



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

**ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA EM ESPÉCIES DE MORCEGOS DA  
SUBFAMÍLIA PHYLLOSTOMINAE (CHIROPTERA-PHYLLOSTOMIDAE) POR  
CITOGENÉTICA CLÁSSICA E HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*  
FLOURESCENTE (FISH)**

**NATALIA KARINA NASCIMENTO DA SILVA**

Março 2011  
Belém-Pará



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

**ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA EM ESPÉCIES DE MORCEGOS DA  
SUBFAMÍLIA PHYLLOSTOMINAE (CHIROPTERA-PHYLLOSTOMIDAE) POR  
CITOGENÉTICA CLÁSSICA E HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*  
FLOURESCENTE (FISH)**

**NATALIA KARINA NASCIMENTO DA SILVA**

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

Orientador: Prof Dr Julio Cesar Pieczarka

Março 2011  
Belém-Pará

**NATALIA KARINA NASCIMENTO DA SILVA**

**ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA EM ESPÉCIES DE  
MORCEGOS DA SUBFAMÍLIA PHYLLOSTOMINAE (CHIROPTERA-  
PHYLLOSTOMIDAE) POR CITOGENÉTICA CLÁSSICA E  
HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLOURESCENTE (FISH)**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de “Mestre em Neurociências e Biologia Celular” e aprovada em sua forma final pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará.

Belém, 29 de Março de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**

**PROF. DR. JULIO CESAR PIECZARKA**

Orientador

**PROF. DR. EVONILDO COSTA GONÇALVES**

Membro

**PROFA. DRA. RENATA COELHO RODRIGUES NORONHA**

Membro

**PROFA. DRA. CLEUSA YOSHIKO NAGAMACHI**

Membro

## **INSTITUIÇÃO FINANCIADORA**

Esta Dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Citogenética, no Instituto de Ciências Biológicas, da UFPA e contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aluna recebeu a bolsa de estudos concedida pela CAPES.

O presente trabalho foi realizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA), sob a orientação do Prof. Dr. Julio Cesar Peiczarka, com o auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*"Só podemos preservar o que amamos,  
Só podemos amar o que entendemos,  
Só podemos entender o que nos foi  
ensinado"*

Autor desconhecido

*Este trabalho é dedicado a minha mãe e melhor amiga,  
por acreditar nos meus sonhos e por seu grande amor.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre esteve comigo em todos os momentos e me proporcionou mais esta conquista em minha vida.

Ao meu orientador Dr Julio Cesar Pieczarka pela oportunidade, orientação e confiança durante este estudo.

À Dr<sup>a</sup> Cleusa Nagamachi pela co-orientação desde a iniciação científica até os dias de hoje, pelas leituras críticas e apoio.

As Dr<sup>a</sup> Susana Milhomem Paixão e Dr<sup>a</sup> Renata Noronha pela disponibilidade e auxílio sempre que necessário e por encararem com alegria essa nova batalha de organizar o LabCito.

Ao Dr Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues pela concessão das amostras, sem isso esse trabalho não seria possível.

Aos técnicos do Laboratório de Citogenética: Jorge Rissino pelas culturas celulares e pelos momentos de descontração, Dona Conceição pelo café mais gostoso e pela manutenção do laboratório e a Shirley a mais nova companheira, cheia de bolos deliciosos e é lógico por fazer o tampão fosfato PH 6.8.

Aos meus companheiros de equipe Bat's: Anderson, Ramon e Taysse pelas incansáveis coletas e técnicas que as vezes dão certo outras nem tanto.

Em especial ao Anderson pelo companheirismo de todas as horas, apoio, força e aprendizado na realização das técnicas de hibridização e na análise das bandas. Sou muito grata.

Aos colegas do laboratório de Citogenética: Pablo Suarez (Tio), Danillo, Patrícia, Fernando, aos recém mestrados: Aduino, Adenilson, Ingrid, Karina e Stella, aos PIBIC's



Anneiriane, Willan, Marlyson, Mila, Vergiana, Jessica e Geovana pelas ajudas e momentos de descontração durante esse tempo.

À minha amiga Celina “Maria” Coelho da Rosa pela amizade, companheirismo, e apoio nos momentos de dificuldade e com quem eu dividi alegrias e conquistas.

Aos meus pais, Arnaldo e Jacira, especialmente à minha mãe, pela pessoa maravilhosa que é e por estar ao meu lado, sempre ajudando para tornar meus sonhos possíveis, sem medir esforços.

À minha querida tia, quase uma irmã, Mira, pela amizade, carinho e apoio no dia-a-dia e nos momentos difíceis.

