratory tree bat. **Ecological Applications**, v. 24, n. 4, p. 602–616, 2014.

DAVENPORT, M. P. et al. Rates of HIV immune escape and reversion: implications for vaccination. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 561–566, dez. 2008.

DENAMUR, E.; MATIC, I. Evolution of mutation rates in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 820–827, 2006.

DENVER, D. R. et al. High Direct Estimate of the Mutation Rate in the Mitochondrial Genome of Caenorhabditis elegans. Science, v. 289, n. 5488, p. 2342–2344, 29 set. 2000.

DOWLING, D. K. Evolutionary perspectives on the links between mitochondrial genotype and disease phenotype. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Frontiers of Mitochondrial Research. v. 1840, n. 4, p. 1393–1403, 1 abr. 2014.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 1, p. 214, 8 nov. 2007.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

FRANCIS, C. M. et al. The Role of DNA Barcodes in Understanding and Conservation of Mammal Diversity in Southeast Asia. **PLOS ONE**, v. 5, n. 9, p. e12575, 3 set. 2010.

Garbino G.S.T., Gregorin R., Lima I.P. , Loureiro L., Moras L., Moratelli R., Nogueira M.R., Pavan A.C., Tavares V.C., Nascimento M.C., Novaes, R.L.M., Peracchi A.L. 2022. Updated checklist of Brazilian bats: versão 2020. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (Sbeq).

GHANEM, S. J.; VOIGT, C. C. Chapter 7 - Increasing Awareness of Ecosystem Services Provided by Bats. In: BROCKMANN, H. J. et al. (Eds.). . **Advances in the Study of Behavior**. [s.l.] Academic Press, 2012. v. 44p. 279–302.

GORMAN, G. S. et al. Mitochondrial diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 1–22, 20 out. 2016.

GONCALVES, G.; QUINTELA, F.; FREITAS, T. **Mamíferos do Rio Grande do Sul**. [s.l: s.n.].

HAAG-LIAUTARD, C. et al. Direct Estimation of the Mitochondrial DNA Mutation Rate in Drosophila melanogaster. **PLOS Biology**, v. 6, n. 8, p. e204, 19 ago. 2008.

HARISRIDHAR. **Revisiting Avise et al. 1987**. **Reflections on Papers Past**, 29 jul. 2018. Disponível em: <https://reflectionsonpaperspast.wordpress.com/2018/07/29/revisiting-avise-et-al-1987/>. Acesso em: 31 jan. 2023

HOWELL, N. et al. The Pedigree Rate of Sequence Divergence in the Human Mitochondrial Genome: There Is a Difference Between Phylogenetic and Pedigree Rates. **The American Journal of Human Genetics**, v. 72, n. 3, p. 659–670, 1 mar. 2003.

HEDENSTRÖM, A.; JOHANSSON, L. C. Bat flight. **Current Biology**, v. 25, n. 10, p. R399–R402, 18 maio 2015.

HILL, D. S. **Pests of Crops in Warmer Climates and Their Control**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2008.

HILL, J. E.; HARRISON, D. L. The baculum in the Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) with a systematic review, a synopsis of Pipistrellus and Eptesicus, and the descriptions of a new genus and subgenus. **Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology**, v. 52, p. 225–305, 30 jul. 1987.

HOOFER, S. R.; BUSSCHE, R. A. V. D. Molecular Phylogenetics of the Chiropteran Family Vespertilionidae. **Acta Chiropterologica**, v. 5, n. suppl, p. 1–63, jan. 2003.

JETZ, W. et al. The global diversity of birds in space and time. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 444–448, nov. 2012.

JETZ, W.; PYRON, R. A. The interplay of past diversification and evolutionary isolation with present imperilment across the amphibian tree of life. **Nature Ecology & Evolution**, v. 2, n. 5, p. 850–858, maio 2018.

JONES, K. E. et al. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 77, n. 2, p. 223–259, maio 2002.

JUSTE, J. et al. Phylogeny and systematics of Old World serotine bats (genus Eptesicus, Vespertilionidae, Chiroptera): an integrative approach. **Zoologica Scripta**, v. 42, n. 5, p. 441–457, 2013.

