



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
E BIOLOGIA CELULAR**

RAMON EVERTON FERREIRA DE ARAÚJO

**ANÁLISE CITOGENÉTICA EM MORCEGOS DA FAMÍLIA EMBALLONURIDAE
(CHIROPTERA) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA ATRAVÉS DE CITOGENÉTICA
CLÁSSICA E MOLECULAR**

Belém

2011

RAMON EVERTON FERREIRA DE ARAÚJO

**ANÁLISE CITOGENÉTICA EM MORCEGOS DA FAMÍLIA EMBALLONURIDAE
(CHIROPTERA) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA ATRAVÉS DE CITOGENÉTICA
CLÁSSICA E MOLECULAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará (UFPA), como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka.

Belém

2011

RAMON EVERTON FERREIRA DE ARAÚJO

**ANÁLISE CITOGENÉTICA EM MORCEGOS DA FAMÍLIA EMBALLONURIDAE
(CHIROPTERA) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA ATRAVÉS DE CITOGENÉTICA
CLÁSSICA E MOLECULAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará (UFPA), como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Aprovada em 29 de Abril de 2011

BANCA AVALIADORA

**Profa. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**

**Profa. Dra. Maria Iracilda da Cunha Sampaio
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**

Belém

2011

*À minha família, em especial
minha mãe: Lígia Ferreira,
Pelo amor, incentivo e carinho...*

Agradecimentos

Acima de tudo, agradeço a Deus, autor da minha vida, a quem eu mais recorri, orando e pedindo ajuda durante esses anos, que por sinal não foram fáceis...

Muitas pessoas contribuíram para a realização deste trabalho. Sou muito agradecido aos meus professores: Dra. Cleusa Nagamachi e ao Dr. Júlio César Pieczarka, pela orientação, críticas científicas, amizade e principalmente à paciência que tiveram comigo, compreendendo todos os meus problemas particulares, agradeço de coração a confiança em meus trabalhos, espero um dia retribuir a altura.

Aos meus parceiros de laboratório: Anderson (Mardito pestilento) pela amizade, confiança e por todos os ensinamentos no campo e laboratório, sou muito grato a você meu amigo; Naty e Celina, pela grande amizade, carinho e principalmente por me fazer rir muito, muito mesmo. À Thayse, e Marlysson e Danillo (Negão da beterraba) pela parceria, pela grande amizade, me acompanhando e dividindo importantes momentos, desde os de alegria pelos resultados positivos aos de angústia pela falta deles.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para ampliar meus conhecimentos práticos e teóricos em laboratório, muito grato aos Professores: Renata Noronha, Susana Milhomem e Luís Reginaldo Rodrigues, aos técnicos: Conceição, por todas as lâminas e pipetas concedidas, à Shyrlei (zuzugu) obrigado pela agradável companhia e por todos os litrões de tampão crscrs e ao Jorge por todos os conselhos e críticas que sem sombra de dúvida me fizeram entender o trabalho em grupo e a seriedade no trabalho, mas principalmente por ser Paysandú, porque se ele não fosse...

À UFPA e ao CNPq, pelos auxílios financeiros concedidos;

A tia Ana do Restaurante Universitário, por facilitar nossas vidas durante as infinitas filas do dia a dia, fazendo sobrar um tempinho precioso para adiantar nossos trabalhos.

A toda minha família: Larissa (Mu) por sempre agüentar minhas ausências, “falta de tempo” e meus eternos “não’s”, obrigado por estar comigo e ser A grande namorada, amiga e companheira ao longo desses últimos 5 anos.

A TODA minha família: AVÓS, TIOS E TIAS, por absolutamente TUDO que fizeram para que eu chegasse aqui, apoio, incentivo, pelo carinho e cuidado durante todos esses anos.

Aos meus pais: P1 – Bernardo (*in memoriam*) por ser INCANSÁVEL em sua luta servindo de inspiração para minha vida, exemplo de retidão, sempre com um sorriso no rosto e jamais se abatendo nas desventuras da vida, obrigado por me ensinar a valorizar a VIDA, fique com Deus. P2 – Haroldo, por todo incentivo, suporte e amizade ao longo desses anos e minha mãe, a melhor do mundo, indispensável para que eu pudesse chegar até aqui, pelo apoio e amor incondicional, sem ela não sou ninguém; a meu irmão Renan por todos os momentos de descontração e ao meu lindo filhinho Chocolate, por sua fidelidade, carinho e companhia.

A todos os demais amigos da UFPa, que fizeram parte desse período, agradeço pelo carinho, companhia e amizade: Vergiana, Milla, Geovana, Willan, Fernando, Patrícia, Aduino, Cleusa, Julio, Renata, Susana, Jamilly, Anneyriane, Jorge, Conceição, Danillo, Natália, Thayse, Marlyson, Anderson, Shyrley me desculpem se esqueci alguém mas todos vocês são ou SERÃO importantes em minha vida SRCR**SCSR**SCRSRSCR.

*"Se diante de mim
Não se abrir o mar
Deus vai me fazer andar
Por sobre as águas"*

Inspiração de Deus.

RESUMO

Pela primeira vez foram estudadas citogeneticamente morcegos da família Emballonuridae provenientes da Amazônia brasileira. As espécies estudadas foram *Cormura brevirostris*-CBR ($2n=22$; NF=40), *Rhynchonycteris naso*-RNA ($2n=22$ e NF=36), *Saccopteryx canescens*-SCA ($2n=24$ e FN=38) e *Saccopteryx leptura*-SLE ($2n=28$ e NF=38), caracterizadas por bandeamento G, C, NOR e por Hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Em CBR os cariótipos encontrados apresentaram os mesmos números diplóide e fundamental já descritos na literatura. FISH com sondas de DNA ribossomal e impregnação com nitrato de prata revelaram dois sítios de NOR e hibridizações com sondas teloméricas evidenciaram marcações nos centrômeros de todos os cromossomos, exceto o Y. Através de estudos meióticos, bandeamentos cromossômicos e FISH utilizando sondas totais do cromossomo X de *Phyllostomus hastatus* (Chiroptera, Phyllostomidae) sugerimos que o par sexual dessa espécie é diferente daquele descrito na literatura. Células em diplóteno-diacinese apresentaram uma conformação em anel envolvendo quatro pares de cromossomos, sugerindo a ocorrência de múltiplas translocações recíprocas envolvendo esses cromossomos, fato esse raro em vertebrados e inédito em mamíferos eutérios. A análise de RNA, SCA e SLE indicam que os cariótipos de Emballonuridae são conservados mesmo comparando espécimes afastados geograficamente, mas a análise do bandeamento C indica que podem ocorrer variações intraespecíficas a nível de heterocromatina constitutiva. Pela primeira vez as regiões organizadoras de nucléolos foram descritas revelando marcações em um par de cromossomos em cada espécie analisada. A FISH com sondas de DNA Ribossomal 18S coincidiram com as marcações da prata. FISH com sondas teloméricas humanas revelaram marcações distais em todos os cromossomos. Esses trabalhos são importantes para compreender a biodiversidade de morcegos da região amazônica, bem como a compreensão da evolução cromossômica de Chiroptera.

PALAVRAS-CHAVE: Cromossomo, Emballonuridae, FISH, Biodiversidade.

ABSTRACT

This is the first description of the karyotypes of bats of the family Emballonuridae from the Brazilian Amazon region. The species studied were *Cormura brevirostris*-CBR (2n=22; NF=40), *Rhynchonycteris naso*-RNA (2n=22 and NF=36), *Saccopteryx canescens*-SCA (2n=24 and FN=38) and *Saccopteryx leptura*-SLE (2n=28 and NF=38), characterized by G-, C-banding, NOR-staining and Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH). In CBR the karyotypes found had the same diploid number and fundamental number than in literature. FISH with ribosomal DNA probes and Ag-NOR staining showed two NOR places. Hybridization with telomeric probes showed that the sequences were found in the centromeres of all chromosomes but the Y. Using meiotic studies, chromosome banding and FISH with a whole X chromosome probe from *Phyllostomus hastatus* (Chiroptera, Phyllostomidae) we suggest that the sex chromosome pair of this species is not the one described in the literature. Cells in diploid and diakinesis had a ring conformation with four chromosome pairs, what suggests multiple reciprocal translocations among these chromosomes, a very rare situation in vertebrates and never found in eutherian mammals. The analyses of RNA, SCA and SLE shows that the karyotypes of Emballonuridae are very conservative even when compared with samples collected geographically very far, but the C-banding analyses shows that it can happen intraspecific variations in the constitutive heterochromatin. For the first time the Nucleolar Organizer Regions were described, showing a stained pair of chromosomes on each analyzed species. The FISH with 18S rDNA probes agrees with the Ag-NOR staining. FISH with human telomeric probes showed hybridizations in the distal portion of all chromosomes. These works are important to understand the biodiversity of bats from the Amazon region, as well as the comprehension of the chromosomal evolution of Chiroptera.

KEYWORDS: Chromosome, Emballonuridae, FISH, Biodiversity.

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Figura 1	Diversidade de morcegos baseados no número de espécies por 500 Km ² através do mundo (adaptado de Findley, 1993). Gradientes de cores do branco (ausência de espécies) ao vermelho (120 espécies por 500 Km).	13
Figura 2	Representação esquemática de um morcego (Ilustração de Oscar A. Shibatta, retirado de Reis, <i>et al.</i> , 2007).	13
Figura 3	Diversos hábitos alimentares dos morcegos. Fotos retiradas de www.batcon.org	14
Figura 4	(A) <i>Pteropus giganteus</i> e (B) <i>Craseonycteris thonglongyai</i> retirado de www.morcegolivre.vet.br	15
Figura 5	Reconstrução do padrão temporal de diversificação das principais linhagens de morcego. Linhas espessas indicam tempo de mudança documentado por registro fóssil. Linhas pontilhadas representam relações filogenéticas presumidas por outras datações. Barras verticais indicam as subordens de Chiroptera e infra-ordens dentro de Microchiroptera. Retirado de Simmons (2005a).	17
Figura 6	Reconstrução do padrão temporal de diversificação das principais linhagens de morcego baseado em arvores filogenéticas geradas a partir de dados moleculares. Linhas espessas indicam tempo de mudança documentado por registro fóssil. Linhas pontilhadas representam relações filogenéticas presumidas por dados, principalmente moleculares. Linhas verticais indicam as novas denominações para as subordens de Chiroptera. Retirado de Simmons (2005a).	18
Figura 7	Representantes de morcegos da família Emballonuridae. (A) <i>Rhynchonycteris naso</i> , (B) <i>Diclidurus albus</i> , (C) <i>Cormura brevirostris</i> , (D) <i>Peropteryx kappleri</i> , (E) <i>Saccopteryx bilineata</i> , (F) <i>Saccopteryx leptura</i> . Fotos retiradas de http://www.nouragues.cnrs.fr/species_lists/bat_web/thumb.html	19
Figura 8	<i>Cormura brevirostris</i> . Fotos Retiradas de picasaweb.google.com	21
Figura 9	Espécimes de <i>Saccopteryx leptura</i> . Retirado de www.morcegolivre.vet.br	22
Figura 10	Espécimes de <i>Saccopteryx canescens</i> . Fotos retiradas de http://www.nouragues.cnrs.fr/species_lists/bat_web/thumb.html	22
Figura 11	(A) Espécime de <i>Rhynchonycteris naso</i> , (B) Abrigo e disposição interespaçada ao longo de uma linha vertical	23
Figura 12	Representação esquemática da técnica de hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH). Adaptado de Guerra (2004).	29

Figura 13 Cariótipo G bandeado de *Taphozus melanopogon* retirado de Mao *et al.* 32 (2008) evidenciando o segmento 13 – 8b – 4c que é um dos segmentos plesiomórficos para o grande grupo Yangochiroptera, segundo Volleth *et al.* (2002).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ORDEM CHIROPTERA	12
1.2	ORIGEM E EVOLUÇÃO DA ORDEM CHIROPTERA	15
1.3	A FAMÍLIA EMBALLONURIDAE	19
1.3.1	Classificação da Família Emballonuridae	20
1.3.2	Gênero <i>Cormura</i> , Peters, 1965	21
1.3.3	Gênero <i>Saccopteryx</i> Illiger 1811	21
1.3.4	Gênero <i>Rhynchonycteris</i> , Peters, 1865	23
1.4	EVOLUÇÃO E CITOGENÉTICA NA FAMÍLIA EMBALLONURIDAE	23
1.5	HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	27
1.5.1	Hibridização <i>in situ</i> em morcegos	30
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVOS GERAIS	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
4	Manuscritos de artigo científico	43
4.1	Classic and molecular cytogenetics: a multivalent ring structure in the meiosis of <i>Cormura brevirostris</i> (Emballonuridae: Chiroptera)	43
4.2	Resultados preliminares do artigo 2	64
5	CONCLUSÕES	70
6	PERSPECTIVAS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ORDEM CHIROPTERA

Os morcegos são animais pertencentes à ordem Chiroptera. Eles representam a segunda maior ordem dentro da classe Mammalia, em termos de diversidade, com 19 famílias (Miller-Butterworth *et al.*, 2007; Richards *et al.*, 2010) cerca de 202 gêneros e 1120 espécies (Simmons, 2005 a,b), sendo superada apenas pela ordem Rodentia, que possui a maior diversidade, com aproximadamente 2277 espécies (Reis *et al.*, 2007).

Os morcegos estão tradicionalmente divididos em duas subordens: A subordem Megachiroptera apresenta uma única família, Pteropodidae, com 42 gêneros e 186 espécies (Hill e Smith, 1986; Simmons, 2005 a,b), restritas ao Velho Mundo (África, Ásia, Austrália e Oceania). A maioria das espécies são frugívoras, mas eventualmente alimentam-se de flores, pólen e néctar e a sua orientação é realizada principalmente pela visão (Altringham, 1996; Nowak, 1994).

A subordem Microchiroptera apresenta 18 famílias, 160 gêneros e aproximadamente 930 espécies (Miller-Butterworth *et al.*, 2007; Richards *et al.*, 2010), distribuídas em todos os continentes, não ocorrendo nos pólos e algumas ilhas oceânicas remotas (Hill e Smith, 1986; Nowak, 1994; Simmons, 2005 a; Reis *et al.*, 2007). Segundo Nowak (1994) das 18 famílias, oito ocorrem no Velho Mundo, sendo cinco amplamente distribuídas (Rhinopomatidae, Rhinolophidae, Hipposideridae, Nycteridae e Megadermatidae) e três endêmicas da Tailândia, Madagascar e Nova Zelândia (Craseonycteridae, Myzopodidae e Mystacinidae, respectivamente); seis famílias (Phyllostomidae, Noctilionidae, Mormoopidae, Natalidae, Furipteridae e Thyropteridae) são restritas ao Novo Mundo e apenas quatro (Vespertilionidae, Miniopteridae, Emballonuridae e Molossidae) são cosmopolitas. Cerca de 88% das espécies são exclusivamente tropicais. Os 12% restantes vivem em regiões temperadas.

A diversidade dos morcegos aumenta com as latitudes mais baixas coincidindo com as regiões mais quentes do planeta, na Zona Equatorial (Findley, 1993). Particularmente a Amazônia é a região com maior diversidade de morcegos do mundo, com mais de 120 espécies por 500 Km² (Figura 1).

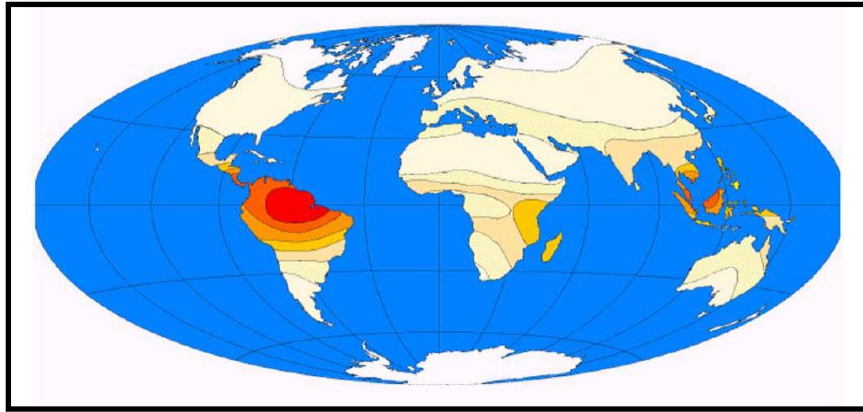


Figura 1 – Diversidade de morcegos baseada no número de espécies por 500 Km² através do mundo (adaptado de Findley, 1993). Gradientes de cores do branco (ausência de espécies) ao vermelho (120 espécies por 500 Km).

Os quirópteros são os únicos mamíferos que apresentam vôo verdadeiro, não sustentado. A morfologia externa dos morcegos é bastante variada, incluindo principalmente, coloração de pelagem, formas nasais e tamanhos corporais, sendo estruturas adaptadas ao ambiente em que vivem. Suas asas membranosas estendem-se das laterais do tronco e membros posteriores até o quinto dedo, braço e antebraço (plagiopatágio), entre o polegar e os ombros (propatágio), entre os dedos (dactilopatágio) e, em alguns táxons, entre as pernas (uropatágio ou membrana interfemural) (Reis *et al.*, 2007) (Figura 2).