Aos familiares, amigos, professores, enfim a todos que contribuíram de alguma forma para que eu pudesse terminar esse trabalho e espero poder retribuir de algum modo a confiança depositada em mim.

À CAPES pelo financiamento através da bolsa de mestrado, durante o desenvolvimento deste projeto.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ORDEM CHIROPTERA.....	1
1.2 – ORIGEM E EVOLUÇÃO DA ORDEM CHIROPTERA .....	8
1.3 – FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE.....	14
<b>1.3.1 –Subfamília Phyllostominae</b> .....	<b>20</b>
1.4 – CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO NA FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE .....	26
<b>1.4.1 –Subfamília Phyllostominae ( <i>sensu</i> BAKER et al., 2003)</b> .....	<b>31</b>
1.5 - HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> .....	34
<b>2 –REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>37</b>
<b>3- OBJETIVOS</b> .....	<b>46</b>
3.1 – GERAL.....	46
3.2 – ESPECÍFICOS .....	46
<b>4-MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>47</b>
<b>5- CONCLUSÕES</b> .....	<b>69</b>
<b>ANEXO 1:Fotos das espécies estudadas</b> .....	<b>71</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diversidade de morcegos baseados no número de espécies por 500 Km<sup>2</sup> através do mundo (adaptado de Findley, 1993). Gradientes de cores do branco (ausência de espécies) ao vermelho (120 espécies por 500 Km<sup>2</sup>) com acréscimo de 20.....4
- Figura 2.** Morfologia esquemática da estrutura da asa (Reis *et al*, 2007).....5
- Figura 3.** Diversidade de morcegos quanto aos hábitos alimentares.....6
- Figura 4.** a) *Craseonycteris thonglongyai* b) *Pteropus giganteus* Fonte: morceguismos.blogspot.com.....7
- Figura 5.** Reconstrução do padrão temporal de diversificação das principais linhagens de morcego baseado na árvore filogenética de Simmons & Gleisler (1998). 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. Fonte de Simmons (2005).....12
- Figura 6.** Reconstrução do padrão temporal de diversificação das principais linhagens de morcego baseado em árvores 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. Fonte: Simmons (2005).....13
- Figura 7.** Árvore de evidência total, proposta por Wetterer *et al.* (2000) construída a partir da análise de máxima parcimônia de 150 caracteres, principalmente morfológicos, de 63 táxons. Os números acima das linhas indicam os valores de decaimento; números abaixo indicam valores do *bootstrap*....18
- Figura 8.** Filogenia mostrando as relações de divergência de seqüências entre os gêneros de Phyllostomidae, apresentado por Baker *et al.* (2003). À direita, classificação definida por esses autores.....19
- Figura 9.** Filogenia proposta por Hoffmann *et al.* (2008) baseada em máxima parcimônia, descrevendo as relações entre os gêneros de morcegos da subfamília Phyllostominae. Os números acima das linhas indicam os valores de *bootstrap*, os números abaixo indicam valores de probabilidade Bayesiana. As barras verticais indicam a relação a nível tribal dos gêneros na subfamília Phyllostominae.....24

## RESUMO

Os morcegos representam um grupo amplamente distribuído e diversificado. A diversidade de hábitos alimentares faz da ordem Chiroptera uma das mais bem sucedidas entre os mamíferos, desempenhando, em função de seus hábitos, um importante papel no controle de insetos, na polinização e na dispersão de sementes de numerosos vegetais. A família Phyllostomidae constitui a terceira maior família em número de espécies dentro da Ordem Chiroptera. Entre as representantes neotropicais é a mais numerosa, sendo encontrada em florestas tropicais da América do Sul, particularmente, concentrada na Amazônia que é a região com maior diversidade de morcegos do mundo. No presente trabalho foram analisados citogeneticamente exemplares de três espécies da subfamília Phyllostominae: *Chrotopterus auritus*, *Trachops cirrhosus* e *Vampyrum spectrum* coletados no estado do Pará e Amazonas. Os dados cromossômicos obtidos para *Chrotopterus auritus* ( $2n = 28$  e  $NF = 52$ ) e *Trachops cirrhosus* ( $2n = 30$ ,  $FN = 56$ ) estão de acordo com os descritos na literatura. Para *Vampyrum spectrum* ( $2n=30$   $NF=56$ ) relatamos os primeiros padrões de bandeamento e FISH (Hibridização *in situ* Fluorescente). A técnica de bandeamento C demonstrou um padrão pericentromérico de distribuição da heterocromatina constitutiva nas três espécies estudadas. A técnica de FISH com sondas de DNA teloméricas humanas mostrou apenas marcações distais em todos os cromossomos das três espécies e as sondas de rDNA 18S confirmaram a localização das Regiões Organizadoras Nucleares observadas na técnica de Ag-NOR, presentes no braço longo do par 2 de *Chrotopterus auritus*, no par 11 de *Trachops cirrhosus* e no braço longo do par 1 de *Vampyrum spectrum*. A análise comparativa entre elas sugere um extenso grau de diferenciação cromossômica, com poucos cromossomos compartilhados entre os três gêneros. Contudo, cinco pares cromossômicos inteiros se mantiveram conservados sem nenhum tipo de rearranjo após a divergência das três linhagens. A comparação entre as espécies revela que *C. auritus* e *V. spectrum* apresentam mais elementos compartilhados entre si do que em relação à *T. cirrhosus*. Nossos resultados apoiam a proximidade filogenética entre *C. auritus* e *V. spectrum* e sugerem a associação de *T. cirrhosus* com o clado do gênero *Phyllostomus*.

