

***Pipistrellus pipistrellus* e *P. pygmaeus* em Portugal**

Revisão do Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal



Relatório Final

Patrícia Salgueiro, Ana Rainho e Jorge M. Palmeirim

Dezembro 2002

Introdução

O morcego-anão é uma espécie largamente distribuída na Europa sendo o morcego mais comum na Península Ibérica (Palmeirim 1990). Apesar da sua vasta distribuição e abundância, a taxonomia desta espécie nunca esteve bem resolvida, sendo frequentemente sugeridas subespécies (p.ex. Cabrera 1904) e identificadas grandes variações na morfologia e vocalização dos indivíduos (p.ex. Ahlén 1981, Miller & Degn 1981, Zingg 1990).

Recentemente, o estudo mais detalhado das vocalizações do morcego-anão, revelou uma distribuição bimodal da frequência emitida por indivíduos de colónias diferentes (Jones & Parijs 1993, vd. Figura 4), com média nas frequências 46 e 55 kHz. De forma a confirmar o isolamento reprodutor entre os dois grupos fónicos, foram também analisados os seus chamamentos nupciais – sons emitidos pelos machos para atrair as fêmeas durante a época das cópulas (Barlow & Jones 1997). Os resultados suportaram a hipótese de isolamento reprodutor, indicando diferenças entre as vocalizações de acasalamento dos dois grupos. A morfologia dos mesmos grupos foi também analisada, porém sem resultados aplicáveis (Jones & Parijs 1993, Barlow & Jones 1996).

Barratt *et al.* (1997) confirmaram a existência de duas espécies crípticas através da sequenciação de ADN mitocondrial. O nível de divergência nas sequências do gene citocromo *b* era dez vezes maior entre indivíduos dos dois tipos fónicos que entre indivíduos do mesmo tipo. Posteriormente, Jones & Barratt (1999) sugeriram o uso do nome *Pipistrellus pipistrellus* (Schereber, 1774) para o grupo fónico de 46 kHz e *P. pygmaeus* (Leach, 1825) para o grupo fónico de 55 kHz. A presença das duas espécies está agora em estudo em diversos países. Em Portugal, dados genéticos confirmaram a presença de *P. pygmaeus* (Barratt *et al.* 1997), embora os registos sonoros obtidos em diversos trabalhos sugiram que a sua distribuição no País seja mais alargada. No entanto, a sobreposição das características das vocalizações desta espécie com *P. kuhlii* e *P. pipistrellus* dificulta a confirmação desta última no nosso país.

Objectivo:

Integrado na revisão do Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal, pretende-se neste trabalho esclarecer se a espécie actualmente denominada como *Pipistrellus pipistrellus* (i.e. grupo fónico 46 kHz) existe no nosso país.

Metodologia

Conjugando a reduzida informação disponível acerca da distribuição desta nova espécie na Europa (Barratt *et al.* 1997, Mayer & Helversen 2001a), com a abundância de *Pipistrellus* a emitir nos 46 kHz no Norte do país, considerámos esta região como prioritária na prospecção desta espécie. Com o objectivo de capturar exemplares de *Pipistrellus*, entre Setembro e Outubro de 2002, foram visitados os abrigos conhecidos e novos abrigos nesta região, bem como montadas redes em locais propícios para a concentração de morcegos.

No total foram capturados 16 indivíduos em sete localidades distribuídas pelo Parque Nacional da Peneda-Gerês (PNPG), Parque Natural de Montesinho (PNM), Parque Natural do Douro Internacional (PNDI) e Área de Paisagem Protegida da Serra do Açor (APPSA).

A Tabela 1 contém a listagem dos locais onde foram capturados indivíduos, registadas as suas vocalizações e recolhidas amostras de tecido alar.

Tabela 1 Lista de indivíduos capturados, dos respectivos locais de captura e da frequência das vocalizações emitidas.