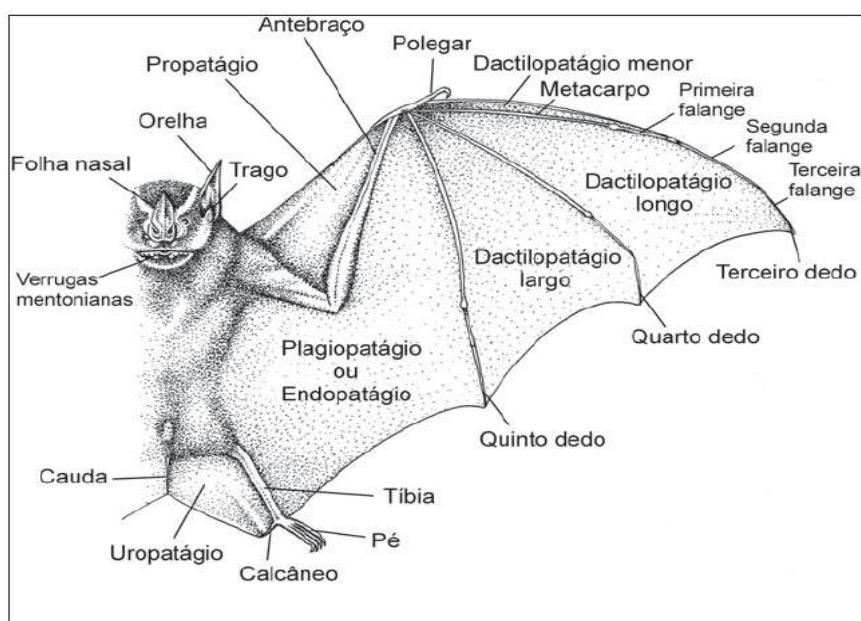


Figura 2 – Representação esquemática de um morcego (Ilustração de Oscar A. Shibatta, retirado de Reis, *et al.*, 2007)

Essa arquitetura aerodinâmica, que lhes confere a capacidade de voar, os permite explorar vários nichos ecológicos, possuindo assim os mais diversos comportamentos sociais, estratégias reprodutivas e hábitos alimentares. Quando comparamos morcegos com outros mamíferos podemos observar a alta diversidade da dieta alimentar (Figura 3) sendo observados morcegos frugívoros, insetívoros, carnívoros, onívoros, piscívoros, nectarívoros e hematófagos (Kunz e Pierson, 1994; Nowak, 1994), ocupando assim um papel primordial na dinâmica dos ecossistemas tropicais e subtropicais do planeta, principalmente, devido a sua importância no controle populacional de insetos, polinização e dispersão de sementes (Altringham, 1996; Nowak, 1999).

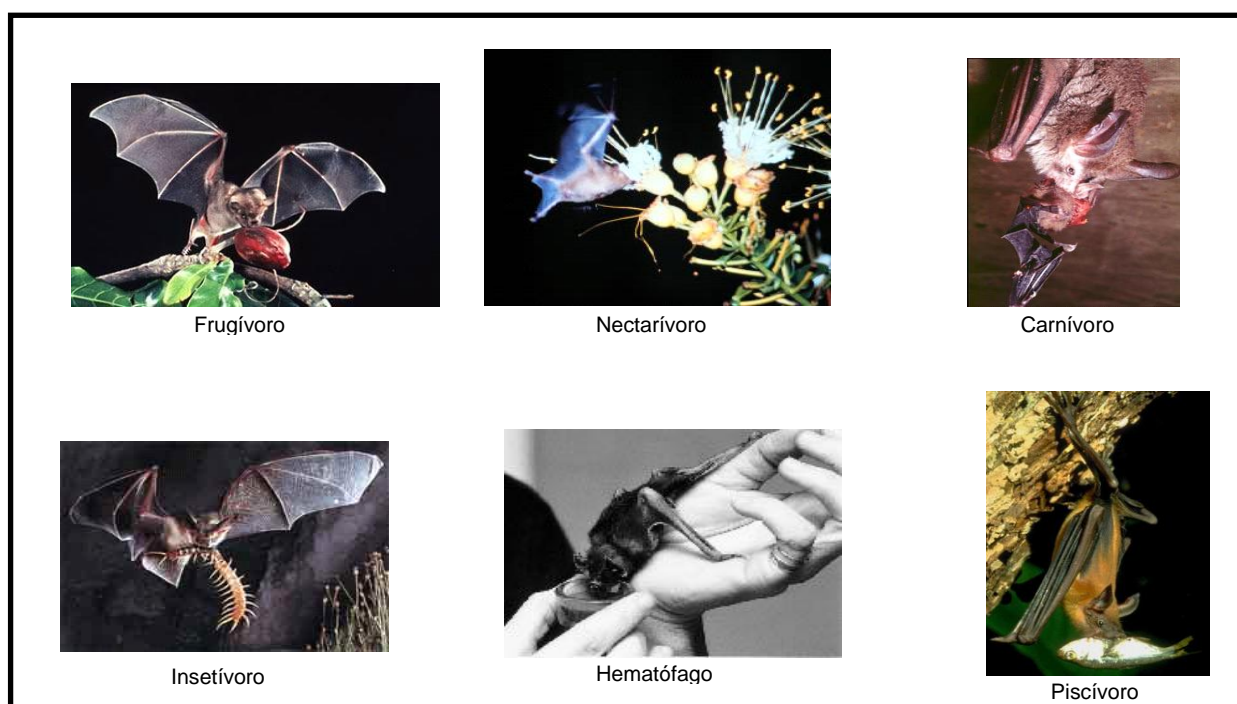


Figura 3 – Diversos hábitos alimentares dos morcegos. Fotos retiradas de www.batcon.org

A maioria das espécies é noturna e utiliza, além da visão, um sistema de ecolocalização bastante desenvolvido que lhes auxilia durante o vôo noturno. Este sistema consiste na emissão e recepção de sinais de ultrasons de amplitudes e frequências variadas, muitos deles imperceptíveis ao ouvido humano, produzidos pela laringe do animal e emitidos pela via oral ou nasal. Esta característica

inerente aos microquirópteros também pode ser encontrada em espécies do gênero *Rousettus*, um Megaquiróptero (Nowak, 1994 e 1999; Altringham, 1996).

O peso de um morcego pode variar de 2g em *Craseonycteris thonglongyai*, até espécies como o *Pteropus vampyrus* que pode alcançar até aproximadamente 1600g (Nowak 1994 e 1999; Altringham, 1996) (Figura 4).



Figura 4 – (A) *Craseonycteris thonglongyai*. e (B) *Pteropus vampyrus*. Retirado de www.morcegolivre.vet.br

1.2 ORIGEM E EVOLUÇÃO DA ORDEM CHIROPTERA

Os registros fósseis mais antigos de representantes da ordem Chiroptera datam do início do Eoceno (49-53 milhões de anos). Este período revela uma fauna de morcegos extremamente rica, compreendendo centenas de espécimes fósseis, completos em boa parte dos casos, abrangendo cerca de 24 gêneros (Simmons e Geisler, 1998). Desde o início da década de 80 acreditava-se que a ordem Chiroptera era monofilética e que todos os morcegos compartilhavam um ancestral voador em comum. Dados de análises morfológicas e moleculares confirmam a origem monofilética (Kunz e Pierson, 1994) implicando que o voo teria acontecido uma única vez na história evolutiva dos mamíferos (Simmons, 2005a). Estudos da morfologia do sistema nervoso, visão e até mesmo de fatores simples como a variação do tamanho corporal, a análise de seqüência de aminoácidos da hemoglobina através de técnicas de biologia molecular (Altringham, 1996) sugerem que os megaquirópteros seriam mais intimamente

relacionados aos dermópteros e primatas do que com os microquirópteros, logo o voo teria surgido duas vezes na evolução dos mamíferos (Pettigrew, 1986 e 1995; Pettigrew *et al.*, 1989 *apud* Simmons, 2005a). Embora outros trabalhos filogenéticos, usando diferentes dados, não apoiassem a monofilia dos morcegos (Jones *et al.*, 2002; Simmons, 2005) estudos recentes incluindo vários caracteres morfológicos, cromossômicos, datação fossilífera e seqüências de DNA mitocondrial e nuclear apóiam a ancestralidade comum entre megaquirópteros e microquirópteros (Simmons e Geisler, 1998; Jones *et al.*, 2002; Volleth *et al.*, 2002; Eick *et al.*, 2005; Jones e Teeling, 2006; Ao *et al.*, 2007).

A relação evolutiva dos quirópteros com outras ordens de mamíferos poderia ser apoiada por um registro fóssil de um “pré-morcego” ou caracteres morfológicos intermediários de um morcego e seu ancestral não voador (Simmons, 2005a; Reis *et al.*, 2007). Embora os achados fósseis mais antigos sejam de alguns dentes descobertos na França, do período Paleoceno, que apresentam tanto características de morcegos quanto de insetívoros (Eulipotyphla, o grupo dos musaranhos), não é possível supor se esses animais primordiais já apresentavam estruturas alares (Reis *et al.*, 2007). Um fóssil completo de morcego remete ao Eoceno (aproximadamente 53 milhões de anos atrás) na formação “Green River” do Wyoming nos Estados Unidos, sendo semelhante a um microquiróptero atual (Simmons, 2005a; Reis *et al.*, 2007).

Dentro da ordem existem também várias discussões acerca das relações de parentesco entre as dezoito famílias existentes e seis famílias extintas de morcegos (Simmons, 2005a). Koopman (1985) *apud* Simmons & Geisler (1998), divide a subordem Microchiroptera em duas infra-ordens: os Yinochiroptera e Yangochiroptera. Recentemente, vários estudos moleculares sugerem que os Yinochiroptera estariam mais relacionados com Megachiroptera (Teelling *et al.*, 2000, 2002). Springer *et al.* (2001) nomeia esta nova associação como Yinpterochiroptera que agora parece incluir Pteropodidae, Rhinolophidae, Hipposideridae, Megadermatidae, Craseonycteridae e Rhinopomatidae. O restante das famílias estaria inclusa dentro da subordem Yangochiroptera.

As figuras 5 e 6 apresentam as relações filogenéticas e a reconstrução temporal da principais linhagens de morcegos baseados principalmente em dados morfológicos e moleculares, respectivamente.

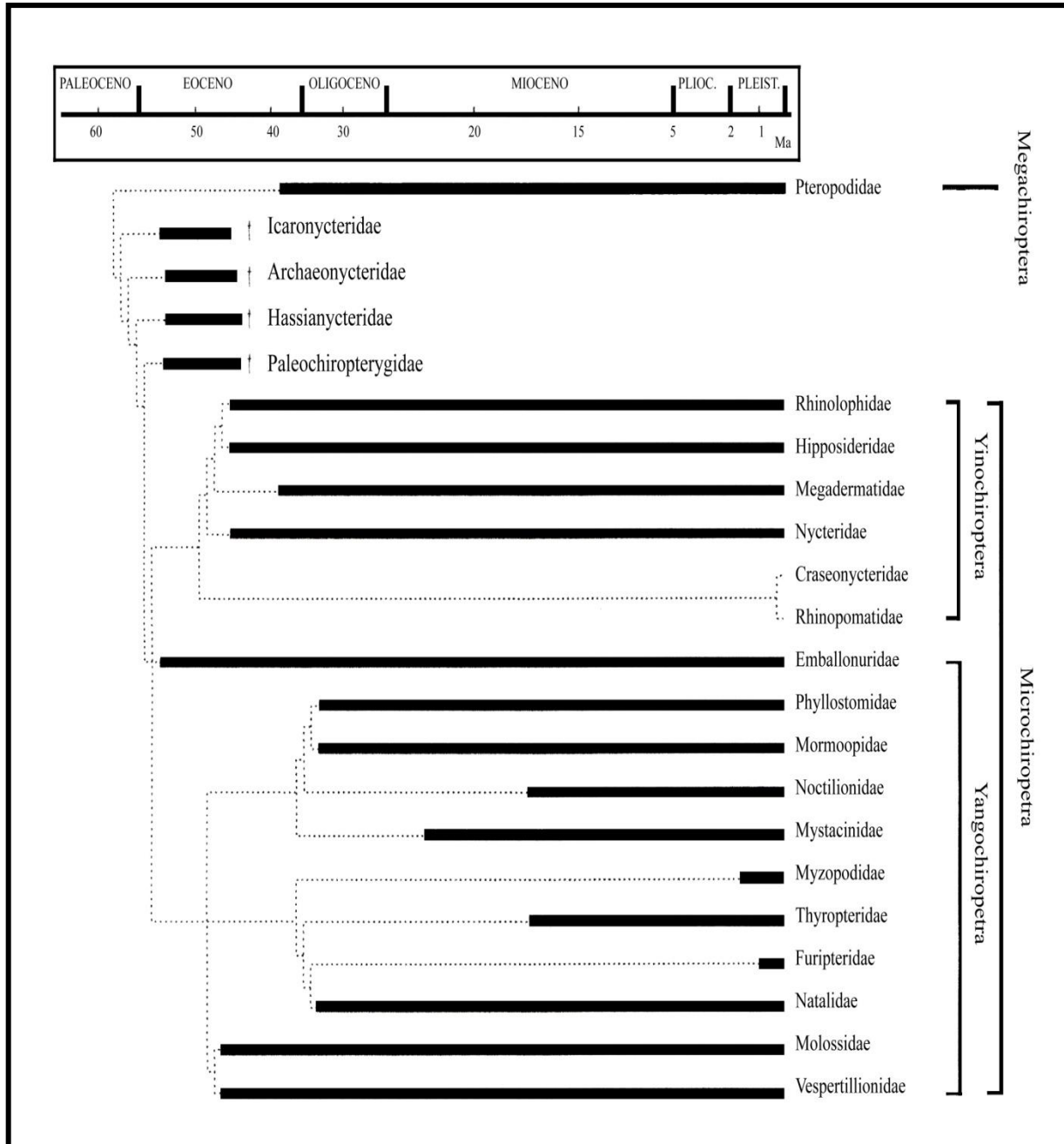


Figura 5 – Reconstrução do padrão temporal de diversificação das principais linhagens de morcego. Linhas espessas indicam tempo de mudança documentado por registro fóssil. Linhas pontilhadas representam relações filogenéticas presumidas por outros dados. Barras verticais indicam as subordens de Chiroptera e infra-ordens dentro de Microchiroptera. Retirado de Simmons (2005a).

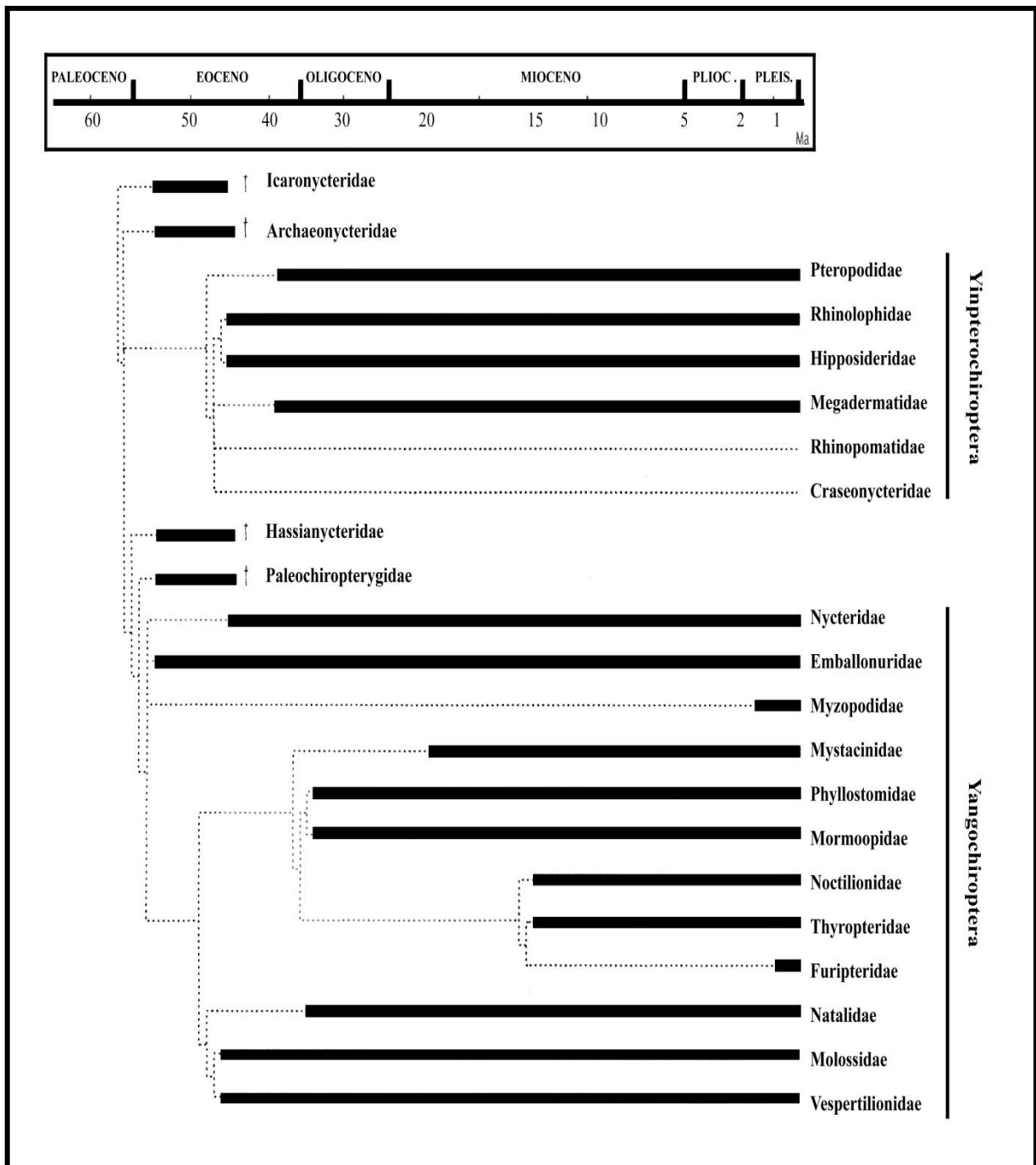


Figura 6 – Reconstrução do padrão temporal de diversificação das principais linhagens de morcego baseado em arvores filogenéticas geradas a partir de dados moleculares. Linhas espessas indicam tempo de mudança documentado por registro fóssil. Linhas pontilhadas representam relações filogenéticas presumidas por dados, principalmente moleculares. Linhas verticais indicam as novas denominações para as subordens de Chiroptera. Retirado de Simmons (2005a).