Palavras chave: Chiroptera, Phyllostominae, citogenética, bandeamento cromossômico, diversidade.

**ABSTRACT**

Bats are a highly distributed and diversified group. The diversity of feeding habits makes the Order Chiroptera one of the highest successes among mammals, being very important, because of these habits, on the control of insects, on pollination, and on dispersion of seeds of many vegetables. The family Phyllostomidae is the third bigger family on number of species into the Order Chiroptera. Among the neotropical ones, this family is the most numerous, being found in the rainforests of South America, especially in the Amazon region, where there is the highest diversity of bats in the World. In the present work it was analyzed cytogenetically a sample of three species of the subfamily Phyllostominae: *Chrotopterus auritus*, *Trachops cirrhosus* and *Vampyrum spectrum* collected in the Pará and Amazon states. The chromosomal data obtained for *Chrotopterus auritus* ( $2n = 28$  e  $NF = 52$ ) and *Trachops cirrhosus* ( $2n = 30$ ,  $FN = 56$ ) are in agreement with the ones described in the literature. For *Vampyrum spectrum* ( $2n=30$   $NF=56$ ) we described for the first time the banding patterns and FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization). The C-banding technique demonstrated a pericentric pattern of distribution of the centromeric heterochromatin in the three species here studied. The FISH with telomeric DNA probes shown only distal hybridizations in all chromosomes of the three species, while the 18S rDNA probe confirmed the location of the NOR observed by Ag-NOR staining, in the long arm of pair 2 *Chrotopterus auritus*, in the pair 11 of *Trachops cirrhosus* and in the long arm of the pair 1 of *Vampyrum spectrum*. The comparative analysis among the species suggests an extensive chromosomal differentiation, with few chromosome pairs being shared among the three genera. Five whole chromosome pairs were conserved without any rearrangement after the divergence of the three lineages. The comparison among the species shows that *C. auritus* and *V. spectrum* have more shared pairs between them than with *T. cirrhosus*. Our results support the phylogenetic association between *C. auritus* and *V. spectrum* and suggest the association of *T. cirrhosus* with the genus *Phyllostomus*.

Key words: Chiroptera, Phyllostominae, cytogenetic, chromosome banding, diversity

# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 - CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ORDEM CHIROPTERA

Os morcegos, constituintes da Ordem Chiroptera (do grego *cheir*: mão e *pteron*: asa) pertencentes à Classe Mammalia, representam o segundo grupo mais diversificado e amplamente distribuído de mamíferos placentários, somente sendo superados pela Ordem Rodentia, com aproximadamente 2277 espécies (Wilson & Reeder, 2005). Os quirópteros apresentam-se divididos em dezenove famílias, 202 gêneros e 1120 espécies (Simmons, 2005; Miller-Butterworth *et al.*, 2007), representando aproximadamente 22% de todas as espécies de mamíferos conhecidas, que totalizam 5416 espécies (Wilson & Reeder, 2005).

As dezenove famílias que compreendem a ordem são tradicionalmente divididas em duas subordens, os Megachiroptera e Microchiroptera. A subordem Megachiroptera, que não ocorre no Brasil, possui apenas uma única família, Pteropodidae, dividida em 4 subfamílias: Pteropodinae, Harponycterinae, Nyctimeninae e Macroglossinae (Hill & Smith, 1986) com 42 gêneros e 186 espécies, sendo restritas ao Velho Mundo (África, Ásia, Austrália e Oceania) onde são popularmente conhecidas como “raposas voadoras” (Simmons, 2005). Eles são diretamente dependentes da visão para se orientarem nos vôos crepusculares e noturnos, e por isso possuem olhos grandes, que ajudam na localização de flores e frutos, os quais representam a base de sua dieta (Simmons, 2005). Estes morcegos não apresentam o recurso da ecolocalização em sua maioria, ocorrendo apenas em espécies pertencentes ao gênero *Rousettus*.