Nº do indivíduo	Local*	Frequência (Hz)
P 1	APPSA	-
P 2	APPSA	-
P10	PNPG	-
P11	PNM	46
P14	PNM	49
P15	PNM	47
P17	PNM	48
P18	PNM	46
P19	PNM	48
P20	PNM	47
P21	PNM	47
P22	PNM	49
P24	PNDI	50
P25	PNDI	49
P26	PNDI	46
P27	PNDI	46
P28	PNDI	-
P29	PNDI	-
P30	PNPG	-

*Parque Nacional da Peneda-Gerês (PNPG), Parque Natural de Montesinho (PNM), Parque Natural do Douro Internacional (PNDI) e Área de Paisagem Protegida da Serra do Açor (APPSA).

Análise acústica

As vocalizações foram registadas através de um detector de ultra-sons (Pettersson D240). Para além do registo das vocalizações dos indivíduos capturados, foram também registadas vocalizações de outros indivíduos em voo, bem como de alguns chamamentos nupciais. As características das suas vocalizações foram detalhadamente analisadas, usando para tal um programa de análise de som (Avisoft, SASLab Pro).

Análise genética

Após captura, foi retirada uma pequena porção de tecido alar, seguindo um método não destrutivo (Worthigton *et al.* 1996). ADN genómico foi extraído a partir desta amostra, seguindo uma versão alterada do protocolo descrito por Miller *et al.* (1988), adicionando um passo de extracção com clorofórmio / álcool isoamílico (24/1) ao protocolo original. O ADN, precipitado em isopropanol e depois em etanol 80%, foi dissolvido em água ultra-pura. A qualidade e quantidade do ADN extraído foram verificadas em gel horizontal de agarose (0.8%, 1X TBE) corado com brometo de etídio, recorrendo à iluminação ultravioleta.

O gene mitocondrial ND1 foi amplificado por PCR, utilizando os primers ER65 e ER66 (Petit *et al.* 1999).

As reacções de PCR foram preparadas em volumes de 50 µl conforme as seguintes condições: 5 µl de ADN, 2.5mM de MgCl₂, 0.2 µM de cada primer, 0.2 µM de cada dNTP, 1.5 unidades de *Taq* ADN Polimerase (Qiagen) com o respectivo tampão e a solução Q. A reacção de PCR iniciava-se com uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 min., seguido de 40 ciclos de: desnaturação a 93°C de 45", ligação a 50°C de 45" e extensão a 72 °C de 90". Uma extensão final a 72 °C durante 5 min terminava cada reacção. Os produtos de PCR eram visualizados por electroforese em gel horizontal de agarose a 1% corado com brometo de etídio, recorrendo à iluminação ultravioleta. Restos de nucleótidos e primers foram removidos utilizando colunas para centrifugação QIAquick (Qiagen). 30 µl (10 –30 ng) dos produtos purificados eram sequenciados com o primer ER70 (Petit *et al.* 1999). A reacção de sequenciação consistia em 25 ciclos de: 30" a 96 °C, 20" a 50 °C e 4 min a 60°C num sequenciador Perkin Elmer.

As seqüências obtidas foram alinhadas e editadas recorrendo ao programa Sequencher 3.0 (Gene Codes Corp.). O alinhamento das seqüências foi inequívoco, pois não foram detectadas inserções ou deleções.

As primeiras 690 bases do gene ND1 foram usadas em comparações de seqüências par a par. Utilizando o programa Modeltest 3.0 (Posada & Crandall 1998), foi determinado o modelo evolutivo do ADN de Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa *et al.* 1985) como sendo o mais

adequado aos dados. Para a reconstrução das relações filogenéticas, recorreu-se ao método algorítmico de *neighbour-joining* baseado no modelo evolutivo acima mencionado e também ao método de máxima parcimónia. A robustez dos ramos internos das árvores resultantes dos dois métodos de análise foi avaliado pela técnica de *bootstrap* com 1000 replicados. Todas as análises foram efectuadas com haplótipos únicos usando o software PAUP (versão 4.0b, actualizada de Swofford 1998).