1.3 A FAMÍLIA EMBALLONURIDAE

Segundo Emmons e Feer (1990) os morcegos pertencentes à família Emballonuridae (Figura 7) possuem em geral pequeno tamanho corpóreo, com olhos relativamente grandes e focinho alongado, não possuindo folha nasal. Em algumas espécies apresentam-se bolsas em seu propatágios ou nas membranas interfemurais. De acordo com Reis *et al.* (2007) estes morcegos estão classificados em 13 gêneros e 51 espécies. No Brasil ocorrem sete gêneros e 15 espécies, fazendo com que seja a quarta família mais diversa de morcegos, estando atrás de Phyllostomidae (90 espécies), Molossidae (26 espécies) e Vespertilionidae (24 espécies).

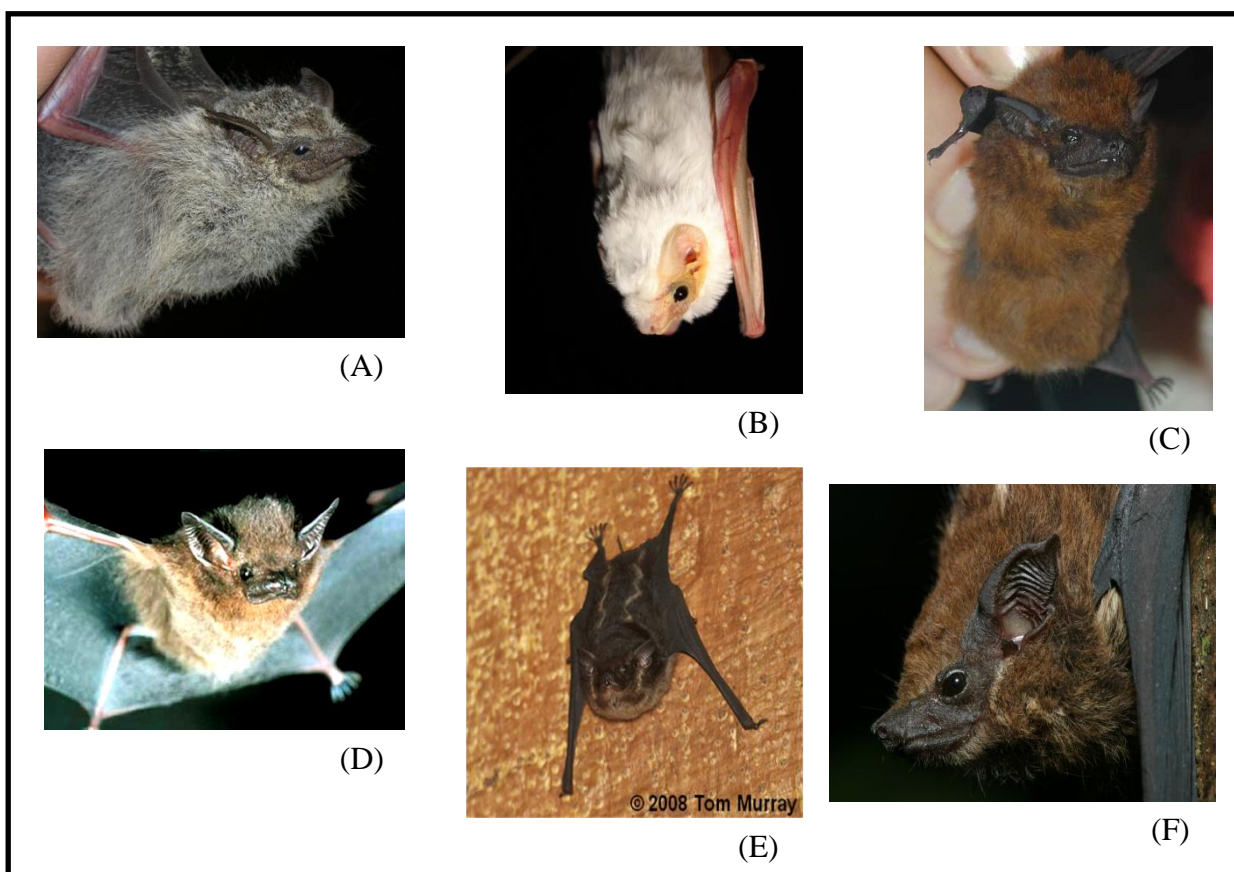


Figura 7 – Representantes de morcegos da família Emballonuridae existentes no Brasil. (A) *Rhynchonycteris naso*, (B) *Diclidurus albus*, (C) *Cormura brevirostris*, (D) *Peropteryx kappleri*, (E) *Saccopteryx bilineata*, (F) *Saccopteryx leptura*. Fotos retiradas de http://www.nouragues.cnrs.fr/species_lists/bat_web/thumb.html

1.3.1 Classificação da Família Emballonuridae

Dados sobre as relações evolutivas e classificação da família Emballonuridae são escassos. Dentre os poucos estudos destaca-se Robbins e Sarich (1988) que, baseados em estudos moleculares, indicam a existência de três subdivisões para a família:

Grupo 1: Inclusão de oito gêneros presentes no Novo Mundo (*Rhynchonycteris*, *Centronycteris*, *Balantiopteryx*, *Saccopteryx*, *Cormura*, *Peropteryx*, *Cyttarops*, *Diclidurus*).

Grupo 2: Compreende os gêneros *Taphozus* e *Saccolaimus* presentes no Velho Mundo.

Grupo 3: Engloba os gêneros *Emballonura* e *Colleura* também do Velho Mundo, sendo os mesmos mais relacionados filogeneticamente à subdivisão dos emballonurídeos do Novo Mundo.

Além dessa subdivisão com base em dados moleculares, Robbins e Sarich (1988), utilizando a análise de características morfológicas publicadas nos trabalhos de Barghoorn (1977), mostram outra classificação para a família (Tabela 1). Lim *et al.* (2007 e 2008) apóiam esta nova classificação.

Tabela 1 – Classificação dos morcegos emballonurídeos com base em dados moleculares e morfológicos (Robbins e Sarich, 1988).

Família Emballonuridae
Subfamília Taphozoinae
Tribo Vespertiliavini
<i>Vespertiliavus</i>
Tribo Taphozoini
<i>Taphozus</i>
<i>Saccolaimus</i>
Subfamília Emballonurinae
Tribo Emballonurini
<i>Emballonura</i>
<i>Colleura</i>
Tribo Diclidurini
<i>Rhynchonycteris</i>
<i>Centronycteris</i>
<i>Balantiopteryx</i>
<i>Saccopteryx</i>
<i>Cormura</i>
<i>Peropteryx</i>
Subgênero <i>Peropteryx</i>
Subgênero <i>Peronymus</i>
<i>Cyttarops</i>
<i>Diclidurus</i>

1.3.2 O Gênero *Cormura*, Peters (1867)

O gênero engloba uma única espécie, *Cormura brevirostris* Wagner, 1843 (Figura 8). Possui coloração marrom-escuro ou marrom-avermelhada no dorso, sendo mais clara na face ventral. Possui pelagem sedosa e a presença de bolsa longa situada no meio da membrana antebraquial, a base da membrana interfemural é quase nua; as asas estão ligadas aos pés na base dos dedos. As fêmeas são ligeiramente maiores que os machos. (Reis *et al*, 2007).



Figura 8 – *Cormura brevirostris*. Fotos Retiradas de [picasaweb.google.com](https://www.picasaweb.google.com)

1.3.3 O Gênero *Saccopteryx*, Illiger 1811

O gênero *Saccopteryx* compreende cinco espécies: *Saccopteryx antioquiensis*, *Saccopteryx gymnura*, *Saccopteryx leptura*, *Saccopteryx canescens* e *Saccopteryx bilineata*. Dessas somente a primeira não ocorre no território brasileiro.

A espécie *Saccopteryx leptura* (Schreber, 1774) (Figura 9) é a menor das espécies deste gênero, possuindo a face dorsal castanho-escuro e a ventral castanho-acinzentada, sendo as membranas também de cor castanha. As listras dorsais são menos pronunciadas do que em *Saccopteryx bilineata*. (Reis *et al*, 2007).



Figura 9 – Espécimes de *Saccopteryx leptura*. Retirado de www.morcegolivre.vet.br

A espécie *Saccopteryx canescens* (Figura 10) apresenta um tamanho pequeno e se distingue por apresentar pelagem dorsal-agrisalhada de cinza ou amarelo e listras dorsais esbranquiçadas, o antebraço varia de 35,8 a 40,8mm (Simmons e Voss, 1998), ocorre em florestas úmidas e secas, áreas abertas, tais como pastos e pomares, e em ambientes urbanos (Reis et al., 2007)



Figura 10 – Espécimes de *Saccopteryx canescens*. Fotos retiradas de http://www.nouragues.cnrs.fr/species_lists/bat_web/thumb.html

1.3.4 O gênero *Rhynchonycteris*, Peters 1867

O gênero é composto por uma única espécie: *Rhynchonycteris naso* (Wied-Neuwied, 1820) (Figura 11) que é um embalonurídeo de hábito insetívoro, distribuído em baixas elevações na América Central e do Sul, onde costumam forragear sobre as águas de rios, lagos e riachos. Possuem focinho alongado característico e a presença de tufos mais claros em seus antebraços, abrigam-se em sítios de abrigo próximo as águas em grupos de três a 45 indivíduos geralmente interespaçados de forma homogênea (Emmons e Feer, 1990).

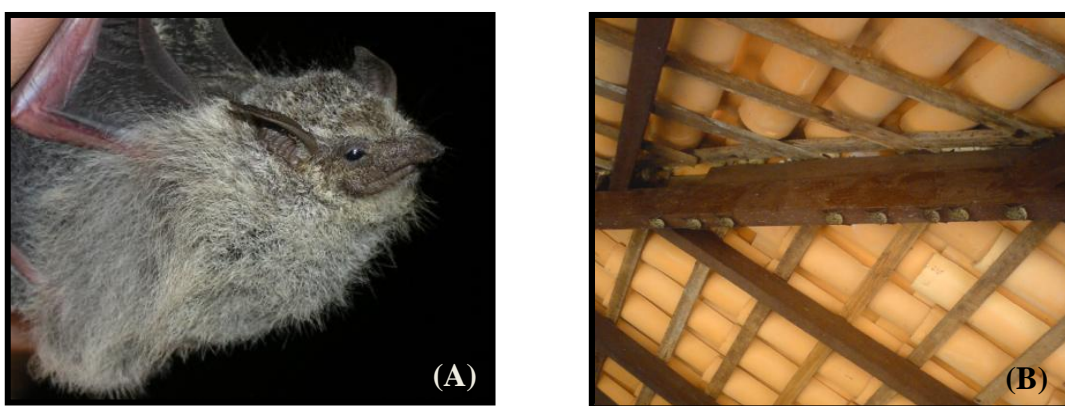


Figura 11 – (A) Espécime de *Rhynchonycteris naso*, (B) Abrigo e disposição interespaçada de forma alinhada.

1.4 EVOLUÇÃO E CITOGÊNÉTICA NA FAMÍLIA EMBALLONURIDAE

Os estudos evolutivos através de dados citogenéticos foram impulsionados após a descoberta do efeito de posição descrito por Sturtevant (1925 *apud* Benazzi, 1973), segundo o qual “O efeito de um locus não depende apenas da natureza do gene, mas também da sua posição em relação a outros genes”. Os mecanismos que levam as mudanças estruturais no cariótipo, tais como rearranjos Robertsonianos, fusões *in tandem*, translocações, inversões paracêntricas e pericêntricas que conseqüentemente alteram a posição de determinados genes podem ser evidenciados por técnicas de bandeamentos cromossômicos e hibridização *in situ*. Logo, estes rearranjos estruturais podem servir de marcadores citogenéticos utilizados na taxonomia, relações de

parentesco e filogenia. Segundo Rokas & Holland (2000), tais rearranjos apresentam ocorrência rara no genoma (“rare genomic changes”) e são potencialmente usados como marcadores filogenéticos.

Segundo Baker & Bickham (1980), dados referentes à evolução cariotípica em Chiroptera demonstram que alguns grupos possuem cariótipos bastante conservados (conservadorismo cromossômico), outros cariótipos com poucos rearranjos e outros cariótipos altamente rearranjados (megaevolução cariotípica).

Dados morfológicos, moleculares e cromossômicos apontam a família Emballonuridae como uma das linhagens mais basais dentro de Microchiroptera, conforme proposto por Simmons e Geisler (1998) e corroborado por Simmons (2005). Ocupa também uma posição basal na organização proposta por Springer *et al.* (2001) que inclui esta família no grupo Yangochiroptera,

Até o presente momento os dados citogenéticos existentes em Emballonuridae são provenientes de outros países da América do Sul e Ásia. A Tabela 2 evidencia as espécies já estudadas nos trabalhos anteriores e que possuem distribuição no território brasileiro. Existe uma variação do número diplóide de cromossomos ($2n=22-48$) e no número fundamental ($NF=36-64$).

Tabela 2 – Estudos citogenéticos em morcegos da família Emballonuridae com distribuição também no Brasil. Adaptado de Reis *et al.*, 2007

<u>Espécies</u>	<u>2n</u>	<u>NF</u>	<u>Técnicas</u>	<u>Autores</u>
<i>Centronycteris maximiliani</i>	28	48	Coloração convencional	Greenbahum and Jones(1978)
<i>Cyttarops alecto</i>	32	60	Coloração convencional	Baker and Jones (1975)
<i>Cormura brevirostris</i>	22	40	G e C	Baker and Jordan (1970)
				Baker <i>et al</i> (1981)
				Hood and Baker (1986)
<i>Rhynchonycteris naso</i>	22	36	G e C	Baker and Jordan (1970)
				Hood and Baker (1986)
<i>Peropteryx macrotis</i>	26	48	Coloração convencional	Baker <i>et al.</i> (1981)
<i>Peropteryx leucoptera</i>	48	62	Coloração convencional	Baker <i>et al.</i> (1981)
<i>Saccopteryx leptura</i>	28	38	G e C	Baker and Jordan (1970)
				Baker <i>et al.</i> (1981)
				Baker <i>et al.</i> (1982)
				Hood and Baker (1986)
<i>Saccopteryx bilineata</i>	26	36	G, C e rDNA	Baker (1970)
				Baker and Jordan (1970)
				Honeycutt <i>et al.</i> (1980)
				Hood and Baker (1986)
				Baker <i>et al.</i> (1992)
<i>Saccopteryx canescens</i>	24	38	G e C	Baker <i>et al.</i> (1982)
				Hood and Baker (1986)

Dentre os escassos trabalhos publicados com relação à citogenética da família Emballonuridae, Baker e Jordan (1970) caracterizaram citogeneticamente quatro espécies presentes nas Américas Central e do Sul (*Rhynchonycteris naso*, *Saccopteryx bilineata*, *Saccopteryx leptura* e *Cormura brevirostris*). Hood e Baker (1986), analisando nove espécies de morcegos nesta família, encontraram poucas homeologias cromossômicas através de bandeamento G e nenhuma variação intra-específica, sugerindo assim poucos elementos cromossômicos compartilhados entre os diferentes gêneros, com uma grande variação dentro e entre os gêneros. Isto evidencia que esta família sofreu grandes mudanças cromossômicas ao longo do tempo evolutivo. Estes achados discordam daquilo que tem sido frequentemente observado em outras famílias, como por exemplo Phyllostomidae e Vespertilionidae, que apresentam algumas espécies com cariótipos bastante conservados (Bickham 1979, Baker *et al.* 1981, Morielle-Versute & Varella-Garcia 1995, Volleth *et al.* 2001).

Das 164 espécies de morcegos presentes no território brasileiro, citadas por Peracchi *et al.* (2006), 114 apresentam dados citogenéticos descritos, o que corresponde a mais de 69% das espécies listadas para o Brasil. Embora a maioria dos dados citogenéticos tenham sido obtidos em espécies coletadas fora do território nacional, é perceptível o crescimento das informações cariotípicas acerca da quiropterofauna brasileira (Moratelli & Morielle, 2007).

Estudos citogenéticos em morcegos da Amazônia brasileira são escassos, sendo a maioria deles concentrados em espécies da família Phyllostomidae (Rodrigues *et al.*, 2000, 2003; Neves *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005, Pieczarka *et al.*, 2005, Gomes *et al.*, 2010; Noronha *et al.* 2009,2010). Dados da literatura apontam que nenhuma das espécies de Emballonuridae existentes foi estudada citogeneticamente, permanecendo como uma família pobremente compreendida no âmbito cromossômico.