A subordem Microchiroptera é dividida em quatro superfamílias, com 18 famílias, 160 gêneros e 930 espécies de ampla distribuição geográfica: Emballonuroidea (Rhinopomatidae, Emballonuridae e Craseonycteridae), Rhinolophoidea (Rhinolophidae,

Hipposideridae, Nycteridae e Megadermatidae), Phyllostomoidea (Noctilionoidea, Mormoopidae, Mystacinidae e Phyllostomidae) e Vespertilionoidea (Vespertilionidae, Natalidae, Furipteridae, Thyropteridae, Myzopodidae e Molossidae). Três famílias são cosmopolitas (Emballonuridae, Molossidae e Vespertilionidae) e nove ocorrem no Novo Mundo. No Brasil são reconhecidas as nove famílias (Emballonuridae, Phyllostomidae, Mormoopidae, Noctilionidae, Furipteridae, Thyropteridae, Natalidae, Molossidae e Vespertilionidae), 64 gêneros e cerca de 167 espécies (Reis *et al.* 2007), sendo o país com o segundo maior número de espécies da América do Sul, superado apenas pela Colômbia (Reis *et al.*, 2006).

Os microquirópteros desenvolveram o recurso da ecolocalização, um sistema orientador espacial mais especializado que a visão dos megaquirópteros e, portanto, são bastante adaptados a vôos noturnos. Este sistema está entre os fatores responsáveis pela maior diversidade evolutiva na subordem, permitindo exploração de ampla variedade de abrigos e de alimentos, em comparação com os Megachiroptera (Nowak, 1994; Altringham, 1996; Marques-Aguiar *et al.*, 2002). A Tabela 1 apresenta dados sobre as famílias que compõem as subordens, destacando as encontradas no Brasil, com seus respectivos número de espécies.

Tabela 1: Número de gêneros e espécies das diversas famílias da Ordem Chiroptera, demonstrando as quantidades encontradas no Brasil.

<i>Taxon</i>	Gêneros	Espécies	Nº Espécies Brasileiras
<b>Megachiroptera</b>			
Pteropodidae	42	186	-
<b>Microchiroptera</b>			
Emballonuroidea			
Rhinopomatidae	1	4	-
Emballonuridae	13	51	15
Craseonycteridae	1	1	-
Rhinolophoidea			
Rhinolophidae	1	77	-
Hipposideridae	9	81	-
Nycteridae	1	16	-
Megadermatidae	4	5	-
Phyllostomoidea			
Noctilionidae	1	2	2
Mormoopidae	2	10	04
Mystacinidae	1	2	-
Phyllostomidae	55	160	90
Vespertilionoidea			
Vespertilionidae	48	407	24
Natalidae	3	8	01
Furipteridae	2	2	01
Thyropteridae	1	3	04
Myzopodidae	1	1	-
Molossidae	16	100	26

Fonte: Altringham, 1996; Simmons, 2005; Reis *et al*, 2007.

Os morcegos ocorrem desde as regiões de grandes latitudes até desertos e ilhas remotas, sendo as regiões neotropicais e temperadas, como América Central e do Sul, as áreas mais ricas em espécies. As áreas mais pobres em espécies são formadas pela América do Norte e o Norte da Eurásia (Nowak, 1999). De acordo com Findley (1993) essa diferença de distribuição é devida à diminuição do número de espécies com o aumento da latitude, o que está de acordo com os vários registros sobre a distribuição mundial de espécies (Figura 1).