Para comparação com as sequências obtidas, recorreu-se às sequências publicadas no trabalho de Mayer & Helversen (2001b) disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e listadas na Tabela 2. Sequências da espécie *P. kuhli* foram utilizadas como *outgroup*.

Tabela 2 Lista de sequências de ND1 de *Pipistrellus pipistrellus*, *P. pygmaeus* e *P. kuhli* (Mayer & Helversen 2001b) disponíveis no GenBank e utilizadas neste estudo

Espécie	Números de acesso	Possível origem (Mayer & Helversen 2001b)
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	AF401379 - AF401394	Alemanha, Espanha, França, Grécia, Israel e Turquia
<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	AF401401 - AF401413	Alemanha, Grécia, Rússia, Suécia e Ucrânia
<i>Pipistrellus kuhli</i>	AF401414 - AF401416	Grécia

Resultados e Discussão

Análise acústica

Todas as vocalizações de *Pipistrellus* registadas durante este trabalho revelaram frequência principal entre 37 e 51 kHz, com média e moda nos 46 kHz. Estes resultados contrastam com os obtidos por Rainho (1995), num trabalho realizado a Sul do Tejo, onde a frequência principal dos *Pipistrellus* observados variou entre 46 e 61 kHz, com média e moda nos 52 kHz (Figura 1).

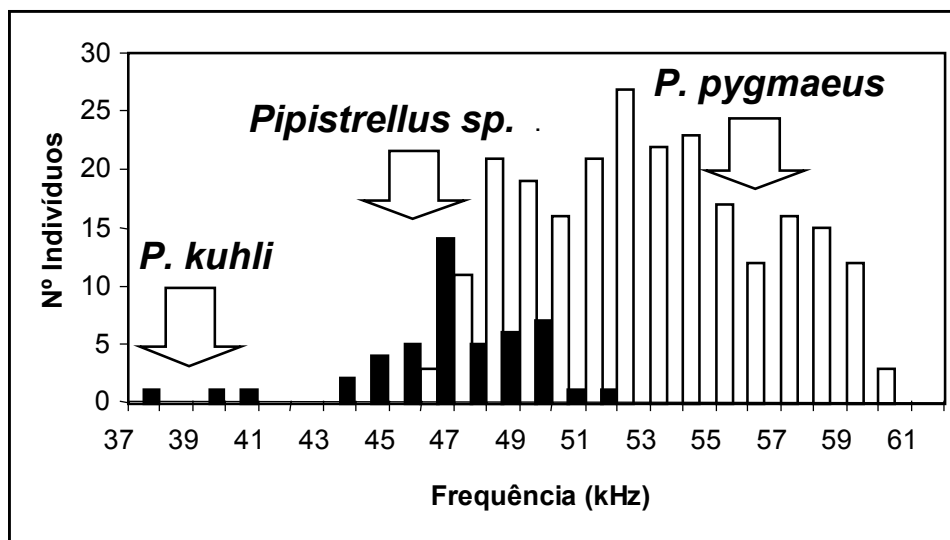


Figura 1. Histograma das frequências principais de indivíduos detectados durante este trabalho na região Norte do País (a preto) e detectados por Rainho (1995) no Sul do País (a branco).

Apesar do reduzido volume de dados obtidos no Norte do País e de uma aparente maior sobreposição nas frequências utilizadas, estes dados em conjunto, sugerem uma distribuição bimodal idêntica à encontrada por Jones & Parijs (1993) na Grã-Bretanha (Figura 2).

De salientar que a sobreposição de frequências observadas na Grã-Bretanha se verificam nos mesmo intervalos que em Portugal, apenas num número de efectivos muito inferior.