Os estudos citogenéticos em quirópteros da Região Amazônica possuem como meta principal a compreensão da biodiversidade, através da análise de seus cariótipos, utilizando diversas técnicas, em especial a Citogenética Molecular (Hibridização *in situ* Fluorescente – FISH), sendo assim úteis como ferramentas adicionais para a identificação de segmentos cromossômicos homólogos entre

espécies, caracterização citotaxonômica, definição de táxons e suas relações evolutivas.

Apesar de possuímos uma fauna bastante diversificada, poucos estudos de citogenética molecular têm sido realizados com espécimes brasileiros. Essa situação se agrava quando consideramos a região Amazônica em particular, que embora seja o maior centro de biodiversidade do planeta, muito pouco se conhece sobre as espécies que habitam este local, especialmente quando se trata de genética de morcegos (Noronha, 2006).

1.5 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

A técnica de hibridização *in situ* foi primeiramente desenvolvida por Pardue & Gall (1969) e relaciona conhecimentos da biologia celular, citogenética e genética molecular. Essa técnica foi iniciada com a utilização de sondas radioativas de DNA altamente repetitivo obtidos por centrifugação em gradiente de densidade em Cloreto de Césio e hibridizadas em metáfases de camundongo (Snustad & Simmons, 2000). Esses isótopos radioativos tornavam a técnica dispendiosa, demorada e perigosa. Esta técnica era pouco precisa devido à grande precipitação da sonda que acabava sendo confundida com as marcações reais, por isso era necessário analisar um número maior de metáfases e a realização de testes estatísticos. Porém este problema foi solucionado com a introdução dos corantes fluorescentes. Este aperfeiçoamento na marcação da sonda originou a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e atualmente é amplamente utilizada para diversas pesquisas (Quadro 1) relacionadas tanto para cromossomos mitóticos quanto interfásicos (Guerra, 2004).

APLICAÇÕES DA TÉCNICA DE FISH	
Detecção de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais	Diagnóstico clínico: trissomias, translocações, deleções e duplicações
	Caracterização de linhagens celulares
	Identificação de cromossomos marcadores
	Detecção de expansão de repetições trinucleotídicas
Mapeamento físico/ gênico	Detalhamento completo do genoma por hibridização genômica comparativa
	Mapeamento de fragmentos únicos de DNA para correlacionar <i>loci</i> gênico e fenótipos relacionados a doenças
	Cluster gênico / famílias / genes relacionados A função
	Organizações de sondas/ marcadoras de DNA
Arquitetura nuclear/ interação entre domínios de cromatina	Mapeamento físico de larga escala com regiões cromossômicas / cromossomo inteiro / genoma inteiro
	Organização da cromatina na interfase
	Padrões de distribuição para a região centromérica / telomérica
Estrutura cromossômica e estudo de comportamento	Posição do domínio da cromatina da cromatina e expressão gênica
	Seqüências repetidas e bandeamentos cromossômicos
	Estrutura de maior escala dos cromossomos meióticos e mitóticos
	Organização de seqüências repetitivas no centromero

Quadro 1 – Aplicações da técnica de FISH. Adaptado de Heng & Tsui (1998).

Esta técnica fundamenta-se na complementaridade dos pares bases da dupla fita de DNA, que em condições especiais de temperatura e concentração uma seqüência de DNA desnaturada previamente marcada com radioisótopos ou fluorocromo (sonda), possa renaturar com uma seqüência de DNA complementar, previamente desnaturada, a qual se quer analisar. A técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH) está representada de forma esquemática na figura 12.

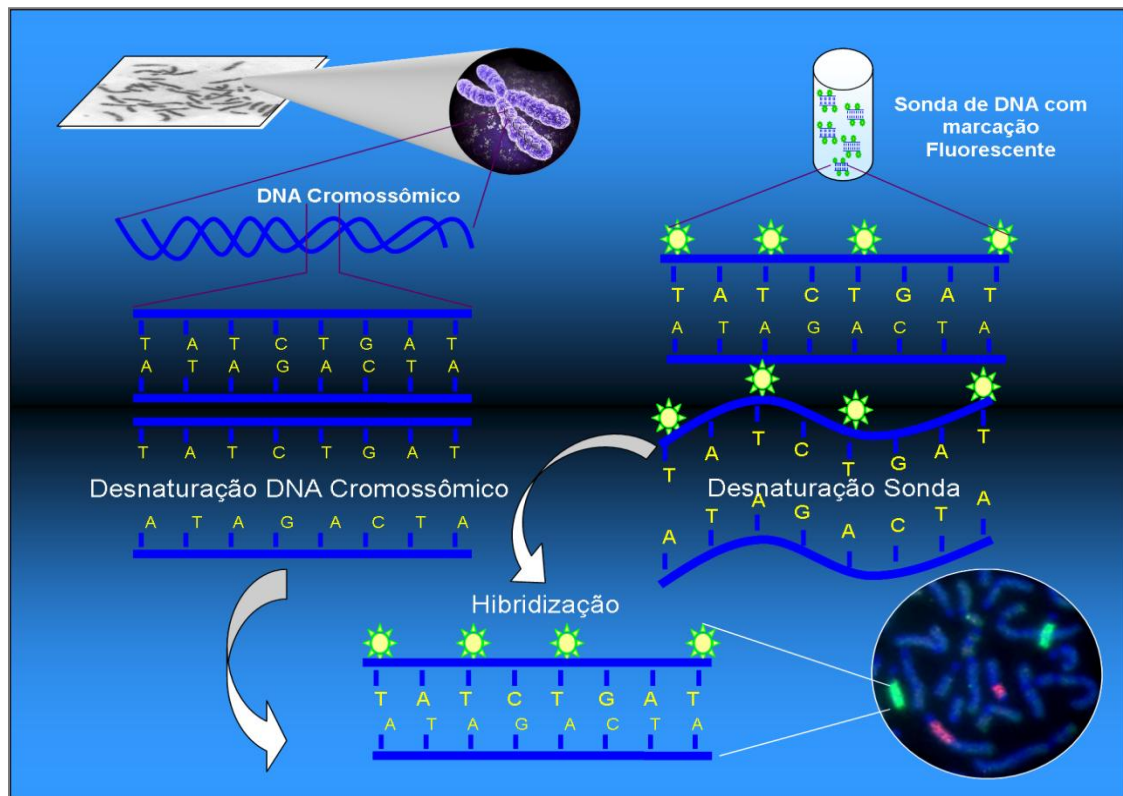


Figura 12 – Representação esquemática da técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH). Adaptado de Guerra, 2004.

As inovações tecnológicas em citogenética e biologia molecular, muitas delas associadas ao progresso do Projeto Genoma Humano, possibilitaram a produção de sondas de vários níveis de complexidade: (1) Sondas de seqüências únicas, (2) sondas de DNA repetitivo, (3) sondas de sub-regiões cromossômicas, (4) sondas de braços cromossômicos e (5) sondas de cromossomo total ou cromossomo específicas (Weinberg e Stanyon, 1998).

A marcação da sonda pode ser feita de maneira direta e indireta. Na marcação indireta a sonda é ligada covalentemente, através de um braço espaçador, com um antígeno ou hapteno, geralmente biotina ou digoxigenina, que posteriormente será reconhecido por avidina ou anti-digoxigenina, respectivamente, ligado a um fluorocromo Cy3 ou FITC. No método direto o fluorocromo é ligado diretamente a desoxiuridina trifosfato através de um braço espaçador. Ambas as marcações podem ser realizadas através da técnica de *Nick-translation* ou DOP-PCR (*in Finotelo, 2006*).

1.5.1 Hibridização *in situ* em Morcegos

Os trabalhos com pintura cromossômica em morcegos, utilizando sondas de cromossomos totais de outras espécies (ZOO-FISH), vêm sendo realizados nos últimos dez anos. Volleth *et al.* (1999) apresentaram o primeiro trabalho de pintura cromossômica usando sondas de cromossomos humanos em um morcego da família Phyllostomidae (*Glossophaga soricina*), encontrando 41 segmentos cromossômicos conservados. Adicionalmente, Volleth *et al.* (2002) propõem uma filogenia baseada em dados de ZOO-FISH com sondas humanas para representantes de cinco famílias da ordem Chiroptera. Estes resultados apóiam a monofilia da ordem Chiroptera e permitem relacionar o clado correspondente aos Hipposideridae juntamente com Rhinolophidae e as famílias Molossidae, Vespertilionidae e Phyllostomidae dentro de Yangochiroptera.

Pieczarka *et al.* (2005) realizaram o primeiro trabalho de pintura cromossômica recíproca utilizando sondas de cromossomos totais, obtidas por separação por fluxo (*Chromosome sorting*), de duas espécies de morcegos filostomídeos (*Carollia brevicauda* e *Phyllostomus hastatus*), encontrando 24 e 26 segmentos cromossômicos compartilhados, respectivamente. Gomes (2007) hibridizando sondas de *Carollia brevicauda* no genoma de *Glossophaga soricina* correlaciona seus resultados com análises de pintura cromossômica publicadas por Volleth *et al.* (1999) e Pieczarka *et al.* (2005), encontrando algumas associações cromossômicas humanas compartilhadas entre *Phyllostomus*, *Carollia* e *Glossophaga*, bem como outras ordens de mamíferos (Tabela 3).

Tabela 3. Associações cromossômicas humanas (HSA) presentes em Artiodactyla (Art), Carnívora (Car), Cetácea (Cet), *Glossophaga* (GSO), *Phyllostomus* (PHA), *Carollia* (CBR), Perissodactyla (Per) e Rodentia (Rod). Adaptado de Richard *et al.* (2003).

	Art	Car	Cet	GSO	PHA	CBR	Per	Rod
HSA 3-21	+	+	+	+	+	+	+	+
HSA 4-8	+	+					+	+
HSA 7-16	+	+	+	+	+	+	+	+
HSA 12-22	+	+	+	+	+	+	+	+
HSA 14-15	+	+	+	+	+	+	+	+
HSA 16-19	+	+	+	+	+	+	+	+

Ao *et al.* (2006), utilizando sondas de *Myotis myotis* (Chiroptera-Vespertilionidae) no genoma de seis espécies de vespertilionídeos, e Ao *et al.* (2007), utilizando sondas de *M. myotis* no cariótipo de representantes de quatro famílias da ordem Chiroptera, também correlacionam seus resultados de pintura cromossômica com os dados de Volleth *et al.* (2002). Um achado interessante desta correlação, apoiados por resultados de ZOO-FISH publicados por Mao *et al.* (2007), permite relacionar os Pteropodidae juntamente com a superfamília Rhinolophoidea em um único clado denominado Pteropodiformes ou Yinpterochiroptera (Ao *et al.*, 2007).

Eick *et al.* (2007) analisando o cariótipo de duas espécies do gênero *Scotophilus* da África do Sul (Chiroptera-Vespertilionidae) utilizando dados citogenéticos e pintura cromossômica com sondas de *Myotis myotis*, mostram que há uma pequena diferença a nível cromossômico entre as espécies estudadas, além da variação morfológica, molecular e freqüência na ecolocalização encontradas para essas espécies.

Recentemente Mao *et al.* (2008), através de estudos de bandeamento G e pintura cromossômica utilizando sondas de *Myotis myotis* (Chiroptera - Vespertilionidae) e humanas em *Taphozus melanopogon* (Chiroptera: Emballonuridae) um embalonurídeo endêmico no Velho Mundo, conseguiu demonstrar a existência de alguns segmentos cromossômicos conservados em Emballonuridae com outras famílias de morcegos. Dentre esses segmentos o 13 – 8b – 4c humano (Figura 14), reportando o trabalho de Volleth *et al.*, (2002), que analisou através de pintura cromossômica e bandeamento G a presença de vários segmentos cromossômicos humanos rearranjados em cinco representantes de cinco famílias de morcegos. Estes segmentos são denominados “Unidades Evolucionárias conservadas” (ECU). Uma dentre várias dessas unidades é relevante para nosso estudo, o segmento 13 – 8b – 4c humano, considerado como condição plesiomórfica para o grande grupo Yangochiroptera. Dessa forma, com base em caracteres cromossômicos, corrobora-se a posição da família Emballonuridae como integrante do grupo Yangochiroptera.

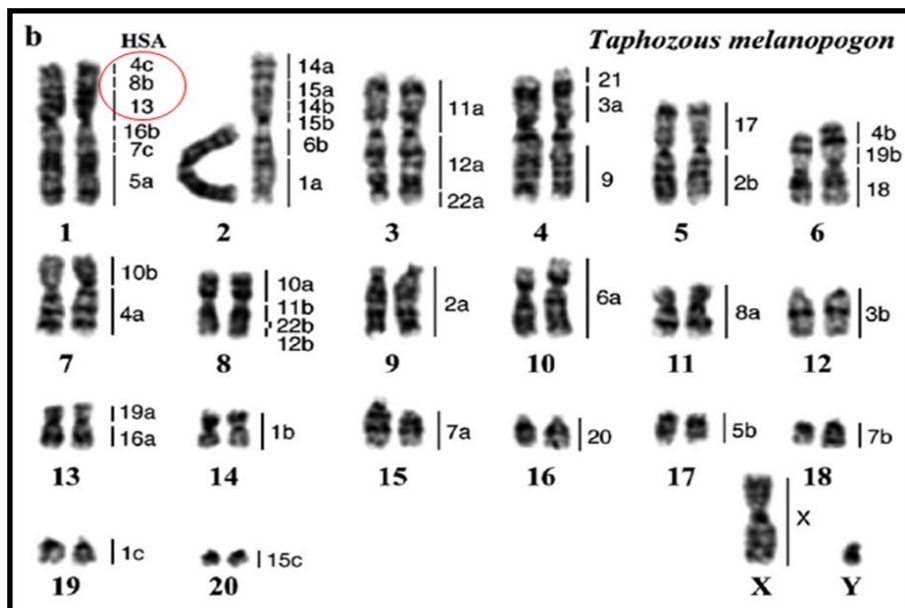


Figura 13 – Cariótipo G bandeado de *Taphozus melanopogon* retirado de Mao *et al.* (2008) evidenciando o segmento 13 – 8b – 4c humano que é um dos segmentos plesiomórficos para o grande grupo Yangochiroptera, segundo Volleth *et al.* (2002).

Todos esses estudos abrem novas perspectivas para o estudo dos cariótipos de morcegos da família Emballonuridae endêmicos da Amazônia brasileira, já que nenhuma espécie de embalonurídeo havia sido caracterizada citogeneticamente (Reis *et al.*, 2007), utilizando a citogenética clássica e molecular, identificando de forma precisa a localização de genes como os de DNA ribossomal e seqüências teloméricas. Assim nossa meta principal a compreensão da biodiversidade, através da análise de seus cariótipos utilizando técnicas citogenéticas, em especial a técnica de FISH, sendo assim utilizada como ferramenta adicional para a caracterização citotaxonômica, análise comparativa, definição de táxons e suas relações evolutivas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterização citogenética clássica e molecular com sondas de DNA ribossomal 18S e sondas teloméricas humanas em espécies da família Emballonuridae.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização por citogenética clássica através das técnicas de bandeamentos G, C e Ag-NOR nas espécies *Cormura brevirostris*, *Saccopteryx leptura*, *Saccopteryx canescens* e *Rhynchonycteris naso*;
- Localização por citogenética molecular dos sítios de DNA ribossomal 18S e seqüências teloméricas humanas através da técnica de FISH.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTRINGHAM, J.D. Bats. **Biology and Behaviour**. New York: Oxford University Press, 1996.

AO, L., MAO, X.; NIE, W.; GU, X.; FENG, Q.; WANG, J.; SU, W.; WANG, Y.; VOLLETH, M.; YANG, F.. Karyotypic evolution and phylogenetic relationships in the order Chiroptera as revealed by G-banding comparison and chromosome painting. **Chromosome Research**, 1-11p. 2007.

BAKER, R.J. karyotypcs trends in bats in: Winsatt, WA. **Biology of bats**. New York: Academic Press p.65-97. 1970.

BAKER, R.; JORDAN, R.G.. Cromossomal studies of neotropical bats of the families Emballonuridae, Noctilionidae, Natalidae and Vespertilionidae. **Caryologia**, Firenze, V.23, n4, p. 595-604, 1970.

BAKER, R.J.; JONES Jr, J.K. Additional records of bats from Nicaragua, with a revised checklist of Chiroptera. **Occasional Papers, Museum of Texas Tech University** v.34, p.1-13. 1975.

BAKER, R.J.; BICKHAM, J.W.. Karyotypic Evolution in bats: Evidence of extensive and conservative chromosomal evolution in closely related taxa. **Systematic Zoology**, vol 29, p.239-253, 1980.

BAKER, R.J.; BLEIER, W.J.. Karyotypes of bats of the subfamily Carolliinae (Mammalia; Phyllostomatidae) and their evolutionary implications. **Experientia**, vol. 27, p.220–222, 1971.

BAKER, R.J.; GENOWAYS, H.H.; SEYFARTH,P.A. Results of the Alcoa Foundation Suriname Expeditions VI. Aditonal chromosomal data for bats (Mamalian: Chiroptera) from Suriname. **Annals of Carnegie Museum** v.50, p.333-344. 1981.