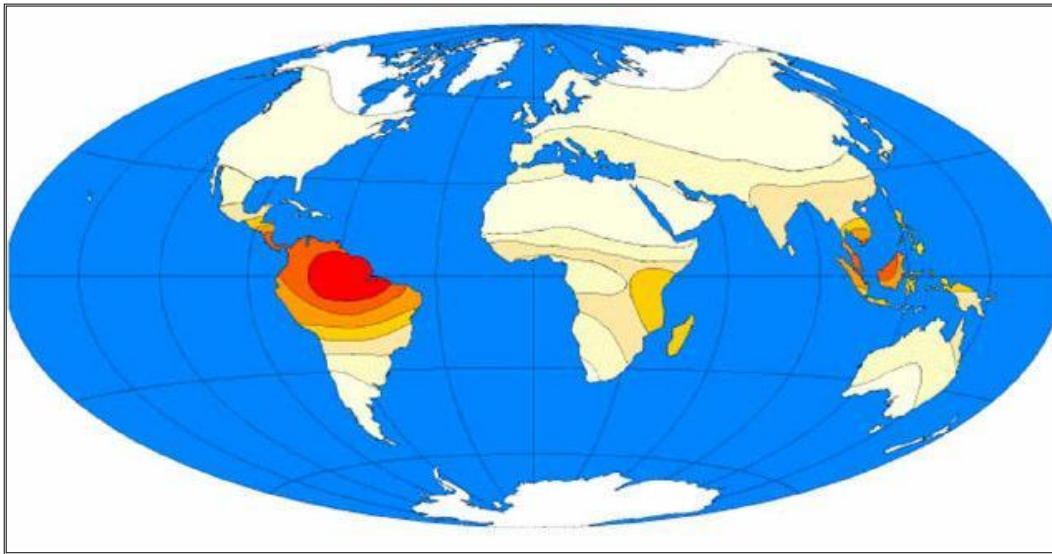


Figura 1. Diversidade de morcegos baseados no número de espécies por 500 Km<sup>2</sup> através do mundo (adaptado de Findley, 1993). Gradientes de cores do branco (ausência de espécies) ao vermelho (120 espécies por 500 Km<sup>2</sup>) com acréscimo de 20.

Segundo Jones *et al.* (2002), a maioria das espécies de morcegos ocorre nos trópicos, sendo raramente encontradas em latitudes maiores do que 50°. Somente as famílias Rhinolophidae, Molossidae e Vespertilionidae são também encontradas em regiões temperadas. Nos trópicos há um aumento da riqueza de espécies em direção ao equador, com três principais centros de biodiversidade: as regiões de florestas tropicais na América e no sudeste da Ásia e a região de savanas equatorial no leste da África. Particularmente, a maior diversidade de espécies está nos neotrópicos, concentrada na Amazônia, que é a região com maior diversidade de morcegos do mundo, com cerca de 120 espécies por 500 Km<sup>2</sup>.

Os morcegos destacam-se por serem os únicos mamíferos capazes de vôo verdadeiro, enquanto que representantes de outras ordens, como os lêmures voadores (Dermoptera) apenas planam, pois possuem um par de membranas laterais que estabelecem uma conexão contínua entre seus membros anteriores e posteriores (Nowak, 2004). As asas membranosas dos quirópteros se estendem das laterais do tronco e membros posteriores até o quinto dedo, braço e antebraço (constituindo o plagiopatágio), entre o polegar e os

ombros (propatágio), entre os quilodáctilos (dactilopatágio) e, em alguns táxons, entre as pernas (uropatágio) (Figura 2). A habilidade e velocidade de vôo estão relacionadas com a estrutura da asa, influenciando no tipo de forrageio e nichos aos que os quirópteros podem associar-se. Esta característica importante ajudou na exploração de diversos habitats, onde a diminuição do número de predadores e competidores possibilitou a utilização de diferentes formas de alimento e abrigo (Freeman, 1981).

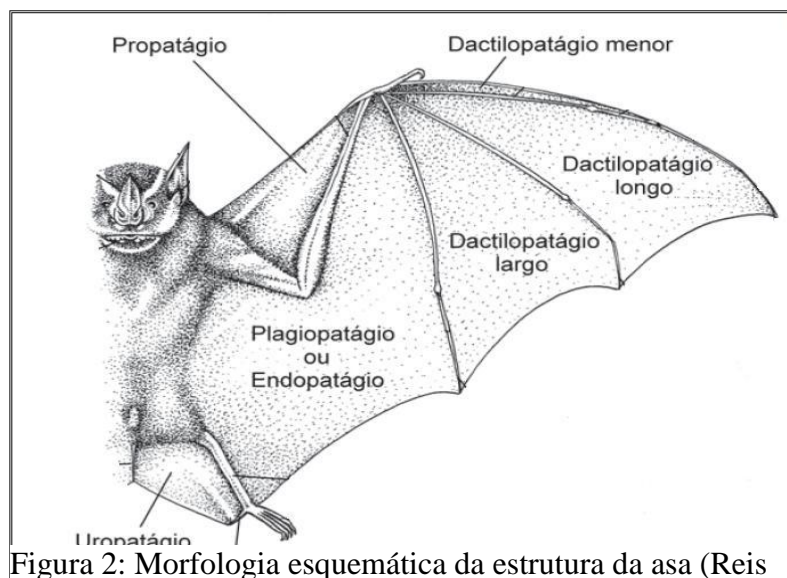


Figura 2: Morfologia esquemática da estrutura da asa (Reis *et al.*, 2007).