KIM, J. Y.; PARK, Y. C. Gene organization and characterization of the complete mitogenome of Hypsugo alaschanicus (Chiroptera: Vespertilionidae). Genetics and Molecular Research, v. 14, n. 4, p. 16325–16331, 2015.

KIM, Y.-K. et al. Complete mitochondrial genome of the far eastern Myotis, Myotis bombinus (Chiroptera, Vespertilionidae). Mitochondrial DNA Part A, v. 28, n. 2, p. 267–268, 4 mar. 2017.

KALKA, M.; KALKO, E. K. V. Gleaning bats as underestimated predators of herbivorous insects: diet of Micronycteris microtis (Phyllostomidae) in Panama. **Journal of Tropical Ecology**, v. 22, n. 1, p. 1–10, jan. 2006.

KALYAANAMOORTHY, S. et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature Methods**, v. 14, n. 6, p. 587–589, jun. 2017.

KASSO, M.; BALAKRISHNAN, M. Ecological and Economic Importance of Bats (Order Chiroptera). **ISRN Biodiversity**, v. 2013, p. e187415, 10 nov. 2013.

KIM, J. Y.; PARK, Y. C. Gene organization and characterization of the complete mitogenome of Hypsugo alaschanicus (Chiroptera: Vespertilionidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 16325–16331, 2015.

KIM, Y. M. et al. Complete mitochondrial genome of the Hodgson's bat Myotis formosus (Mammalia, Chiroptera, Vespertilionidae). **Mitochondrial DNA**, v. 22, n. 4, p. 71–73, 1 ago. 2011.

KUMAR, S.; SUBRAMANIAN, S. Mutation rates in mammalian genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 2, p. 803–808, 22 jan. 2002.

KUNZ, T. H. et al. Ecosystem services provided by bats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, p. 1–38, mar. 2011.

LACK, J. B. et al. Molecular phylogenetics of Myotis indicate familial-level divergence for the genus Cistugo (Chiroptera). **Journal of Mammalogy**, v. 91, n. 4, p. 976–992, 16 ago. 2010.

LACKI, M. J.; HAYES, J. P.; KURTA, A. **Bats in Forests: Conservation and Management**. [s.l.] JHU Press, 2007.

LAINE, V. N. et al. Whole-genome Analysis Reveals Contrasting Relationships Among Nuclear and Mitochondrial Genomes Between Three Sympatric Bat Species. **Genome Biology and Evolution**, v. 15, n. 1, p. evac175, 4 jan. 2023.

LUO, B. et al. Wing morphology predicts geographic range size in vespertilionid bats. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4526, 14 mar. 2019.

MARTINS, F. M. et al. Phylogeography of the common vampire bat (Desmodus rotundus): Marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 294, 20 dez. 2009.

MEGANATHAN, P. R. et al. Complete mitochondrial genome sequences of three bats species and whole genome mitochondrial analyses reveal patterns of codon bias and lend support to a basal split in Chiroptera. **Gene**, v. 492, n. 1, p. 121–129, 15 jan. 2012.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 11 fev. 1988.

MORRISON, E. B.; LINDELL, C. A. Birds and bats reduce insect biomass and leaf damage in tropical forest restoration sites. **Ecological Applications**, v. 22, n. 5, p. 1526–1534, 2012.

MURRAY, S. W. et al. Molecular phylogeny of hipposiderid bats from Southeast Asia and evidence of cryptic diversity. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 2, p. 597–611, 1 fev. 2012.

MURRAY, S. W. et al. Molecular phylogeny of hipposiderid bats from Southeast Asia and evidence of cryptic diversity. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 2, p. 597–611, 1 fev. 2012.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet.journal, v. 17, n. 1, p. 10–12, 2 maio 2011.

MEGANATHAN, P. R. et al. Complete mitochondrial genome sequences of three bats species and whole genome mitochondrial analyses reveal patterns of codon bias and lend support to a basal split in Chiroptera. Gene, v. 492, n. 1, p. 121–129, 15 jan. 2012.

MIES, R.; KURTA, A.; KING, D. G. Eptesicus furinalis. Mammalian Species, n. 526, p. 1–7, 17 maio 1996.

MORATELLI, R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Métodos e aplicações da citogenética na taxonomia de morcegos brasileiros. Em: [s.l: s.n.]. p. 197–218.