BAKER, R.J.; HAIDUK, M.W.; ROBBINS, L.W.; CADENA, A; KOOP, B.F. Chromosomal studies of south american bats and their systematic implications in: Mares MA, Genoways HH. **Mammalian Biology in South America**. Special Publications Series - Pymatuning Laboratory of Ecology, Pittsburg p.303-237, 1982.

BAKER, R.J.; QUMSIYEH, M.B.; HOOD, C.S. Role of chromosomal banding patterns in understanding mammalian evolution. In: H. H. Genoways (eds). **Current mammalogy**: p.67–96. New York: Plenum press. 1987.

Baker et al . (1992).

BARGHOORN, S. F.. New material of *Vespertiliavus* Schlosser (Mammalia, Chiroptera) and suggested relationships of emballonurid bats based on cranial morphology. **Novitates**, vol.2618, 29p. 1977.

BICKHAM, J.W.. Chromosomal variation and evolutionary relationships of vespertilionid bats. **Journal of Mammalogy**, vol. 50, p. 350-363, 1979.

EICK, G.N.; JACOBS, D.S.; MATTHEE, C.A.. A nuclear DNA phylogenetic perspective on the evolution of echolocation and historical biogeography of extant bats (Chiroptera). **Molecular Biology evolution**, vol.22, p.1869-1886, 2005.

EICK, G.N.; JACOBS, D.S.; YANG, F.; VOLLETH, M. Karyotypic differences in two sibling species of *Scotophilus* from South Africa (Vespertilionidae, Chiroptera, Mammalia). **Cytogenetic and Genome Research**, vol.118, p.72-77, 2007.

EMMONS, L. H.; FEER, F.. **Neotropical Rainforest Mammals:A field guide**. Chicago: Universidade of chicago Press, 281p. 1990.

FERGUSON-SMITH, M. A.; YANG, F.; O'BRIEN, P. M. C.. Comparative mapping using chromosome sorting and painting. **ILAR journal**, vol.39, p. 68-76, 1998.

FINDLEY, J.S.. **Bats: A Community Perspective**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.

FINOTELO, L.F.M.. **Filogenia cromossômica da subfamília Pitheceinae (Platyrrhini, Primates) por citogenética clássica e pintura cromossômica**. Dissertação (Mestrado em Genética e biologia molecular) ICB, Universidade Federal do Pará. Belém, 2006.

GOMES, A.J.B.. **Pintura cromossômica comparativa com sondas cromossomos totais de *Carollia brevicauda* no genoma de *Glossophaga soricina* (Chiroptera, Phyllostomidae)**. 2007 Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas Licenciatura) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Belém, 2007.

GOMES, A.J.B.; RODRIGUES, L.R.R.; RISSINO, J.D.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C. Biogeographical karyotypic variation of *Rhinophylla fischerae* (Chiroptera: Phyllostomidae) suggests the occurrence of cryptic species. **Comparative Cytogenetics**. Vol.4, nº1, 2010.

GREENBAUM, I.F.; JONES Jr, J.K. Noteworthy records of bats from El Salvador, Honduras and Nicaragua. **Ocasional Papers, Museum of Texas Tech University**, Lubbock v.55, p.1-7, 1978.

GUERRA, M.. **FISH - Conceitos e aplicações da citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004.

HILL, J.E.; SMITH, J.D.. **Bats. A natural history**. 2nd edition. Univ. of Texas Press. 1986.

HENG, H.H.; TSUI, L.C. High resolution free chromatin/DNA fiber fluorescent *in situ* hybridization. **Journal Chromatography**, vol.806: p.219-29. 1998.

HONEYCUTT, R.L.; BAKER, R.J.; GENOWAYS, H.H. Results of the Alcoa Foundation Suriname Expeditions III. Chromosomal data for bats (Mammalia: Chiroptera) from Suriname. **Annals of Carnegie Museum** v.49, p.237-250, 1980.

HOOD, C. S.; BAKER, R. J.. G- and C- banding chromosomal studies of bats of the family Emballonuridae. **Journal of Mammalogy**. v.67, n.4. Lawrence: p.705-711. 1986.

JONES, G.; TEELING, E.C.. The evolution of echolocation in bats. **Trends in Ecology and Evolution**, vol.21, p. 149-156, 2006.

JONES, K. E.. Chiroptera. Encyclopedia of Life Sciences. Macmillan Publishers Ltda, Nature Publishing Group, 2002. Disponível em <http://www.els.net> acesso em 12/09/2003.

KOOPMAN, K.F. Chiroptera. In: SIMMONS, N. B.; GEILSER, J. H. Phylogenetic relationships of Icaronycteris, Archeonycteris, Hassianycteris and Palaeochiropteryx to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in microchiroptera. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, vol.235, p.1-182, 1998.

KUNZ, T.H.; PIERSON, E.D.. Bats of the world: An Introduction. In: **Walker's Bats of the World**. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, p.1-46, 1994.

LIM, B.K.; ENGSTROM, M. D.; BICKHAM J. W.; PATTON, J. C.. Molecular phylogeny of New World sheath-tailed bats (Emballonuridae: Diclidurini) based on loci from the four genetic transmission systems in mammals. **Biological Journal of the Linnean Society**. Vol. 93, p.189–209, 2007

LIM, B.K.. Historical biogeography of New World emballonurid bats (tribe Diclidurini): taxon pulse diversification. **Journal of Biogeography**, vol.35, p.1385-1401, 2008.

MILLER-BUTTERWORTH, C.M., MURPHY, W.J., O'BRIEN, S.J., JACOBS, D.S., SPRINGER, M.S., TEELING, E.C.. A family matter: conclusive resolution of the taxonomic position of the long-fingered bats, *Miniopterus*. **Molecular Biology Evolution**, vol.24, p.1553–1561, 2007.

MAO, X.; NIE, W.; WANG, J.; SU, W.; FENG, Q.; WANG, Y.; DOBIGNY, G.; YANG, F.. Comparative cytogenetics of bats (Chiroptera): The prevalence of Robertsonian translocations limits the power of chromosomal characters in resolving interfamily phylogenetic relationships. **Chromosome Research**. Vol.16, p.155-170, 2008.

MORIELLE-VERSUTE, E.; VARELLA-GARCIA, M.. A simple and fast procedure to grow bat fibroblasts from lung biopsies for cytogenetic studies. **Revista Brasileira de Genética**, vol.18, p.503- 505, 1995.

MARTINS, C; GALETTI JR, P. M. Karyotype similarity between two sympatric *Schizodon* fish species (Anostomidae, Characiformes) from the Paraguay River basin. **Genetics and Molecular Biology**, n.21, vol.3, p.355-360, 1998.

NORONHA, R.C.R. **Comportamento meiótico e evolução dos cromossomos Sexuais na família Phyllostomidae (Chiroptera): análise por hibridização in situ com fluorocromos**. 2006. 187p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Belém, 2006.

NOWAK, R. M.. **Walker's mammals of the world. Fifth Edition**. Baltimore: The Johns Hopkins Univ. Press. 1994.

PARDUE, M.L.; GALL, J.G. Molecular hybridization to radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, vol.61, p.600-604. 1969.

PATTON, J.C.; BAKER, R.J. Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoids bats. **Systematic Zoology**, vol.27, p. 449-462. 1978.

PERACCHI, A.L.; LIMA, J.P.; REIS, N.R.; NOGUEIRA, M.R.R.; HORTENCIO-FILHO, H.. Ordem Chiroptera. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Editora dos Editores, p.153-230, 2006.

PIECZARKA, J.C.; NAGAMACHI, C.Y.; O'BRIEN, P.C.M.; YANG, F.; RENS, W.; BARROS, R.M.S.; NORONHA, R.C.R.; RISSINO, J.; OLIVEIRA, E.H.C.; FERGUSON-SMITH, M.A. Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). **Chromosome Research**, vol.13, p. 349 –347. 2005.

REIS, N.R. dos; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. de.. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Editores, 2007.

RICHARDS, L.R.; Rambau. R.V.; Lamb, J.M.; Taylor, P. J.; & Yang, F.; Schoeman, M.C.; Goodman, S.M.. Cross-species chromosome painting in bats from Madagascar: the contribution of Myzopodidae to revealing ancestral syntenies in Chiroptera. **Chromosome Research**. Vol.18, 2010.

ROBBINS L.W; SARICH, V.M.. Evolutionary relationships in the family Emballonuridae (Chiroptera). **Journal of Mammology**, v.69, p.1–13. 1988.

ROCHA, D.C.C.. **Mapeamento citogenético comparativo de *Saimiri boliviensis* e *Saimiri ustus* com *Homo sapiens* e *Saguinus oedipus* por FISH multicor**. 2002. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Celular) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém. 2002.

RODRIGUES. L. R. R.. **Estudos citogenéticos comparativos por bandeamentos e pintura cromossômica (ZOO-FISH) em Callicebus (Platyrrhini – Primates)**. 2006. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

ROKAS, A.; HOLLAND, P.W.H.. Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. **Science**, vol.15, p.454-459. 2000.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J.. **Fundamentos de genética**. 2^o Edição. Guanabara Koogan. 2001.

SIMMONS, N.B. Chiroptera. In: ROSE, K.D.; ARCHIBALD, D.. **The rise of placental mammals**. Baltimore: Johns Hopkins University Press. p.312-529. 2005a.

SIMMONS N.B.. Order Chiroptera. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M.. **Mammal species of the world: taxonomic and geographic reference**. 3rd edition. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005b.

SIMMONS N.B.; GEISLER. Phylogenetic relationships of *Icaronycteris*, *Archeonycteris*, *Hassianycteris* and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in microchiroptera. **Bulletin American Museum Natural History**, vol. 235, p. 1-182. 1998.

SIMMONS, N. B.; VOSS,R. S. The mammals of Paracou, French Guiana: a neotropical lowland rain forest fauna part 1. Bats. **Bulletin of The American Museum of Natural History**. v.237, p.1-219. 1998.

SPRINGER, M.S.; TEELING, E.C.; MADSEN, O.; STANHOPE, M.J.; DE JONG, W.W.. Integrated fossil and molecular data reconstruct bat echolocation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol.98, p.6241-6246, 2001.

STURTECVANT, A.H. 1925 *apud* BENAZZI, M.. Cytotaxonomy and evolution: general remarks. In: **Evolutionary and vertebrate evolution**. 1st ed. Vol. 1 Chiarelli AB: Capana E, (eds.) Academic Press, Londres. 1973.

TEELING, E.C.; SCALLY, M.; KAO, D.J.; ROMAGNOLI, M.L.; SPRINGER, M.S.; STANHOPE, M.J. Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats. **Nature**, vol.403, p.188-192, 2000.

TEELING, E.C.; MADSEN, O.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; JONG, W.W.; STANHOPE, M.J.; SPRINGER, M.S. Microbat paraphyly and the convergent evolution of the key innovation in old world rhinolophoid microbat. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol.99, p.1431-1436, 2002.

VOLLETH, M.; KLETT, C.; KOLLAK, A.; DIXKENS, C.; WINTER, Y.; JUST, W.; VOGEL, W.; HAMEISTER, H.. ZOO-FISH analysis in a species of the order Chiroptera: *Glossophaga soricina* (Phyllostomidae). **Chromosome Research**, vol.7, p.57-64, 1999.

VOLLETH, M.; BRONNER, G.; GOPFERT, M.C.; HELLER, K. G.; HELVERSEN; YONG, H. S.. Karyotypy comparison and phylogenetic relationships of *Pipistrellus*-like bats (Vespertilionidae; Chiroptera; Mammalia). **Chromosome Research**, vol.09, p.25-46. 2001.

VOLLETH, M.; HELLER, K.G.; PFEIFFER, R.A.; HAMEISTER, H. Comparative ZOO-FISH analysis in bats elucidates the phylogenetic relationships between Megachiroptera and five microchiropteran families. **Chromosome Research**, vol.10: 477-497, 2002.

WIENBERG, J.; STANYON, R.. Comparative chromosome painting of Primate Genomes. **ILAR Journal**, vol.39, p.77-91, 1998.

WILSON, D.E.; REEDER, D.M.. **Mammal species of the world**: a taxonomic and geographic reference. 3ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press 2005.

4. Manuscritos de artigos científicos

Artigo 1

Classic and molecular cytogenetics: a multivalent ring structure in the meiosis of *Cormura brevirostris* (Emballonuridae: Chiroptera)

Submetido à Revista Chromosome Research em 03 de Abril de 2011

Title: Classic and molecular cytogenetics: a multivalent ring structure in the meiosis of *Cormura breviostris* (Emballonuridae: Chiroptera)

Authors: Ramon Everton Ferreira de Araujo^{1,4}; Cleusa Yoshiko Nagamachi^{1,2}; Anderson José Baia Gomes^{1,3}; Marlyson Jeremias Rodrigues da Costa¹; Renata Coelho Rodrigues Noronha^{1,2}; Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues⁵; Julio Cesar Pieczarka^{1,2}

Institutions:

1 Laboratório de Citogenética, UFPA-Belém; 2 CNPq Researcher; 3 CAPES Doctorship Scholarship in Genetics and Molecular Biology; 4 FAPESPA Mastership Scholarship in Neuroscience and Cellular Biology; 5 Laboratório de Genética & Biodiversidade, PGRNA-UFOPA, Campus Tapajós Santarém.

Short title: A multivalent ring structure in the meiosis of *Cormura breviostris* (Chiroptera)

Correspondence to: Dr. Julio Cesar Pieczarka.

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA, ICB, 3º Andar.

Av. Augusto Corrêa SN, Bairro Guamá, Belém, Pará, Brazil. 66.075-900

Phone-Fax: 091-3201-7931.

e-mail: julio@ufpa.br

ABSTRACT

Specimens of the bat *Cormura brevirostris* (Emballonuridae: Chiroptera) were collected from two localities in the Brazilian Amazon region and analyzed by classical and molecular cytogenetics. The karyotype diploid number and chromosome arm number were as reported previously ($2n = 22$ and $FN = 40$, respectively). Hybridization using rDNA probes and the silver nitrate technique demonstrated the presence of two NOR sites. Hybridization with telomeric probes demonstrated the presence of telomeric sequences in the centromeric regions of all chromosomes except the Y chromosome. Based on meiotic studies, chromosome banding, and FISH using the whole X chromosome probe of *Phyllostomus hastatus* (Chiroptera, Phyllostomidae), we suggest that the sex chromosome pair in this species is different from that previously reported. Meiotic analysis demonstrated that at diplotene-diakinesis the cells had a ring conformation involving four chromosome pairs. This suggests the occurrence of multiple reciprocal translocations among these chromosomes, which is a very rare phenomenon in vertebrates, and has never been described in eutherian mammals.

KEY WORDS: chromosomes, Emballonuridae, meiosis, FISH

INTRODUCTION

The Emballonuridae family (13 genera, 51 species) has a cosmopolitan distribution. This family is the fourth largest in Brazil (7 genera and 15 species), after the Phyllostomidae (90 species), the Molossidae (26 species) and the Vespertilionidae (24 species) (Reis *et al.*, 2007).

Morphological, molecular and chromosome data suggest that the Emballonuridae is one of the most basal families of the Microchiroptera (Simmons and Geisler, 1998; Simmons, 2005). It also has a basal position in the classification proposed by Springer *et al.*, (2001), who include this family in the Yangochiroptera group.

Cytogenetic studies of bats from the Brazilian Amazon region are rare, with most concerning species of the Phyllostomidae family (Neves *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2000, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003; Pieczarka *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005; Noronha *et al.*, 2009, 2010; Gomes *et al.*, 2010). According to Reis *et al.* (2007), no species of Emballonuridae in Brazil has been the subject of cytogenetic study. Cytogenetic studies of species of this family from other South America countries (Table 1) show variation in the diploid number (2n ranging from 22 to 48) and the fundamental number (FN ranging from 36 to 64).

In eutherian mammals the XY sex chromosome pair shows a different configuration in the first substages of prophase I, as both chromosomes are partial homologues with tip-to-tip pairing in the pseudoautosomal region. This is a very different condition from the other chromosome pairs, which are bivalent. The differentiated compaction of the XY chromatin is responsible for a cytological structure termed the XY body (Solari, 1994; Handel, 2004; Noronha *et al.*, 2010).

Data for *Cormura brevirostris* (Baker and Jordan, 1970; Hood and Baker, 1986) show that it has 2n = 22 chromosomes and FN = 40 (Table 1). All the chromosomes are bi-armed, and the large X chromosome comprises approximately 30% of the haploid genome of the species.

In this study we analyzed the karyotype of *C. brevirostris* by G- and C-banding, NOR staining, meiosis, and FISH using an 18S rDNA probe and the whole X chromosome probe of *Phyllostomus hastatus*.

MATERIAL AND METHODS

Studied specimens

Two male specimens of *C. brevirostris* were collected, one (LR-1291) from Maracanã Village (Faro Town, Pará State, Brazil; 2°09'23.15" S, 56°44'19.73" W) and the other (LR-1934) from Santarém Town (Pará State, Brazil; 2°30'59.77" S, 54°57'20.47" W) (Fig.1). The specimens were collected using mist nets during a biological inventory. The collection was authorized by the Brazilian National Institute for the Environment (IBAMA 32/2009 CGFAP). Chromosome preparations were made in the field and sent to the Laboratório de Citogenética of the Universidade Federal do Pará, Brazil.