Na ordem Chiroptera é observada uma grande variedade de hábitos alimentares entre as espécies (Figura 3). Este grupo pode se alimentar de uma variada gama de tipos de alimentos, como frutos, néctar, pólen, partes florais, folhas, insetos, outros artrópodes, pequenos peixes, anfíbios, pássaros, pequenos mamíferos e sangue. Esta variedade aumenta a necessidade de estudos para esclarecer sua origem evolutiva (Freeman, 2000; Reis *et al.*, 2006).



Figura 3: Diversidade de morcegos quanto aos hábitos alimentares.

A morfologia e o tamanho corpóreo dos quirópteros variam bastante (Figura 4). A ordem possui espécies cujo tamanho e peso total varia de cerca de 2 g (morcego-abelha da Tailândia, *Craseonycteris thonglongyai*, que é o menor mamífero existente), a espécies que podem chegar a 1,6 kg (raposa voadora do Velho Mundo, *Pteropus giganteus*) (Nowak, 1994).



Figura 4: a) *Craseonycteris thonglongyai*. b) *Pteropus giganteus*. Fonte de morceguismos.blogspot.com

A maioria das espécies possui uma adaptação sensorial (ecolocalização), que lhes permite explorar uma ampla variedade de nichos ecológicos, recurso que auxilia na percepção do espaço, já que a maioria das espécies possui hábitos noturnos, utilizando o recurso juntamente com a visão para o forrageio. Esta característica é inerente aos microquirópteros, contudo pode ser encontrada em espécies do gênero *Rousettus*, um megaquiróptero (Altringham, 1996). A origem filogenética do recurso da ecolocalização dentro da Ordem Chiroptera, ainda permanece incerta, podendo ter ocorrido uma única vez ou várias vezes na evolução da ordem (Jones & Teeling, 2006).

A ampla distribuição geográfica e a diversidade de hábitos alimentares permitem que esses mamíferos explorem vários nichos ecológicos, tornando-os importantes membros em muitos ecossistemas, atuando como polinizadores e dispersores de sementes, bem como na regulação de populações de insetos noturnos (Jones, 2002; Teeling *et al*, 2005).

## 1.2 – ORIGEM E EVOLUÇÃO DA ORDEM CHIROPTERA

A dificuldade em estabelecer vínculos filogenéticos entre diferentes grupos de morcegos sugere uma origem muito antiga, o que explicaria a ausência de fósseis com informações relevantes sobre o período inicial da evolução dos morcegos, que representariam a transição dos ancestrais arborícolas para as atuais espécies voadoras, tornando a origem dos morcegos incerta (Reis *et al*, 2007).

O fóssil de morcego mais antigo conhecido, *Icaronycteris index*, foi encontrado na América do Norte em sedimentos da formação “Green River”, datando do início do Eoceno, há aproximadamente 52 milhões de anos. Este fóssil corresponde a um microquiróptero muito semelhante aos atuais de hábitos insetívoros, já apresentando adaptações ao voo e o recurso da ecolocalização. Isto sugere uma origem mais antiga para o grupo que, segundo Teeling *et al*. (2005), data de 64 milhões de anos atrás, período que teria ocorrido a diversificação entre os grupos de Megachiroptera e Microchiroptera.

A história recente das filogenias geradas para a ordem é repleta de controvérsias. Até o início dos anos 80 acreditava-se que a ordem Chiroptera era um grupo monofilético, onde todos os morcegos apresentavam um ancestral voador em comum. Assim a capacidade de voo teria acontecido uma única vez na história evolutiva do grupo. A parafilia é sugerida por Pettigrew (1986) e Pettigrew *et al*. (1989), que através de estudos da estrutura neural, sugerem que os Megachiroptera (Pteropodidae) estariam mais intimamente relacionados com os primatas do que com os Microchiroptera, propondo então que o voo teria evoluído duas vezes na história dos mamíferos. Contudo, a maioria dos dados imunológicos, morfológicos, moleculares e cromossômicos está em desacordo com a hipótese de Pettigrew (1986, 1995), apoiando fortemente a monofilia dos morcegos e, portanto, uma única origem de voo nos mamíferos (Simmons, 1994; Jones *et al*, 2002; Jones & Telling, 2006; Mao *et al*, 2008).