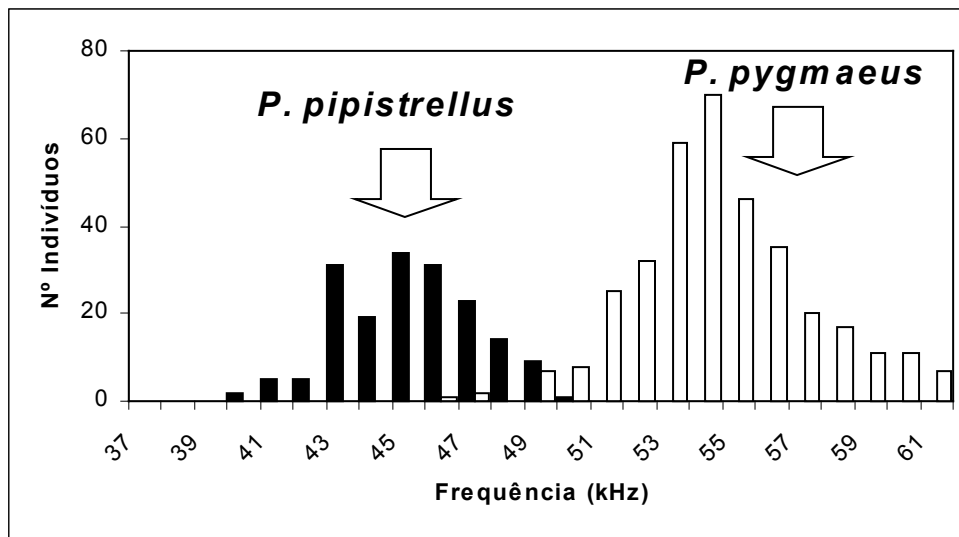


Figura 2. Histograma das frequências principais de indivíduos detectados em 12 abrigos de criação em Inglaterra (adaptado de Jones & Parijs, 1993)

No que se refere aos chamamentos nupciais, diversos autores descreveram já este tipo de vocalizações para as três espécies, sugerindo várias características como discriminantes (Tabela 3).

Tabela 3. Características sonoras dos chamamentos nupciais e sociais das espécies de *Pipistrellus* em questão.

Espécie	<i>P. pygmaeus</i>	<i>P. pipistrellus</i>	<i>P. kuhlii</i>
Nº pulsos	2 a 4	3 a 5	2 a 5
Duração (ms)	26.8 ± 1.9	30.1 ± 2.9	34
Freq. Mínima. (kHz)	16.3 ± 1.4	14.3 ± 0.59	-
Freq. Máxima (kHz)	38.9 ± 2.5	29.7 ± 1.6	16.6
Freq. Principal (kHz)	20.8 ± 1.4	17.9 ± 0.9	variável
Autores	Barlow & Jones 1997	Barlow & Jones 1997	Russo & Jones 1999

Segundo estes autores, os chamamentos de *P. kuhlii* são mais longos e de frequências mais baixas que os das outras duas espécies, não se verificando também sobreposição dos valores de frequência máxima para *P. pipistrellus* e *P. pygmaeus*. Estas surgem assim como potenciais características diagnosticantes.

Assim, analisando a distribuição das frequências mínima e máxima dos chamamentos sociais registados durante este trabalho (Figura 3) verificamos que estes apenas se sobrepõem aos intervalos referidos para *P. pipistrellus*. Os valores de frequência máxima indicados para *P.*

pygmaeus e *P. kuhlii* estão respectivamente acima e abaixo dos valores obtidos para todas as vocalizações registadas.