NAM, T. W. et al. Complete mitochondrial genome of the serotine bat (Eptesicus serotinus) in Korea. Mitochondrial DNA, v. 26, n. 3, p. 459–460, 4 maio 2015.

NABHOLZ, B.; GLÉMIN, S.; GALTIER, N. The erratic mitochondrial clock: variations of mutation rate, not population size, affect mtDNA diversity across birds and mammals. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 54, 10 mar. 2009.

NORBERG, U. M.; RAYNER, J. M. V.; LIGHTHILL, M. J. Ecological morphology and flight in bats (Mammalia; Chiroptera): wing adaptations, flight performance, foraging strategy and echolocation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 316, n. 1179, p. 335–427, 16 set. 1987.

]
YAMAZAKI, H.; SHIMADA, T. Progesterone and Testosterone Hydroxylation by Cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in Human Liver Microsomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 346, n. 1, p. 161–169, 1 out. 1997.

PEIXOTO, F. P.; VILLALOBOS, F.; CIANCIARUSO, M. V. Phylogenetic conservatism of climatic niche in bats. **Global Ecology and Biogeography**, v. 26, n. 9, p. 1055–1065, 2017.

PEREIRA, M. J. R.; PALMEIRIM, J. M. Latitudinal Diversity Gradients in New World Bats: Are They a Consequence of Niche Conservatism? **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69245, 23 jul. 2013.

PINZARI, C. A. et al. Analysis of Genomic Sequence Data Reveals the Origin and Evolutionary Separation of Hawaiian Hoary Bat Populations. **Genome Biology and Evolution**, v. 12, n. 9, p. 1504–1514, 1 set. 2020.

PLATT, R. N., II et al. Conflicting Evolutionary Histories of the Mitochondrial and Nuclear Genomes in New World Myotis Bats. **Systematic Biology**, v. 67, n. 2, p. 236–249, 1 mar. 2018.

PURVIS, A. PanTHERIA: a species-level database of life history, ecology, and geography of extant and recently extinct mammals. 5 ago. 2016.

PUMO, D. E. et al. Complete Mitochondrial Genome of a Neotropical Fruit Bat, Artibeus jamaicensis, and a New Hypothesis of the Relationships of Bats to Other Eutherian Mammals. **Journal of Molecular Evolution**, v. 47, n. 6, p. 709–717, 1 dez. 1998.

RAMBAUT, A. et al. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 901–904, 1 set. 2018.

RAWAT, U. S.; AGARWAL, N. K. Biodiversity: Concept, threats and conservation. **Environment Conservation Journal**, v. 16, n. 3, p. 19–28, 15 dez. 2015.

RICCUCCI, M.; LANZA, B. Bats and insect pest control: a review. v. 17, p. 161–169, 7 out. 2018.

RUEDI, M. et al. A new genus and species of vespertilionid bat from the Indomalayan Region. **Journal of Mammalogy**, v. 99, n. 1, p. 209–222, 1 fev. 2018.

SÁNCHEZ, R. T. et al. A new species of Eptesicus (Chiroptera, Vespertilionidae) from Argentina. **Journal of Mammalogy**, v. 100, n. 1, p. 118–129, 28 fev. 2019.

SANJUÁN, R. et al. Viral Mutation Rates. **Journal of Virology**, out. 2010.

SHEN, Y.-Y. et al. Adaptive evolution of energy metabolism genes and the origin of flight in bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 19, p. 8666–8671, 11 maio 2010.

SHI, J. J.; RABOSKY, D. L. Speciation dynamics during the global radiation of extant bats. **Evolution**, v. 69, n. 6, p. 1528–1545, 2015.

SNIEGOWSKI, P. D. et al. The evolution of mutation rates: separating causes from consequences. **BioEssays**, v. 22, n. 12, p. 1057–1066, 2000.

SOTO-CENTENO, J. A.; STEADMAN, D. W. Fossils reject climate change as the cause of extinction of Caribbean bats. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 7971, 22 jan. 2015.

SPAdes – Centro de Biotecnologia Algorítmica. , [s.d.]. Disponível em: <http://cab.spbu.ru/software/spades/>. Acesso em: 2 mar. 2022

STADELMANN, B. et al. Molecular phylogeny of New World Myotis (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, n. 1, p. 32–48, abr. 2007.