Baseados em evidências morfológicas, acreditava-se tradicionalmente que a Ordem Chiroptera estava intimamente relacionada com as ordens Dermoptera, Primatas e Scandentia, constituindo assim a Superordem Archonta (Gregory, 1910 *apud* Wetterer *et al.* 2000). Contudo, com o avanço dos estudos moleculares, dados da pintura cromossômica (ZOO-FISH) e aumento do registro fóssil, proporcionaram uma nova visão sobre a evolução de Chiroptera, questionando a validade da Superordem Archonta, e relacionando os quirópteros à Superordem Laurasiatheria, juntamente com as ordens Cetartiodactyla, Perissodactyla, Carnivora, Pholipota e Eulipothypla (Telling, 2000, 2002; Van Den Bussche, 2002; Reis *et al.*, 2007). Essa nova análise é também sustentada por dois estudos moleculares que envolvem todas as ordens de mamíferos placentários (Madsen *et al.*, 2001; Murphy *et al.* 2001), onde os caracteres morfológicos inovadores que seriam compartilhados entre morcegos e lêmures, coloca-os como grupo irmão na Superordem Archonta (Szalay & Drawhorn, 1980; Simmons, 1994), na realidade teriam evoluído de forma independente nesses dois grupos. Apesar de mais de duas décadas de estudos que pressupõem o monofiletismo de Archonta e a inclusão de Chiroptera, baseados na aparente prova sustentada por dados morfológicos, segundo Van Den Bussche & Hooper (2004) o agrupamento não é natural, devido às variações que ocorrem nas características morfológicas, que deveriam unir as ordens que compõe o grupo, não gerando um suporte para apoiar a monofilia. Devido às controvérsias geradas pela tradicional hipótese morfológica em discordância com as novas hipóteses moleculares, a questão da classificação da Ordem Chiroptera permanece em aberto.

Em relação à monofilia das duas subordens, os dados morfológicos e moleculares também têm gerado hipóteses contrastantes. Hipóteses filogenéticas tradicionais, baseadas em dados morfológicos, propõem a divisão da ordem em duas subordens monofiléticas, Megachiroptera e Microchiroptera. Koopman (1985 *apud* Simmons & Geisler, 1998), através

de análises de caracteres morfológicos, divide a subordem Microchiroptera em duas infraordens: a) Yinochiroptera, composta pelas superfamílias Rhinolophoidea (Rhinolophidae, Hipposideridae, Nycteridae e Megadermatidae) e Emballonuroidea (Rhinopomatidae, Craseonycteridae e Emballonuridae); b) Yangochiroptera, formada pelas superfamílias Noctilinoidea (Mystacinidae, Noctilinoidea, Mormoopidae e Phyllostomidae) e Vespertilionoidea (Vespertilionidae, Natalidae, Furipteridae, Thyropteridae, Myzopodidae e Molossidae). As análises baseadas em dados morfológicos de espécies existentes e exemplares fósseis remetem aos agrupamentos inicialmente propostos, mas com modificações (Simmons & Geisler, 1998; Simmons, 2005) (Figura 5).

Assim, os dados morfológicos sugerem o monofiletismo de Microchiroptera, clado que compõe os morcegos que possuem o recurso da ecolocalização. Contudo, as recentes análises baseadas em dados moleculares entram em desacordo com as filogenias tradicionais e sugerem a parafilia de Microchiroptera, onde os morcegos da superfamília Rhinolophoidea (com a exclusão de Nycteridae e inclusão de Rhinopomatidae) pertencente à Yinochiroptera, estariam mais relacionados com os Megachiroptera do que com os outros Microchiroptera, sugerindo para esse novo clado a denominação Yinpterochiroptera, o qual incluiria Pteropodidae, Rhinolophidae, Hipposideridae, Megadermatidae, Craseonycteridae e Rhinopomatidae. As famílias restantes estariam inclusas na infraordem Yangochiroptera (Telling *et al.* 2000; Telling, 2002, Van Den Bussche & Hofer, 2004; Simmons, 2005) (Figura 6).

As variações de interpretação geradas pelas diferentes classes de dados são marcantes. A monofilia da ordem, apoiada tanto por dados morfológicos quanto por dados moleculares, reforça a hipótese de que a capacidade de vôo tenha ocorrido apenas uma vez na classe Mammalia. Em contraste a essa hipótese, os estudos relativos à origem da ecolocalização permanecem em conflito, onde as evidências morfológicas não concordam com as evidências moleculares.

Os dados gerados pelas análises morfológicas sugerem que a ecolocalização evoluiu apenas uma vez dentro da ordem, nos Microchiroptera. Contudo, atualmente evidências moleculares consistentes rejeitam o arranjo anterior em favor das duas novas subordens Yinpterochiroptera, contendo todos os morcegos Pteropodidae que não possuem o recurso da ecolocalização e mais quatro famílias de morcegos insetívoros ecolocalizadores e Yangochiroptera com todas as demais famílias de morcegos que utilizam a ecolocalização. Esta topologia implica em diferentes interpretações para a origem da ecolocalização laringiana em morcegos, a qual teria surgido apenas uma vez no ancestral dos morcegos e foi posteriormente perdida em Pteropodidae ou evoluiu independentemente varias vezes na ordem. A resolução deste conflito é uma condição indispensável para a compreensão da evolução da ecolocalização nos mamíferos. As evidências moleculares apóiam a evolução convergente. Contudo, a falta de congruência dos dados faz com que a história evolutiva da ecolocalização em morcegos continue por ser resolvida (Telling, 2002; Jenes & Telling, 2006).