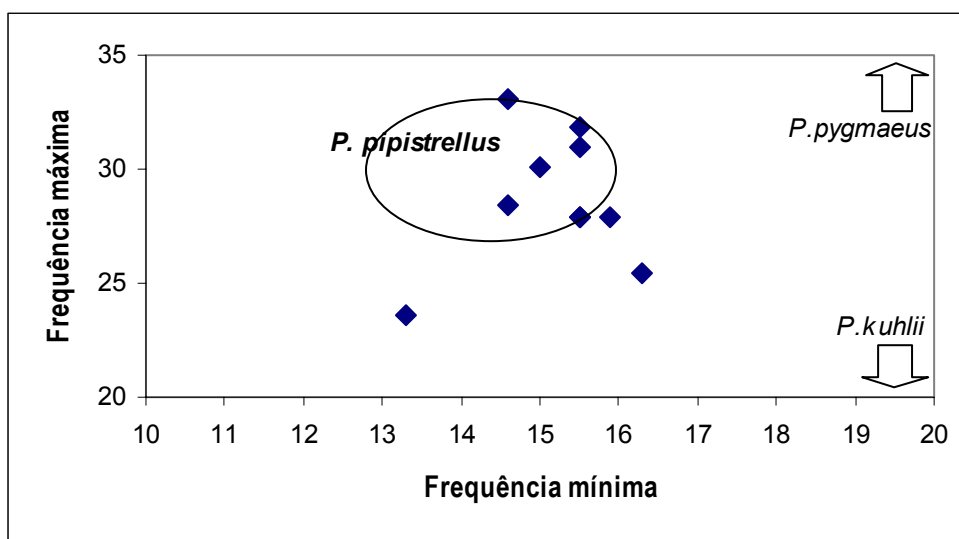


Figura 3. Distribuição dos chamamentos sociais registados neste trabalho segundo as suas frequências máxima e mínima. A área a sombreado limita o intervalo destas variáveis para *P. pipistrellus* segundo Barlow & Jones (1997). A frequência máxima referida para *P. pygmaeus* e *P. kuhlii* está respectivamente acima e abaixo do intervalo apresentado na escala do gráfico (cf. Tabela 3).

Também evidente na Figura 3 é que as variáveis de algumas das vocalizações obtidas não inserem nos intervalos referidos para as três espécies. Este facto resulta, provavelmente, das vocalizações descritas por Barlow & Jones (1997) se referirem apenas a indivíduos detectados na Grã-Bretanha, e não cobrirem deste modo possíveis variações geográficas nas vocalizações das espécies na sua área de distribuição.

Análise genética

Dos 19 indivíduos sequenciados, obtiveram-se sete haplótipos (PPor1-PPor7) distintos por cinco mutações, das quais quatro eram transições e uma transversão. O indivíduo com o haplótipo Ppor8 pertencia à espécie *P. kuhlii*.

As árvores filogenéticas obtidas com ambos os métodos de distância e máxima parcimónia, agruparam todos os haplótipos de Portugal com as sequências de *P. pipistrellus* do Genbank, com valores elevados de bootstrap (92% e 100% respectivamente, ver Figuras 4 e 5). Deste modo, confirma-se inequivocamente a presença desta espécie em Portugal.

Da comparação par a par entre todas as sequências, os resultados revelaram, como esperado (Barrat *et al.* 1997, Mayer & Helversen 2001a), reduzida divergência intra-específica e

acentuada divergência inter-específica. Na espécie *P. pipistrellus*, as sequências eram idênticas ou diferiam até 0.02%. Por outro lado, quando comparadas as sequências das duas espécies, estas divergiam em cerca de 10%, reforçando a separação clara entre as duas espécies.

No trabalho de Barratt *et al.* (1997), a única amostra portuguesa era de um exemplar de *P. pygmaeus* capturado perto de Setúbal. Neste trabalho, todos os indivíduos capturados, fundamentalmente no Norte do País, são *P. pipistrellus*.