TALAVERA, G.; CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**, v. 56, n. 4, p. 564–577, ago. 2007.

TRIFINOPOULOS, J. et al. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W232–W235, 8 jul. 2016.

VALENTE, L.; ETIENNE, R. S.; DÁVALOS, L. M. Recent extinctions disturb path to equilibrium diversity in Caribbean bats. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 2, p. 1–7, 9 jan. 2017.

VARZINCZAK, L. H.; MOURA, M. O.; PASSOS, F. C. Shifts to multiple optima underlie climatic niche evolution in New World phyllostomid bats. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 128, n. 4, p. 1008–1020, 6 dez. 2019.

VARZINCZAK, L. H.; MOURA, M. O.; PASSOS, F. C. Strong but opposing effects of climatic niche breadth and dispersal ability shape bat geographical range sizes across phylogenetic scales. **Global Ecology and Biogeography**, v. 29, n. 11, p. 1929–1939, 2020.

VARZINCZAK, L. H.; MOURA, M. O.; PASSOS, F. C. Strong but opposing effects of climatic niche breadth and dispersal ability shape bat geographical range sizes across phylogenetic scales. **Global Ecology and Biogeography**, v. 29, n. 11, p. 1929–1939, 2020.

VOLLETH, M.; HELLER, K.-G. Phylogenetic relationships of vespertilionid genera (Mammalia: Chiroptera) as revealed by karyological analysis. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 32, n. 1, p. 11–34, 27 abr. 2009.

WIENS, J. J.; GRAHAM, C. H. Niche Conservatism: Integrating Evolution, Ecology, and Conservation Biology. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 36, n. 1, p. 519–539, 2005.

WILLIAMS, D. TAXONOMIC AND KARYOLOGIC COMMENTS ON SMALL

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference**. [s.l.] JHU Press, 2005.

CHENG, Z. et al. A case of epimeletic behavior and associated acoustic records of Indo-Pacific humpback dolphins (Sousa chinensis). **Journal of Mammalogy**, v. 99, n. 5, p. 1112–1119, 10 out. 2018.

GONCALVES, G.; QUINTELA, F.; FREITAS, T. **Mamíferos do Rio Grande do Sul**. [s.l: s.n.].

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868–877, 1 set. 1999.

JOSHI, N. A.; FASS, J. **Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33)[Software]**. , 2011.

JONES, G.; TEELING, E. C.; ROSSITER, S. J. From the ultrasonic to the infrared: molecular evolution and the sensory biology of bats. **Frontiers in Physiology**, v. 4, 2013.

JUSTE, J. et al. Mitochondrial DNA signatures at different spatial scales: from the effects of the Straits of Gibraltar to population structure in the meridional serotine bat (Eptesicus isabellinus). **Heredity**, v. 103, n. 2, p. 178–187, 2009.

JUSTE, J. et al. Phylogeny and systematics of Old World serotine bats (genus *Eptesicus* , Vespertilionidae, Chiroptera): an integrative approach. **Zoologica Scripta**, v. 42, n. 5, p. 441–457, set. 2013.

LU, G. et al. Phylogeography of the Rickett's big-footed bat, Myotis pilosus(Chiroptera: Vespertilionidae): a novel pattern of genetic structure of bats in China. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 241, 5 nov. 2013.

ZHANG, G. et al. Comparative Analysis of Bat Genomes Provides Insight into the Evolution of Flight and Immunity. **Science**, v. 339, n. 6118, p. 456–460, 25 jan. 2013.

6. APÊNDICES

Tabela S1: Link de acesso Genbank para os genomas mitocondriais de morcegos Vespertilionidae.