Chromosome preparation and banding

The metaphases were prepared from bone marrow using a modification of the method of Ford and Hamerton (1956). For meiosis cells we used the technique described by Eicher (1966). The G-banding pattern was obtained by trypsinization (Seabright, 1971), the C-banding method followed Sumner (1972), and the nucleolar organizer regions were detected according to Howell and Black (1980). The karyotypes were organized following the pattern of Hood and Baker (1986).

Fluorescent in situ hybridization (FISH)

FISH using telomeric probes was prepared according to the Oncor protocol, and the preparation of FISH using 18S rDNA probes followed Martins and Galetti (1998). The probes were labeled with biotin and detected using avidin-Cy3. The methods of Pieczarka *et al.*, (2005) and Yang *et al.*, (1999) were followed for FISH using the whole X chromosome probe of *P. hastatus*. Images were captured using a Zeiss Axiocam Mrm camera connected to a Zeiss Axioplan 2 microscope and controlled by Axiovision 3.0 software.

Results

Karyotype analysis

The conventional analysis indicated a karyotype of $2n = 22$ and $FN = 40$, with all the chromosome pairs being bi-armed. The sex chromosome pair was

heteromorphic, with the X chromosome being submetacentric and the Y chromosome being small and metacentric (Fig. 2A). The G-banding pattern showed pairing of all homologues (Fig. 2B). The constitutive heterochromatin was present as large blocks in the pericentromeric regions of all chromosomes, and most of the Y chromosome was heterochromatic (Fig. 2C).

Staining with silver nitrate (AgNO_3) showed four active sites located in the interstitial regions of the short arms of two mid-sized metacentric chromosome pairs (Fig. 3A), coincident with the 18S rDNA probe FISH hybridizations (Fig. 3B). The telomeric probes hybridized in the centromeric regions of all chromosomes except the Y chromosome, where no hybridization was observed (Fig. 3C).

Meiotic analysis

In the pachytene cells the XY chromosome pair remained heteropycnotically paired at the pseudoautosomal region (Fig. 4A). Cells in the diplotene–diakinesis substages were found with condensed axes, because of the alignment of homologous chromosomes before the metaphase I stage of the first meiotic division, and with a multivalent ring arrangement involving four autosomal chromosome pairs. The sex chromosome (XY) had a typical mammalian meiotic configuration, with pairing in the pseudoautosomal region and the X chromosome forming a rod (Fig. 4B). Hybridization with the whole X chromosome of *P. hastatus* was consistent with the X chromosome being part of the X–Y body, which is a typical configuration found during the pachytene stage of meiosis. This hybridization facilitated precise identification of the X chromosome of *C. brevirostris* (Fig. 4C).

DISCUSSION

Analysis of mitotic chromosomes

The results of this study show that *C. brevirostris* from the Brazilian Amazon region has a karyotype with the same diploid and fundamental numbers as described for this species from Colombia and Suriname (Baker and Jordan, 1970; Hood and Baker, 1986). However, our results show that the sex chromosome pair XX/XY is not the largest chromosome pair of the karyotype, as previously

proposed. This previous proposition suggested that the X chromosome comprises 25–30% of the haploid genome of the species (Hood and Baker, 1986). Our results confirm that the X chromosome of *C. brevirostris* has the ordinary size usually found in mammals.

The G-banding of the chromosomes showed great similarity to the Suriname sample, except for the absence of heteromorphism in the smallest chromosome pair. Using both AgNO₃ and FISH we carried out the first reported investigation of the NOR of *C. brevirostris*, and showed that there are two pairs of nucleolar organizers. This differs from other emballonurids presently under study in our laboratory (*Saccopteryx bilineata*, *S. leptura*, *Rhynchonycteris naso*), where we have observed only one pair.

As reported in earlier studies, we found telomeric DNA in pericentromeric, centromeric and interstitial regions, associated with constitutive heterochromatin (Meyne *et al.*, 1990; Luke and Verma, 1993; Beissmann and Masson, 1994; Pagnozzi *et al.*, 2000; Faria and Morielle-Versute, 2002; Lizarralde *et al.*, 2005; Castiglia *et al.*, 2006). The association of telomeric sequences with constitutive heterochromatin and NORs has been observed in the chromosomes of many vertebrate species (Abuín *et al.*, 1996; Garrido-Ramos *et al.*, 1998; Liu and Fredga, 1999). Multani *et al.* (2001) used FISH with telomeric probes to investigate the interphase and mitosis in 11 species of mammals, and suggested that there are three types of heterochromatin: (1) heterochromatin with telomeric sequences; (2) heterochromatin without telomeric sequences; and (3) a combination of both. We suggest that the interstitial telomeric sequences in *C. brevirostris* are a combination of heterochromatin with and without telomeric sequences, as we did not find the telomeric sequences in the centromeres of the Y chromosome. These telomeric hybridizations in the centromeres can be amplifications of the telomeric sequences, as has been reported elsewhere (Meyne *et al.*, 1990; Pathak, 1990; Vermeesch *et al.*, 1996; Multani *et al.*, 2001). In the images obtained there was no visible hybridization in the terminal region of the chromosomes. As the centromeric hybridizations signs are very strong, it may have been necessary to increase the exposure of the images. Thus, the sequences may have been present, but not captured because of the automatic exposure of the digital image system. An

alternative explanation comes from Multani *et al.* (2001), who suggested that weak telomeric hybridization in *Carollia perspicillata* reflects a reduced number of copies of the telomeric sequences in this species, which is known to have few telomeric sequences (insufficient for detection by FISH) for protecting its chromosomes.

Meiotic analysis

The largest chromosome pair (suggested by Baker and Jordan, 1970, and Hood and Baker, 1986 to be the X chromosome) showed an autosomal meiotic behavior during prophase I, and so are evidently part of the autosome set of this species. Our data show that the true X chromosome is mid-sized and submetacentric.

Many hypotheses have been proposed to explain the origin of multivalent meiotic ring configurations, such as the one we found in *C. brevirostris*. The most likely is that this configuration means heterozygosity for multiple reciprocal translocations. A ring configuration involving four autosome pairs, not yet identified, could be explained by this hypothesis. The translocated segments must be very small, as they were not observed by G-banding. The chain observed here has not previously been found in eutherian mammals, although it has been found in some plants (Carrel, 2004), invertebrates (John and King, 1982), fish (Gross *et al.*, 2009), amphibians (Lourenço *et al.*, 2000; Siqueira-Jr *et al.*, 2004), and in monotremes including the *platypus* (Rens *et al.*, 2004).

The meiotic behavior of the sex chromosomes in the pachytene cells of *C. brevirostris* was helpful on the precise definition of the sex chromosome pair. The use of the whole X chromosome probe from *P. hastatus* in investigating the karyotype of *C. brevirostris* confirmed the results suggested by conventional and meiosis analysis i.e. the sex chromosome is not the one described by Hood and Baker (1986), but is a mid-sized submetacentric chromosome that is distinct from the other chromosomes of this species.

These results are important in understanding the karyotypes of Brazilian emballonurids. As future analyses provide data on the karyotypes of other species, it will be possible to define the rearrangements that have occurred in this group, and identify relationships with other families. This information will contribute to

understanding of the biodiversity of bats in the Amazon region, and elucidation of the chromosome evolution of the Chiroptera generally.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA, Edital nº 020/2008) for financial support for this research; the Biodinâmica Rio and Aotus Consultoria Ambiental for financial support for the field research; Eloiza Soares and Talita Ribas for assistance in the field work; and the Escola da Floresta in Alter do Chão, Santarém-PA, for logistical support during the field work.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

Abuín M, Martinez P, Sanches L (1996) Localization of the repetitive telomeric sequence (TTAGGG)_n in four salmonid species. *Genome* 39:1035-1038.

Baker RJ (1970) karyotypes trends in bats in: Winsatt, WA. *Biology of bats*. New York: Academic Press 65-97.

Baker RJ, Jones Jr JK (1975) Additional records of bats from Nicaragua, with a revised checklist of Chiroptera. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University* 34: 1-13.

Baker R, Jordan RG (1970) Chromosomal studies of neotropical bats of the families Emballonuridae, Noctilionidae, Natalidae and Vespertilionidae. *Caryologia* 23:595-604.

Baker RJ, Genoways HH, Seyfarth PA (1981) Results of the Alcoa Foundation Suriname Expeditions VI. Additional chromosomal data for bats (Mammalian: Chiroptera) from Suriname. *Annals of Carnegie Museum* 50: 333-344.

Baker RJ, Haiduk MW, Robbins LW, Cadena A, Koop BF (1982) Chromosomal studies of south american bats and their systematic implications *in*: Mares MA, Genoways HH. Mammalian Biology in South America. Special Publications Series - Pymatuning Laboratory of Ecology, Pittsburg 303-237.

Beissman H, Masson JM (1994) Telomeric repeat sequences. *Chromosoma* 103:154-161.

Carrel L (2004) Chromosome chain makes a link. *Nature* 432:817-818.

Castiglia R, Garagna S, Merico V, Oguge N, Corti M (2006) Cytogenetics of a new cytotype of African *Mus* (subgenus *Nannomys*) *minutoides* (Rodentia, Muridae) from Kenya: C- and G- banding and distribution of (TTAGGG)_n telomeric sequences. *Chromosome Research* 14:587-594.

Eicher E (1966) An improve air-drying technique for recovery of all stages of meiosis in the mammalian testis. *Mammalian Chromosome Newsletter* 20:74.

Faria KC, Morielle-Versute E (2002) *In situ* hybridization of bat chromosomes with human (TTAGGG)_n probe, after previous digestion with AluI. *Genetics and Molecular Biology* 25:365-371.

Ford CE, Hamerton JL (1956) A colchicine, hypotonic-citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Staining Technology* 31:247-251.

Garrido-Ramos MA, Herran R, Rejón C, Rejón MR (1998) A satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. *Cytogenetics and Cell Genetics* 83:3-9.

Gomes AJB, Rodrigues LRR, Rissino JD, Nagamachi CY, Pieczarka JC (2010) Biogeographical karyotypic variation of *Rhinophylla fischeriae* (Chiroptera:

Phyllostomidae) suggests the occurrence of cryptic species. Comparative Cytogenetics 4:1.

Greenbaum IF, Jones Jr JK (1978) Noteworthy records of bats from El Salvador, Honduras and Nicaragua. Ocasional Papers, Museum of Texas Tech University, Lubbock 55:1-7.

Gross MC Feldberg E, Cella DM, Schneider MC, Schneider CH, Porto JIR, Martins C (2009) Intriguing evidence of translocations in Discus fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. Heredity. 102: 435-441.

Handel MA (2004) The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. Experimental Cell Research 296:57-63.

Honeycutt RL, Baker RJ, Genoways HH (1980) Results of the Alcoa Foundation Suriname Expeditions III. Chromosomal data for bats (Mammalia: Chiroptera) from Suriname. Annals of Carnegie Museum 49:237-250.

Hood CS, Baker RJ (1986) G- and C- banding chromosomal studies of bats of the family Emballonuridae. Journal of Mammalogy 67:705-711.

Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolar organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36:1014-1015.

John B.; King M (1982) Meiotic effects of supernumerary heterochromatin in *Heteropternis obscurella*. Chromosoma 85:39-65.

Lizarralde MS, Bolzán AD, Poljak S, Pigozzi MI, Bustos J, Merani MS (2005) Chromosomal localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in four species of

Armadillo (Dasypodidae) from Argentina: an approach to explaining karyotype evolution in the Xenarthra. *Chromosome Research* 13:777-784.

Liu WS, Fredga K (1999) Telomeric (TTAGGG)_n sequences are associated with nucleolus organizer regions (NORs) in the wood lemming. *Chromosome Research* 7:235-240.

Lourenço LB, Recco-pimentel S, Cardoso AJA (2000) second case of multivalent meiotic configurations in diploid species of Anura. *Genetics and Molecular Biology* 23:131-133.

Luke S, Verma RS (1993) Telomeric repeat (TTAGGG)_n sequences of human chromosomes are conserved in chimpanzee (*Pan troglodytes*). *Molecular and General Genetics* 237:460-462.

Martins C, Galetti PM Jr (1998) Karyotype similarity between two sympatric Schizodon fish species (Anostomidae, Characiformes) from Paraguay River basin. *Genetics and Molecular Biology* 21:355-360.

Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moysis RK (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequences in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99:3-10.

Multani AS, Ozen M, Furlong CL, Zhao YJ, Hsu TC, Pathak S (2001) Heterochromatin and interstitial telomeric DNA homology. *Chromosoma* 110: 214-220.

Neves ACB, Pieczarka JC, Barros RMS, Marques-Aguiar S, Rodrigues LRR, Nagamachi CY (2000) Cytogenetic studies on *Choeroniscus Minor* (Chiroptera, Phyllostomidae) from the Amazon region. *Cytobios* 105:91-98.

Noronha RCR, Nagamachi CY, O'brien PCM, Fergusson-Smith MA, Pieczarka JC (2009) Neo-XY body: an analysis of XY1Y2 meiotic behavior in *Carollia* (Chiroptera, Phyllostomidae) by chromosome painting. *Cytogenetic and Genome Research* 124: 37-43.

Noronha RCR, Nagamachi CY, O'brien PCM, Ferguson-Smith MA, Pieczarka JC (2010) Meiotic analysis of XX/XY and neo-XX/XY sex chromosomes in Phyllostomidae by cross-species chromosome painting revealing a common chromosome 15-XY rearrangement in Stenodermatinae. *Chromosome Research* 18:667-676.

Pagnozzi JM, Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y (2000) Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). *Chromosome Research* 8:585-591.

Pathak S (1990) Chromosome alterations in speciation and neoplastic transformation: a parallelism in: Sharma T (ed) *Trends in chromosome research*. Springer/Narosa Publishing House. New Delhi. 204-220.

Pieczarka JC, Nagamachi CY, O'brien PCM, Yang F, Ren W, Barros RMS, Noronha RCR, Rissino J, Oliveira EHC de, Ferguson-Smith MA (2005) Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). *Chromosome Research* 13:349-347.

Reis NR dos, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP de (2007) *Morcegos do Brasil*. Londrina: Editores 251p.

Rens W, Grützner F, O'Brien PCM, Fairclough H, Graves JAM, Ferguson-Smith MA (2004) Resolution and evolution of the duck-billed platypus karyotype with an X1Y1X2Y2X3Y3X4Y4X5Y5 male sex chromosome constitution. *PNAS* 101:16257–16261.

Ribeiro NAB, Nagamachi CY, Pieczarka JC, Rissino J, Neves ACB, Gonçalves ACO, Marques-Aguiar S, Barros RMS (2003) Cytogenetic analysis in species of the Subfamily Glossophaginae (Phyllostomidae-Chiroptera) supports a polyphyletic origin. *Caryologia* 56:85-95.

Rodrigues LRR, Barros RMS, Assis MFL, Marques-Aguiar SA, Pieczarka JC, Nagamachi CY (2000) Chromosome comparison between two species of *Phyllostomus* (Chiroptera – Phyllostomidae) from Eastern Amazonia, with some phylogenetic insights. *Genetics and Molecular Biology* 23:595-599.

Rodrigues LRR, Barros RMS, Assis MFL, Marques-Aguiar SA, Pieczarka JC, Nagamachi CY (2003) Comparative cytogenetics of two phyllostomids bats. A new hypothesis to the origin of the rearranged X chromosome from *Artibeus lituratus*. *Caryologia* 56:413-419.

Seabright MA (1971) rapid technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-972.

Silva AM, Marques-Aguiar S, Barros RMS, Nagamachi CY, Pieczarka JC (2005) Comparative cytogenetics analysis in the species *Uroderma magnirostrum* and *U. bilobatum* (cytotype $2n=42$) (Phyllostomidae, Stenodermatinae) in the Brazilian Amazon. *Genetics and Molecular Biology* 28:248-253.

Simmons N (2005) Order Chiroptera in: Wilson DE, Reeder DM (Eds). *Mammal Species Of The World: A Taxonomic And Geographic Reference*. 3Ed Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1:312-529.

Simmons NB, Geisler JH (1998) Phylogenetic relationships of *Icaronycteris*, *Archeonycteris*, *Hassianycteris* and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in Microchiroptera. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 235:1-82.

Siqueira-Jr S, Ananias F, Recco-Pimentel S (2004) Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura:Leptodactylidae) with 22 chromosomes and reanalysis of multiple translocations in *E. binotatus*. *Genetics and Molecular Biology* 27:363-372.

Solari AJ (1994) Sex chromosomes and sex determination in vertebrates. CRC Press, 308p.

Springer MS, Teeling EC, Madsen O, Stanhope MJ, De Jong WW (2001) Integrated fossil and molecular data reconstruct bat echolocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:6241-6246.

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75:304-306.

Vermeesch JR, De Meurichy W, Van den Berghe H, Marynen P, Petit P (1996) Differences in the Chromosomes of the Giraffidae, okapi (*Okapia johnstoni*), and giraffe (*Giraffa camelopardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob (4:26) fusion site. *Cytogenetics and Cell Genetics* 72:310-315.

Yang F, Carter NP, Shi L, Ferguson-Smith MA (1995) A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma* 103: 642-652.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. The collection locations (Google Earth).

Figure 2. Karyotype of *Cormura brevirostris* by conventional staining (2A), G-banding (2B), and C-banding (2C).

Figure 3. *Cormura brevirostris* chromosome analysis by AgNO₃ staining (arrows; 3A), FISH using 18S DNA probes (3B), and FISH using human telomeric probes (3C).