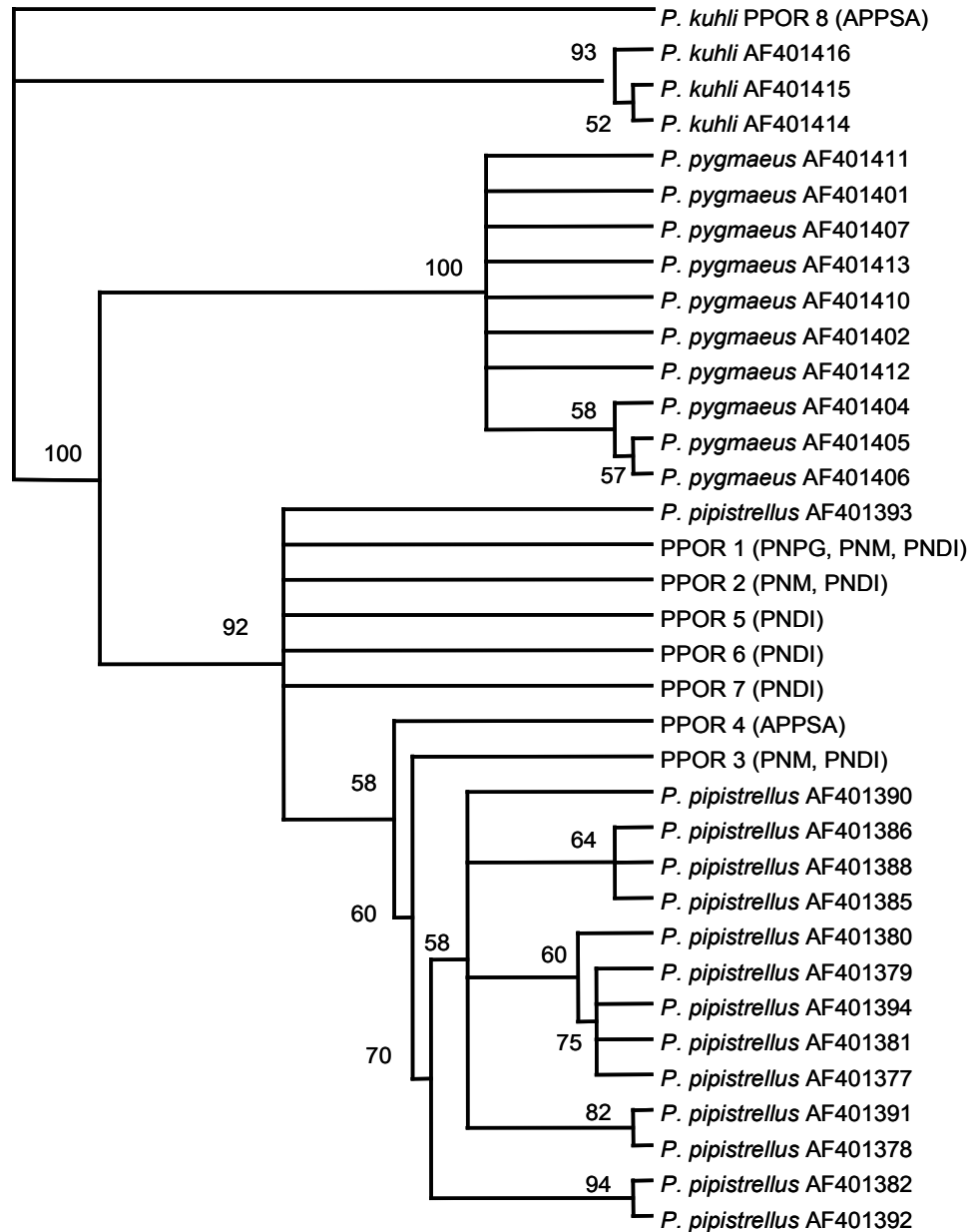


Figura 4. Árvore filogenética obtida pelo método *neighbour-joining* usando o modelo evolutivo Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa *et al.* 1985). Os valores de *bootstrap* que suportam cada ramo estão indicados.