Espécies	Link de acesso do Genbank			
Chalinolobus tuberculatus	NC_002626.1	AF321051.1		
Eptesicus serotinus	NC_022474.1	KF111725.1		
Eudiscopus denticulus	MW085031.1			
Hypsugo alaschanicus	NC_029939.1	MF459671.1	MK135784.1	
Lasionycteris noctivagans	NC_050995.1			
Lasiurus borealis	NC_016873.1			
Myotis petax	KT199099.1			
Myotis ricketti	NC_056111.1			
Murina cyclotis	MK747248.1			
Murina huttoni	KU521385.1			
Murina leucogaster	NC_025949.1	KM893454.1		
Murina shuipuensis	MK747249.1			
Murina ussuriensis	NC_021119.1	JX872285.1		
Myotis albescens	NC_036327.1	MF143497.1		
Myotis atacamensis	NC_036324.1	MF143493.1		
Myotis auriculus	NC_036320.1			
Myotis bechsteinii	NC_034227.1			
Myotis blythii	MT588108.1			
Myotis bombinus	NC_029342.1	MT985383.1	KT818621.1	
Myotis brandtii	NC_025308.1	KM199849.1	KT210199.1	
Myotis davidii	NC_025568.1	KM233172.1		
Myotis dominicensis	NC_036312.1	MF143467.1		
Myotis evotis	NC_036313.1	MF143468.1		
Myotis formosus	NC_015828.1			
Myotis frater	NC_041638.1	MH177276.1		
Myotis horsfieldii	NC_036325.1	MF143494.1		
Myotis ikonnikovi	NC_022698.1	KF111724.1		
Myotis keaysi	NC_036314.1	MF143477.1		
Myotis leibii	NC_036321.1	MF143488.1		
Myotis lucifugus	NC_029849.1	KP273591.1		
Myotis macrodactylus	NC_022694.1	KF440685.1		
Myotis martiniquensis	NC_036328.1	MF143498.1		
Myotis melanorhinus	MF143489.1			
Myotis muricola	NC_029422.1			
Myotis myotis	KT901455.1			
Myotis nigricans	NC_036318.1	MF143484.1	MF143495.1	
Myotis oxyotus	NC_036316.1	MF143479.1		
Myotis petax	NC_027973.1	KT199099.1	KT199102.1	KT199101.1
Myotis ricketti	MN245054.1			
Myotis riparius	NC_036317.1			
Myotis ruber	NC_036315.1			
Myotis septentrionalis	NC_049871.1	MK547202.1		
Myotis thysanodes	NC_036323.1	MF143492.1		
Myotis vivesi	MF143476.1			
Myotis volans	NC_036326.1	MF143496.1		

Espécies	Link de acesso do Genbank	
Myotis yumanensis	NC_036319.1	
Nyctalus aviator	MK167360.1	
Nyctalus noctula	NC_027237.1	
Nyctalus plancyi	NC_041160.1	
Pipistrellus abramus	NC_005436.1	AB061528.1
Pipistrellus coromandra	NC_029191.1	KP688404.1
Pipistrellus kuhlii	CM024384.1	KU058655.1
Pipistrellus pipistrellus	LR862378.1	
Pipistrellus pygmaeus	MN122927.1	
Plecotus auritus	NC_015484.1	HM164052.1
Plecotus macrobullaris	NC_027977.1	KR134404.1
Plecotus rafinesquii	NC_016872.1	JN209841.1
Tylonycteris fulvida	MZ457524.1	
Vespertilio murinus	NC_033347.1	KU161588.1
Vespertilio sinensis	NC_024558.1	KM092493.1

Tabela S2: Compilação de gêneros fósseis e registros temporais usados neste estudo família Vespertilionidae.

Model parameters for Bayesian Analysis						
Fossil Age (Ma)	**Median**	**M**	**S**	**Offset**	**fossil type**	**References**
Khonsunycteris >34	36,9	5	0,8	33,9	crown	Gunnell et al. 2008
Lasiurus >11.6	16,5	8	1	11,6	stem	Eiting and Gunnell 2009
Corynorhinus >11.6	16,5	8	1	11,6	stem	Handley 1959; Topál 1989a, 1989b
Lasionycteris >5.3	11,4	9	1	5,3	stem	Dalquest 1978
Vespertilio >16	18,4	4	1	16	stem	Engesser and Ziegler 1996; Rossina et al. 2006
Kerivoula >5.3	9,55	7	1	5,3	stem	Horáček 1986; Cermák et al. 2007
Submyotodon >11	15,2	7	1	11	stem	Ziegler 2003
Myotis paradaubentonii> 5	7,12	3	1	5,3	stem	Topál 1983; Horáček 2001