Figure 4. Pachytene showing the XY body in meiotic cells of *Cormura brevirostris* (4A), diplotene/diakinesis showing the XY body in meiotic cells of *C. brevirostris* (4B), and *C. brevirostris* examined by FISH using the whole X chromosome probe of *Phyllostomus hastatus*.

Figure 1

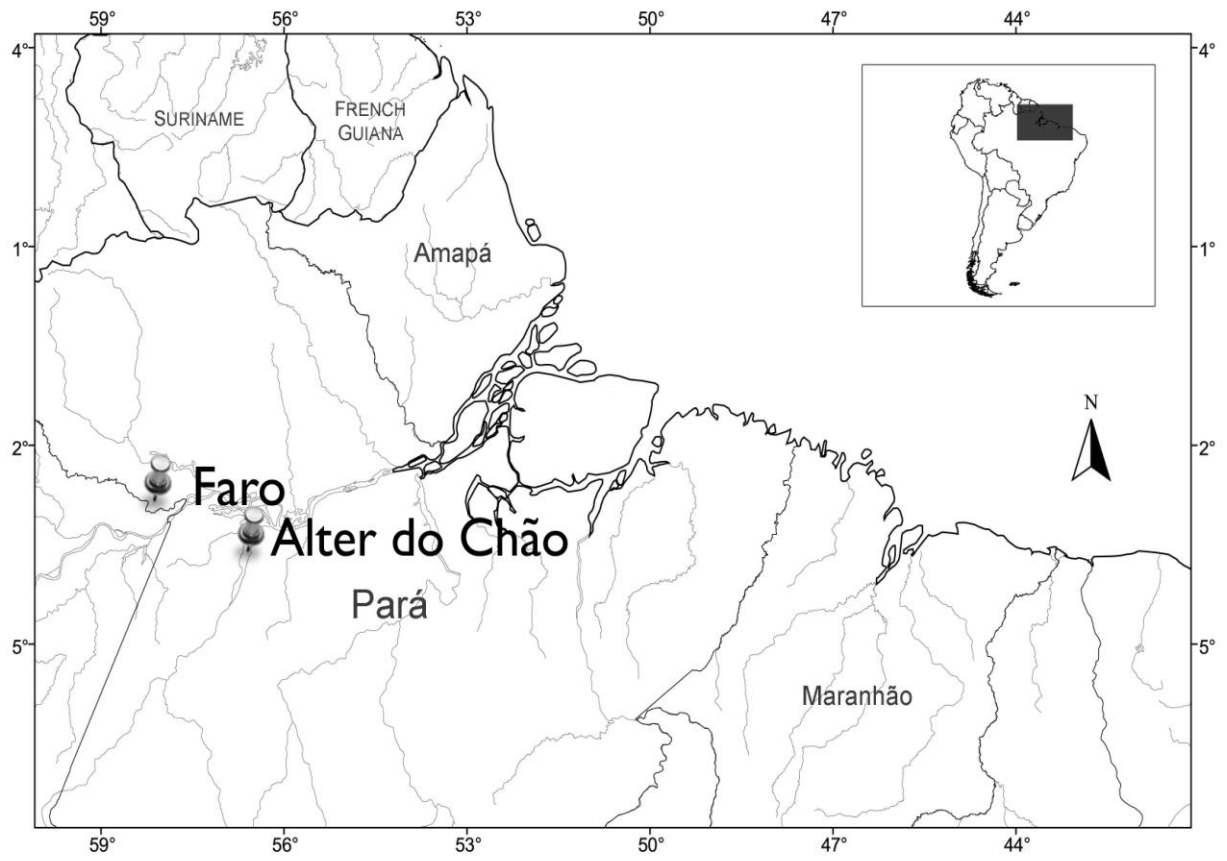


Figure 2

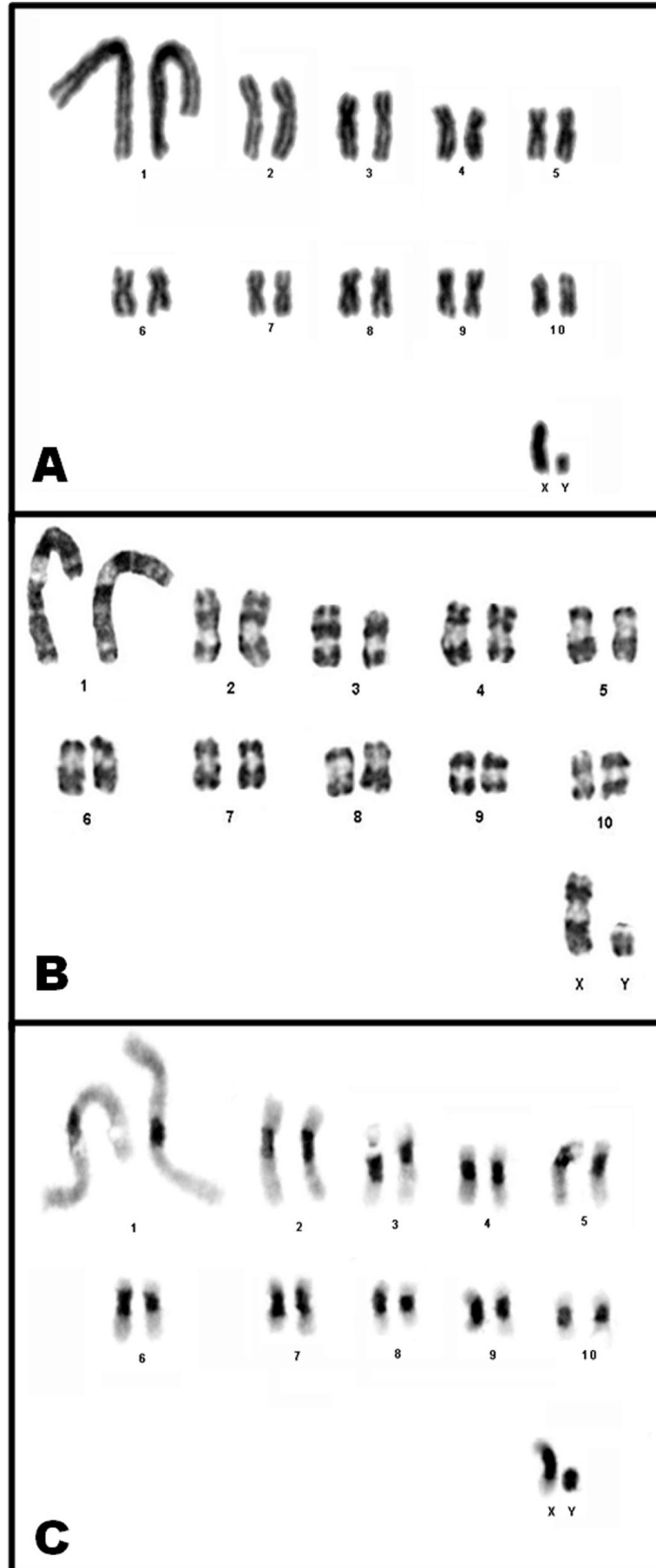


Figure 3

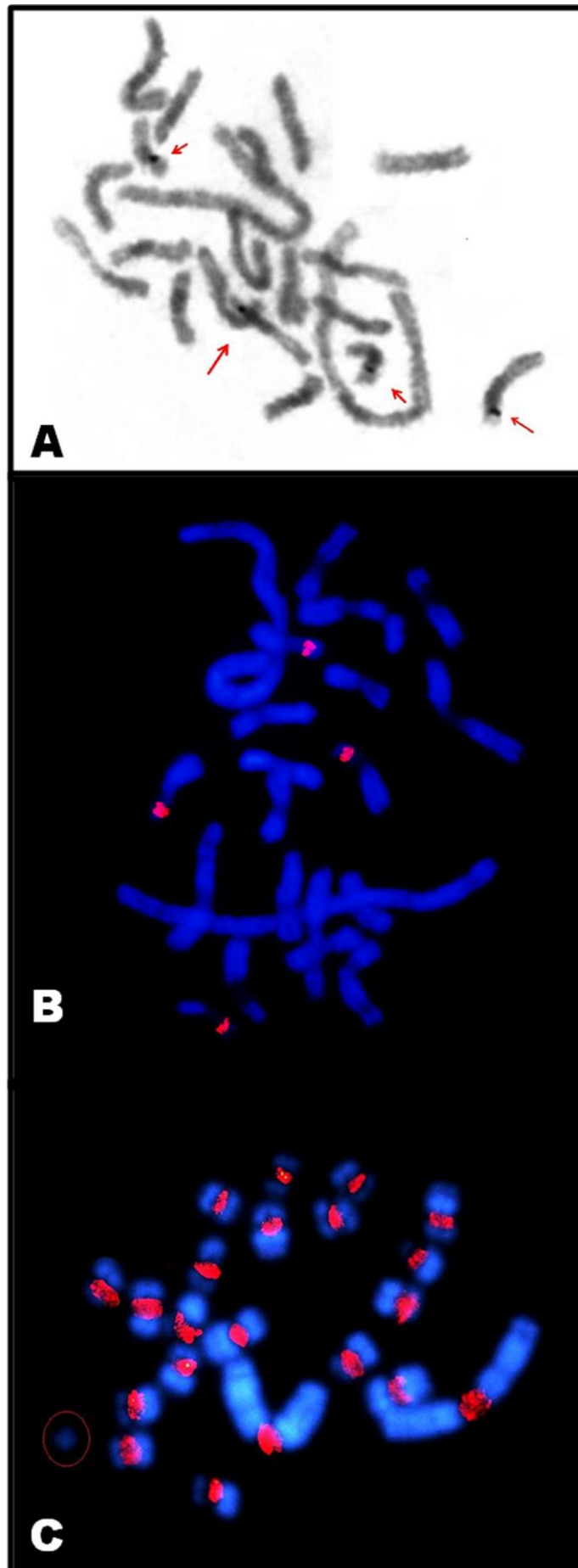


Figure 4

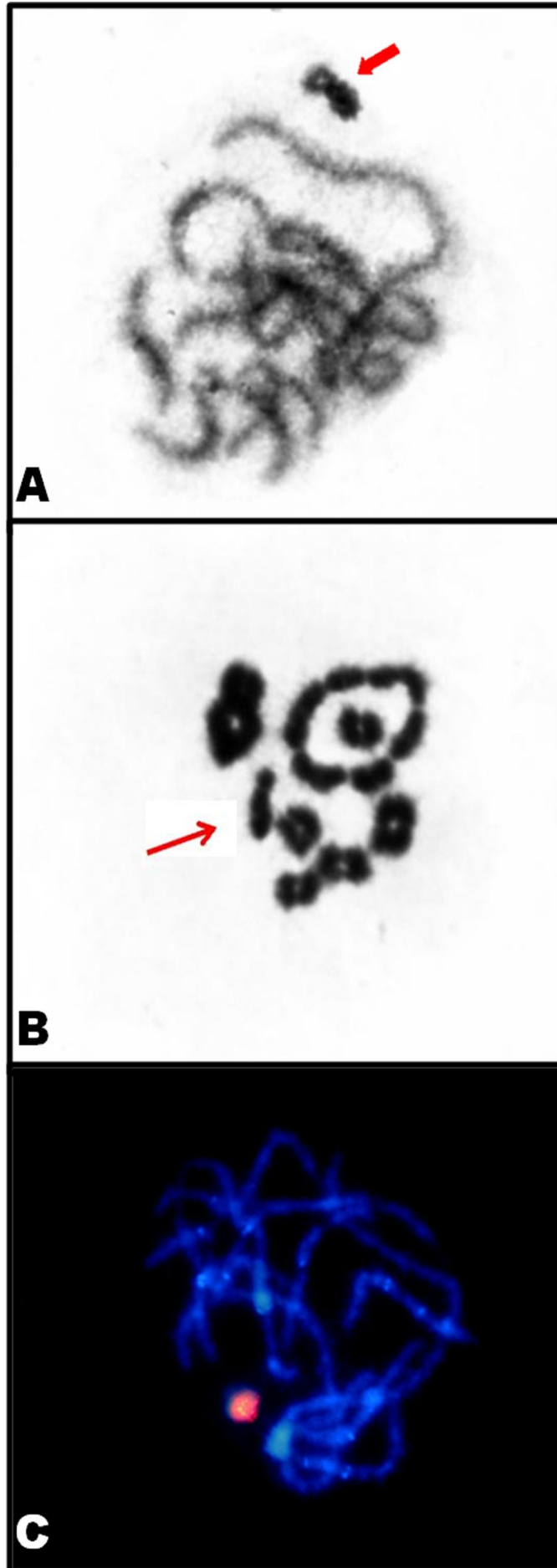


Table 1 – Cytogenetic studies in bats of the Emballonuridae family with distribution also in Brazil.

<u>Species</u>	<u>2n</u>	<u>NF</u>	<u>Techniques</u>	<u>Authors</u>
<i>Centronycteris maximiliani</i>	28	48	Conventional staining	Greenbahum and Jones (1978)
<i>Cyttarops alecto</i>	32	60	Conventional staining	Baker and Jones (1975)
<i>Cormura brevirostris</i>	22	40	G and C	Baker and Jordan (1970) Baker <i>et al.</i> (1981) Hood and Baker (1986)
<i>Rhynchonycteris naso</i>	22	36	G and C	Baker and Jordan (1970) Hood and Baker (1986)
<i>Peropteryx macrotis</i>	26	48	Conventional staining	Baker <i>et al.</i> (1981)
<i>Peropteryx leucoptera</i>	48	62	Conventional staining	Baker <i>et al.</i> (1981)
<i>Saccopteryx leptura</i>	28	38	G and C	Baker and Jordan (1970) Baker <i>et al.</i> (1981) Baker <i>et al.</i> (1982) Hood and Baker (1986)
<i>Saccopteryx bilineata</i>	26	36	G and C, rDNA	Baker (1970) Baker and Jordan (1970) Honeycutt <i>et al.</i> (1980) Hood and Baker (1986) Baker <i>et al.</i> (1992)
<i>Saccopteryx canescens</i>	24	38	G and C	Baker <i>et al.</i> (1982) Hood and Baker (1986)

Resultados preliminares do artigo 2

Rhynchonycteris naso

Todos os espécimes analisados apresentam $2n = 22$ e $NF = 36$, sendo oito pares de cromossomos de dois braços e dois pares de cromossomos acrocêntricos pequenos (Figura 2A). O cromossomo X é um acrocêntrico médio e o Y um acrocêntrico pequeno. As metáfases G bandeadas foram montadas de acordo com dados da literatura (Figura 2B). A heterocromatina constitutiva se distribui na região pericentromérica de todos os cromossomos e na região intersticial do par 9, sendo o cromossomo Y quase que inteiramente heterocromático (Figura 2C). As marcações com nitrato de prata foram observadas nas contrações secundárias do segundo par metacêntrico (Figura 2D). Marcações com sondas de DNA ribossomal 18S coincidiram com as marcações da prata (Figura 2E) e as seqüências teloméricas se distribuem nas regiões distais de todos os cromossomos (Figura 2F).

Saccopteryx canescens

Os espécimes analisados apresentam $2n=24$ e $FN=38$, sendo oito pares de cromossomos de dois braços e três pares de cromossomos acrocêntricos pequenos. O cromossomo X é um acrocêntrico médio e o cromossomo Y um acrocêntrico pequeno (Figura 3A). As metáfases G bandeadas foram montadas de acordo com dados da literatura (Figura 3B). A heterocromatina constitutiva se distribui na região pericentromérica de todos os cromossomos, mas se mostra pouco evidente no par 3; o cromossomo Y é quase que inteiramente heterocromático (Figura 3C). As marcações com nitrato de prata foram observadas nas contrações secundárias do segundo par metacêntrico e revelam um heteromorfismo de tamanho (Figura 3D). Marcações com sondas de DNA ribossomal 18S coincidiram com as marcações da prata (Figura 3E) e as seqüências teloméricas se distribuem nas regiões distais de todos os cromossomos (Figura 3F).

Saccopteryx leptura

Os espécimes analisados apresentam $2n=28$ e $NF=38$, sendo seis pares de cromossomos de dois braços e sete pares de cromossomos acrocêntricos de tamanhos médios e pequenos. O cromossomo X é um acrocêntrico médio e o cromossomo Y um acrocêntrico pequeno (Figura 4A). As metáfases G bandeadas foram montadas de acordo com dados da literatura (Figura 4B), o bandeamento C revelou que no complemento autossômico apenas os pares o pares 2 e 3 não apresentaram marcações. Os demais pares apresentaram marcações pericentroméricas, sendo o cromossomo Y quase que inteiramente heterocromático (Figura 4C). As marcações com nitrato de prata foram observadas nas contrações secundárias do segundo par metacêntrico (Figura 4D). Marcações com sondas de DNA ribossomal 18S coincidiram com as marcações da prata (Figura 4E) e as seqüências teloméricas se distribuem nas regiões distais de todos os cromossomos (Figura 4F).

FIGURAS E LEGENDAS

Figura 1. Locais de realização das coletas. Retirado de Google Earth.

Figura 2. *Rhynchonycteris naso* em: coloração convencional (2A), Bandeamento G (2B), Bandeamento C (2C), Regiões organizadoras de Nucléolos (setas-2D), FISH com sondas de DNA ribossomal 18S (2E), FISH com sondas teloméricas humanas (2F).