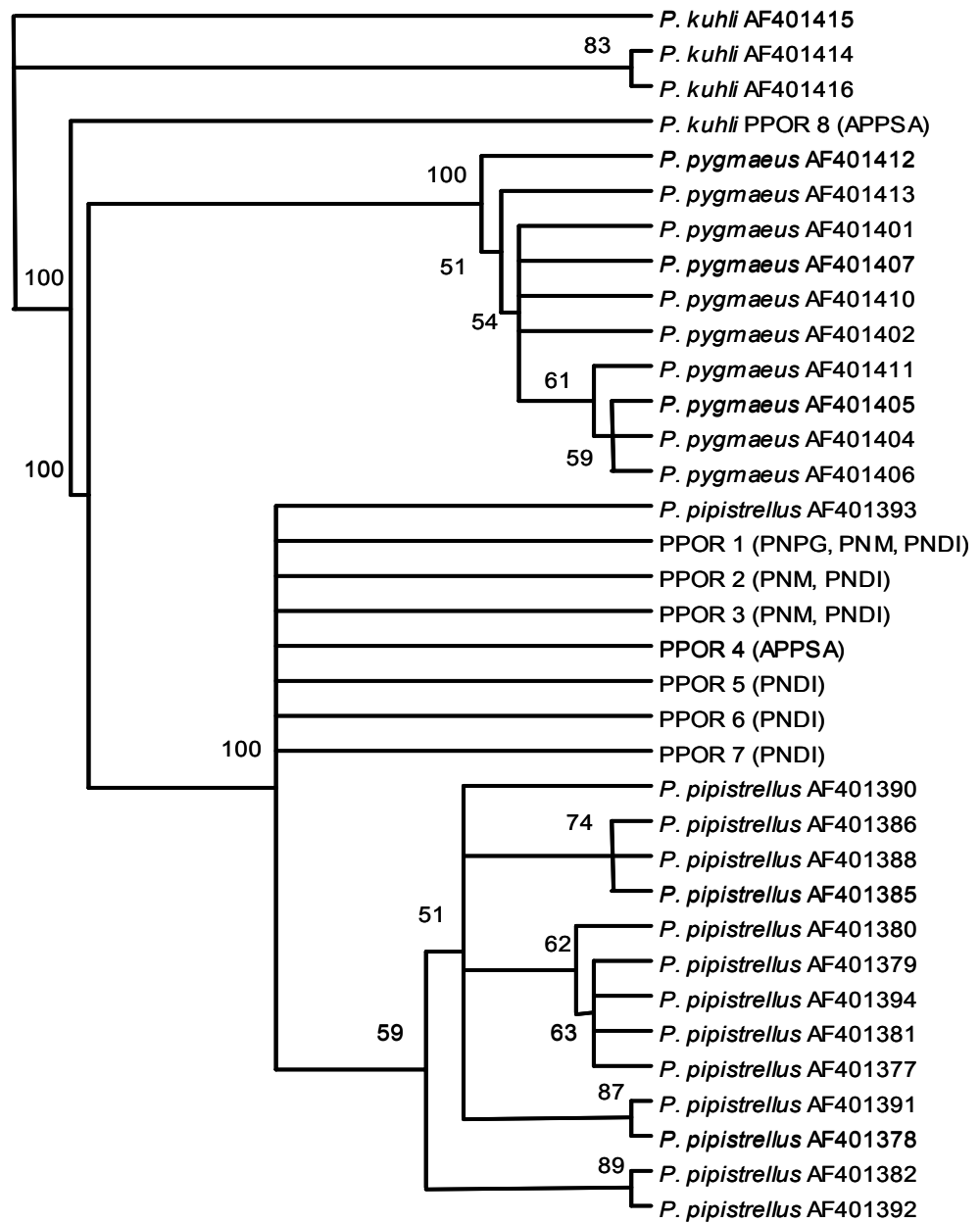


Figura 5. Árvore filogenética obtida pelo método parcimónia. Os valores de *bootstrap* que suportam cada ramo estão indicados.

Considerações Finais

A identificação rigorosa das espécies é essencial para o seu estudo e protecção.

No presente trabalho, a análise do ADN mitocondrial revelou-se um instrumento muito útil na identificação de espécies, e permitiu confirmar a presença em Portugal da espécie *P. pipistrellus*.