Figura 3. *Saccopteryx canescens* em: coloração convencional (3A), Bandeamento G (3B), Bandeamento C (3C), Regiões organizadoras de Nucléolos (setas-3D), FISH com sondas de DNA ribossomal 18S (3E), FISH com sondas teloméricas humanas (3F).

Figura 4. *Saccopteryx leptura* em: coloração convencional (4A), Bandeamento G (4B), Bandeamento C (4C), Regiões organizadoras de Nucléolos (setas-4D), FISH com sondas de DNA ribossomal 18S (4E), FISH com sondas teloméricas humanas (4F).

Figura 1



Figura 2

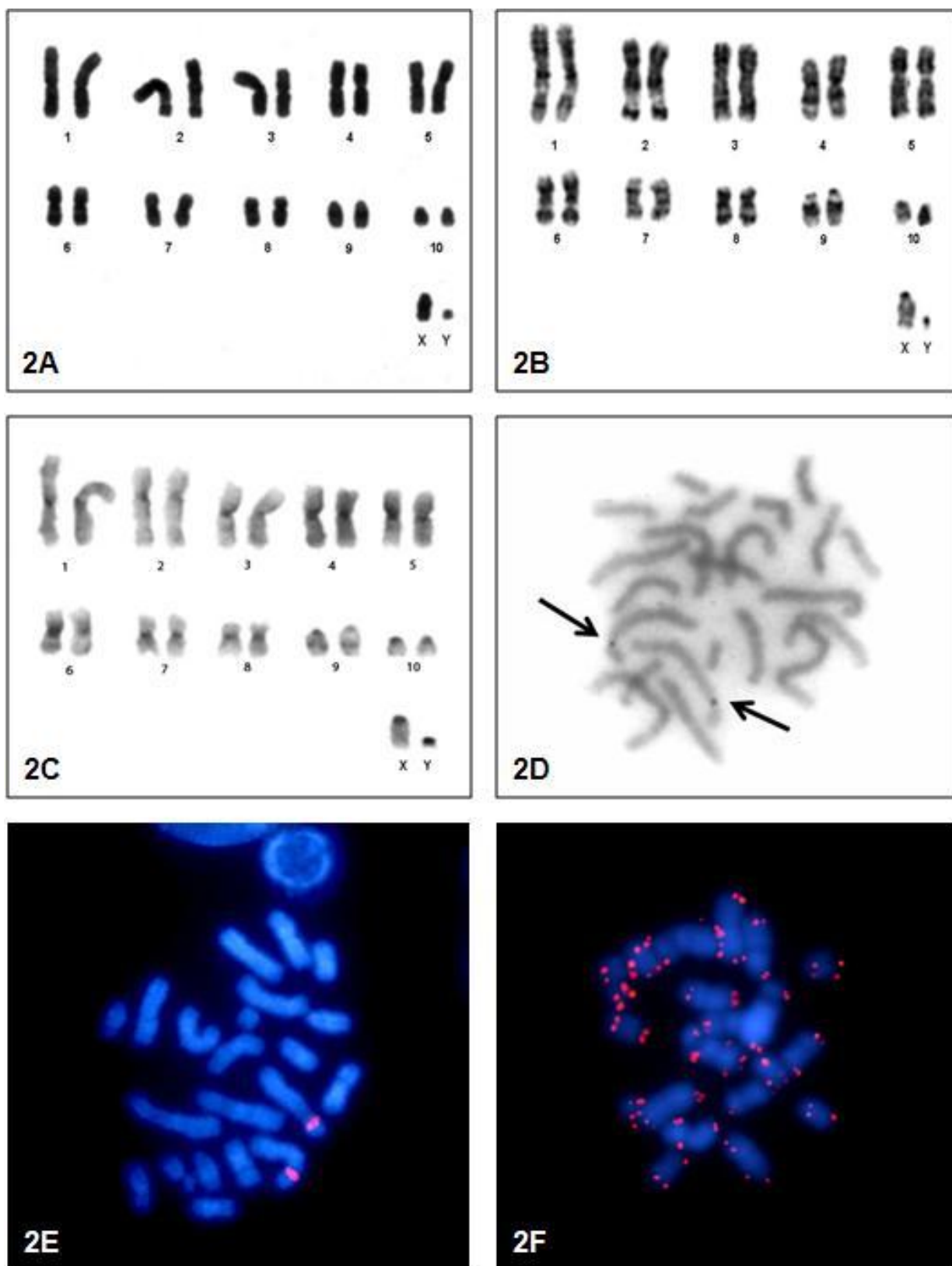


Figura 3

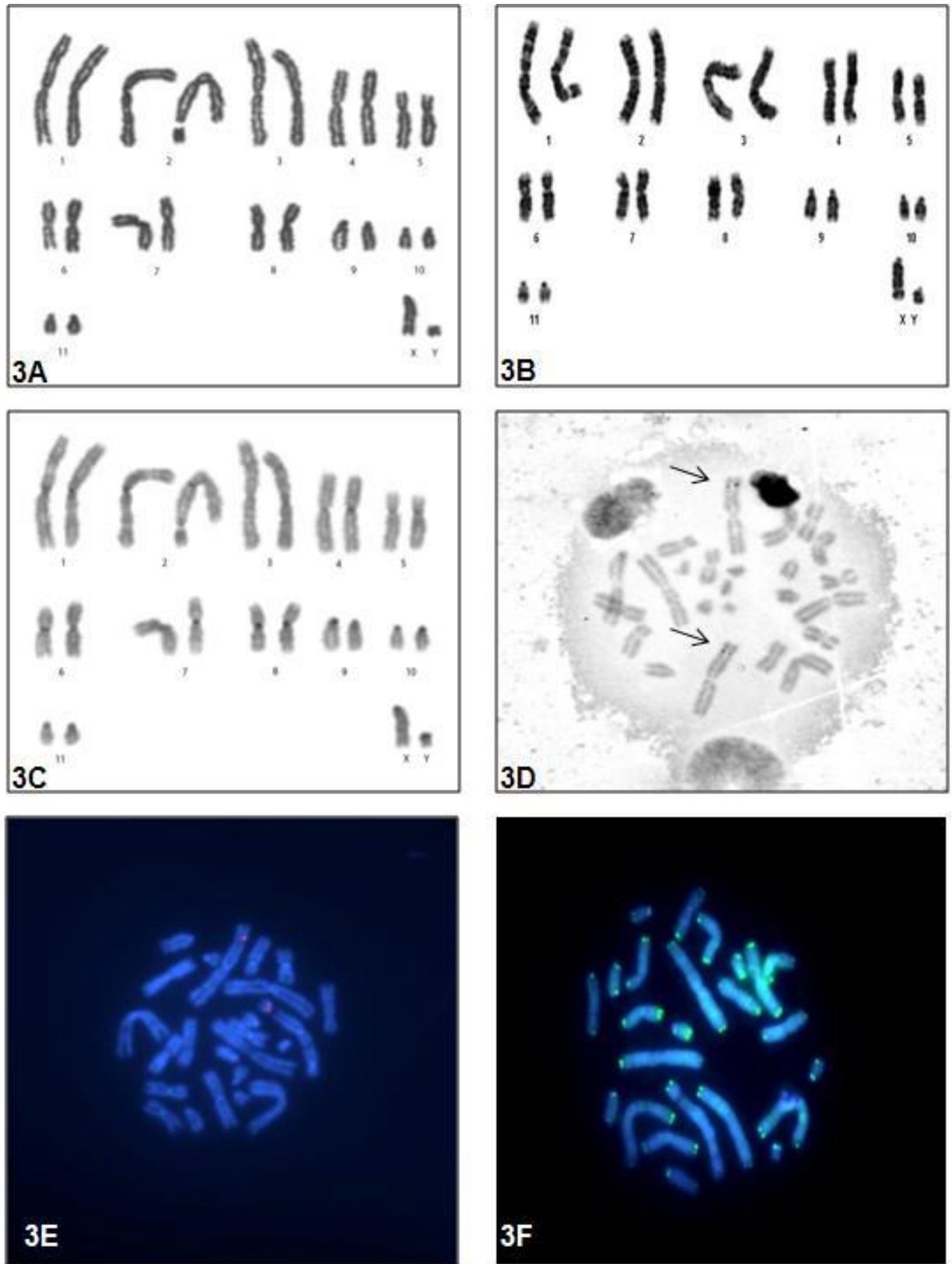
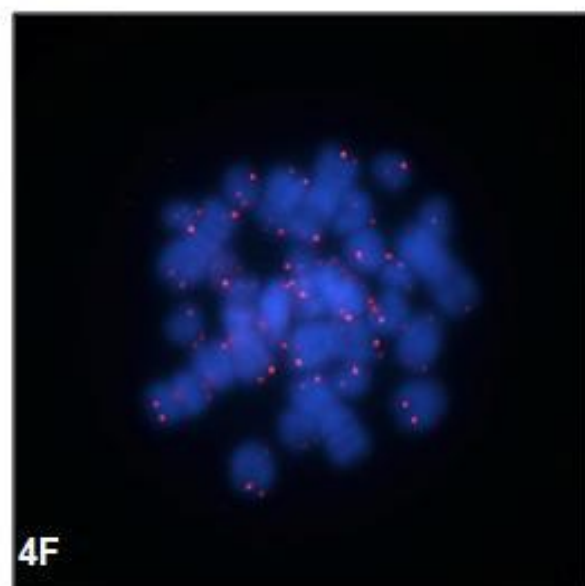
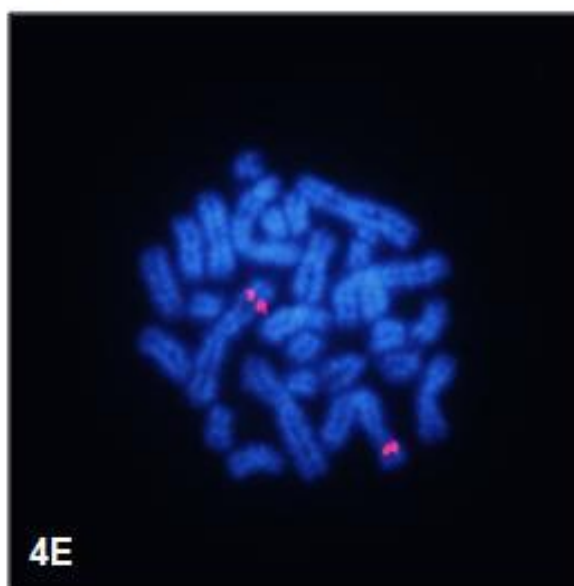
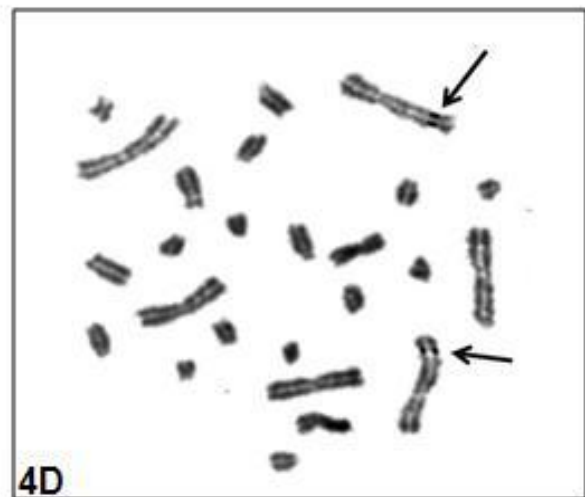
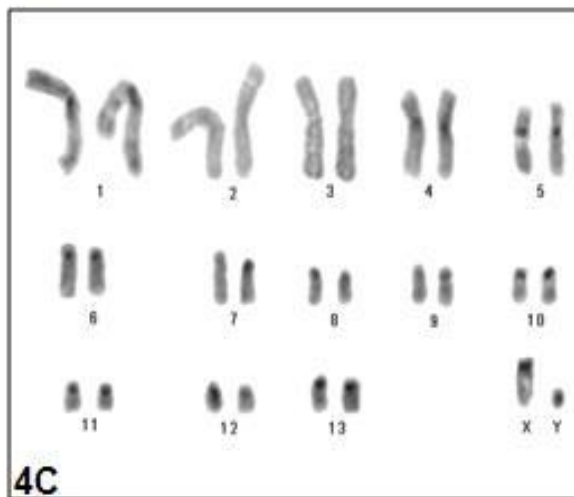
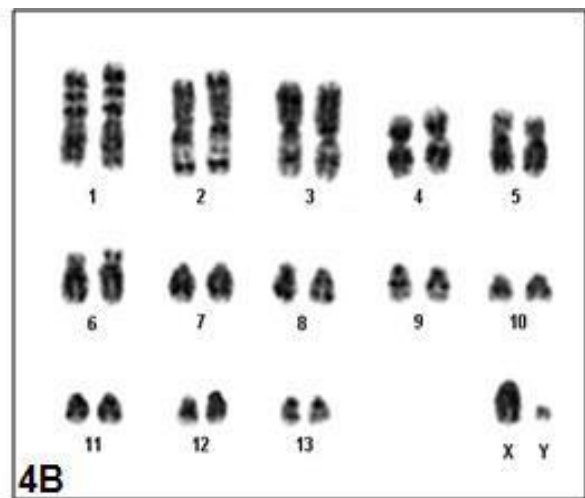
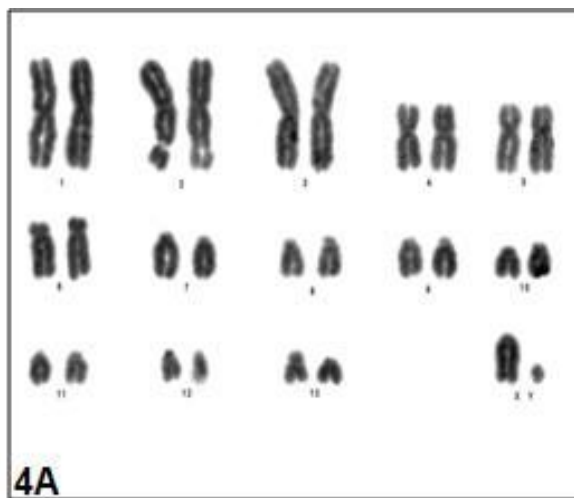


Figura 4



6. CONCLUSÕES

1. Os cariótipos de *Cormura brevirostris*, *Rhynchonycteris naso*, *Saccopteryx canescens* e *Saccopteryx leptura* da Amazônia Brasileira, analisados neste trabalho, são semelhantes àqueles descritos em espécimes da América central. As espécies apresentam $2n=22$ e $NF=40$; $2n=22$ e $NF=36$; $2n=24$ e $FN=38$; $2n=28$ e $NF=38$ respectivamente, revelando que os cariótipos de Emballonuridae são conservados mesmo comparando populações afastadas geograficamente.

2. Análise por coloração convencional mostra que não ocorre variação cromossômica intraespecífica nessas espécies, mas a análise do bandeamento C nos cariótipos de SCA e SLE apresentou-se diferente dos resultados já descritos na literatura, sendo um aspecto importante na caracterização cariotípica, uma vez que a heterocromatina pode variar entre as espécies, ou mesmo entre indivíduos da mesma espécie.

3. A detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos com a utilização da técnica de marcação com nitrato de prata revelou que nas espécies RNA, SCA e SLE, o segundo par cromossômico apresentou marcações nas constrições secundárias; em CBR temos dois pares de cromossomos com marcações, resultados coincidentes com a FISH com sondas de DNA Ribossomal.

4. Em CBR, FISH com sondas teloméricas humanas evidenciaram marcações nos centrômeros de todos os cromossomos, exceto o Y. Em RNA, SCA e SLE as marcações teloméricas presentes nas regiões distais de todos os cromossomos.

5. Através de estudos meióticos, bandeamentos cromossômicos e Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) utilizando sondas totais do cromossomo X de *Phyllostomus hastatus* (Chiroptera, Phyllostomidae) no cariótipo de CBR, sugerimos que o par sexual dessa espécie é diferente daquele descrito na literatura.

6. A análise meiótica revelou que as células em diplóteno-diacinese apresentaram uma conformação em anel envolvendo quatro pares de cromossomos, sugerindo a ocorrência de múltiplas translocações recíprocas envolvendo esses cromossomos, fato esse raro em vertebrados e inédito em mamíferos eutérios.

7. Estudos comparativos entre espécies de Emballonuridae e com morcegos de outras famílias através de FISH serão necessários para determinar rearranjos cromossômicos ocorridos dentro desse grupo e suas relações com outras famílias. Isso auxiliará a compreensão da biodiversidade de morcegos da Amazônia, assim como o entendimento da evolução cromossômica dos quirópteros como um todo.

6. PERSPECTIVAS

Atualmente vários estudos por Hibridização *in situ* Fluorescente vem sendo conduzidos em todo o mundo. Nossos resultados abrem novas perspectivas para elucidar relações cromossômicas existentes entre Emballonuridae e morcegos de outras famílias. Dando continuidade ao trabalho, pretendemos utilizar sondas de cromossomos totais de duas espécies da família Phyllostomidae: *Carollia brevicauda* e *Phyllostomus hastatus*, disponíveis no Laboratório de Citogenética animal da Universidade Federal do Pará, para analisar os cariótipos das diversas espécies de Emballonuridae e assim inferir sobre as relações de parentesco entre os gêneros de Emballonuridae, identificando os possíveis caracteres cromossômicos compartilhados com morcegos da família Phyllostomidae, o que contribuirá para o esclarecimento de relações filogenéticas dentro da ordem Chiroptera.