Também a análise dos registos sonoros obtidos revelou fortes indícios da presença de *P. pipistrellus* na região Norte do País. Esta análise sugere ainda que a espécie *P. pygmaeus*, presente na região Sul, será uma espécie menos abundante no Norte podendo a situação inversa verificar-se para *P. pipistrellus*.

Na continuidade deste trabalho, deverão ser fomentados estudos que permitam definir as áreas de distribuição e zonas de simpatria das duas espécies no país, bem como, a situação das suas populações.

Agradecimentos

Ao Dr. Manuel Ruedi do Museu de História Natural de Genebra, ao Dr. Henrique Carvalho do Parque Nacional da Peneda-Gerês e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Referências bibliográficas

- Ahlén I. 1981. *Identification of bats in flight*. Swedish Soc. Cons. Nat. & Swedish Ass. Environ. Studies Cons. (Pubs.), 50 pp.
- Barratt E.M., Deaville R., Burland T.M., Bruford M.W., Jones G., Racey P.A., Wayne R.K. 1997. DNA answers the call of pipistrelle bat species. *Nature*, **38**: 138-139.
- Barlow K.E., Jones G. 1996. Morphological differences between two cryptic species of *Pipistrellus pipistrellus*. *Vllth Europ. Bat Res. Symp.*, **4**.
- Barlow K.E., Jones G. 1997. Differences in songflight calls and social calls between two phonic types of the vespertilionid bat *Pipistrellus pipistrellus*. *J. Zool., Lond.* **241**: 315-324.
- Cabrera A. 1904. Ensayo monográfico sobre los Quirópteros de España. *Memorias Soc. Española Hist. Nat.* **2**: 249-287.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, **21**: 160-174.
- Jones G., van Parijs S.M. 1993. Bimodal echolocation in pipistrelle bats: are cryptic species present? *Proc. R. Soc. Lond. B*, **215**: 119-125
- Jones G., Barratt E. 1999. *Vespertilio pipistrellus* Schereber, 1774 and *V. pygmaeus* Leach, 1825 (currently *Pipistrellus pipistrellus* and *P. pygmaeus*; Mammalia, Chiroptera): proposed designation of neotypes. *Bull. Zool. Nomenclat.* **56**: 182-186.
- Mayer F., Helversen O. von 2001a. Sympatric distribution of two cryptic bat species across Europe. *Biol. J. Linn Soc.* **74** (3): 365-374.
- Mayer F., Helversen O. von 2001b. Cryptic diversity in European bats. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **268**: 1825-1832.
- Miller L.A., Degn H.J. 1981. The acoustic behaviour of four species of vespertilionid bats studied in the field. *J. Comp. Physiol.* **142**: 67-74.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from Human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, **16**: 1215.
- Palmeirim J.M. 1990. Bats of Portugal: Zoogeography and Systematics. *Misc. Pub. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas*, **82**, 53pp.
- Petit E., Excoffier L., Mayer F. 1999. No evidence of bottleneck in the postglacial recolonization of Europe by the noctule bat (*Nyctalus noctula*). *Evolution*, **53** (4): 1247-1258.
- Posada D., Crandall K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**: 817-818.
- Rainho A. 1995. *Biótopos de alimentação de algumas espécies de morcegos presentes em quatro regiões a sul do Tejo*. Relatório de Estágio, 40 pp.

- Russo D., Jones G. 1999. The social calls of Kuhls's pipistrelles *Pipistrellus kuhlii* (Kuhl, 1819) : Structure and variation (Chiroptera: Vespertilionidae). *Abstracts of the VIIIth European Bat Research Symposium*: 59-80.
- Swofford D.L. 1998. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Worthigton Wilmer J.W., Barratt E.M. 1996. A non-lethal method of tissue sampling for genetic studies of chiropterans. *Bat Research News*, **37** (1): 1-4.
- Zingg P.E. 1990 Akustische artidentifikation von fledermausen (Mammalia: Chiroptera) in der Schweiz. *Rev. Suisse Zool.* **97**(2): 263-294