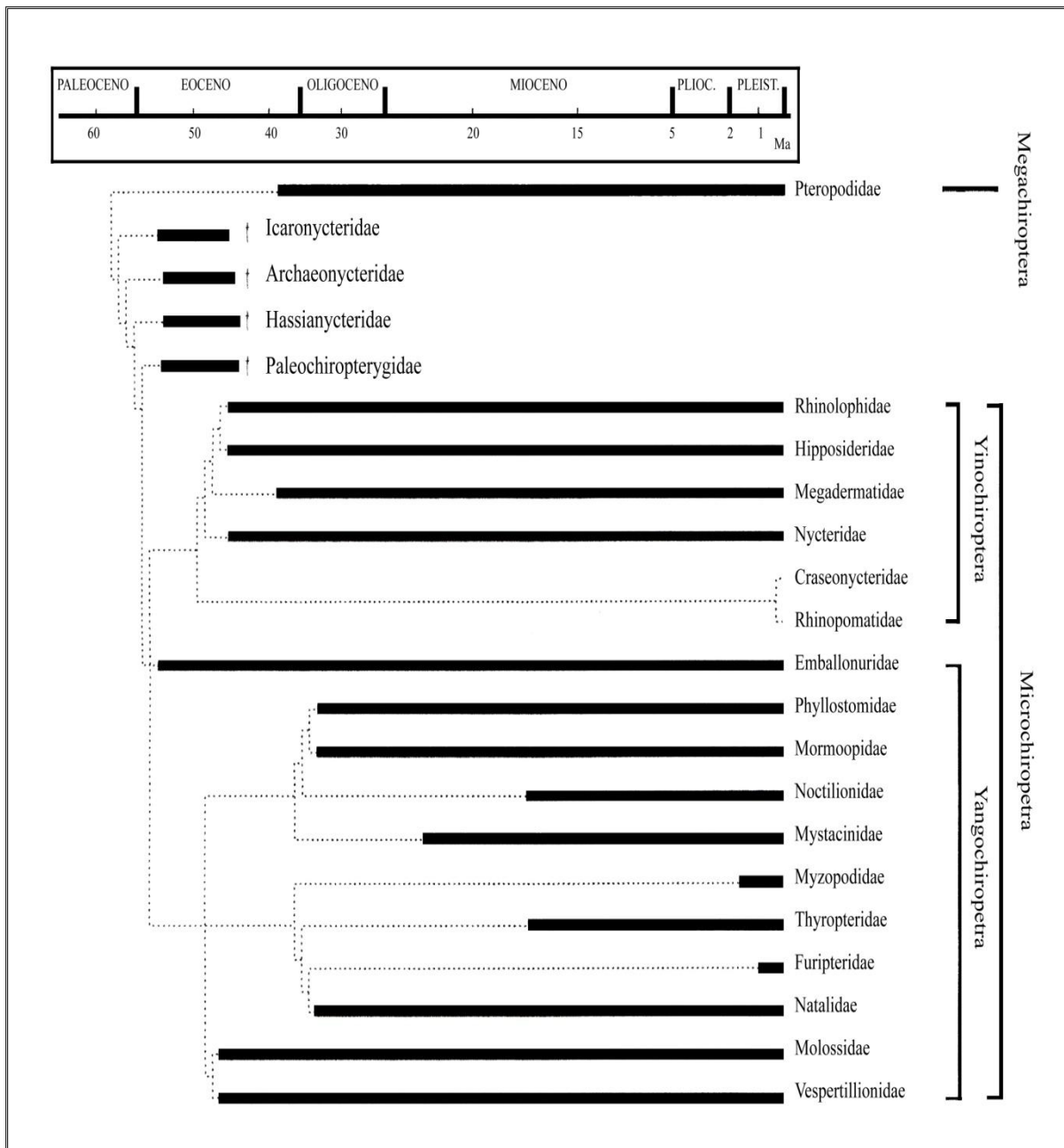


Figura 5: Reconstrução do padrão temporal de diversificação das principais linhagens de morcegos baseada na árvore filogenética de Simmons & Gleisler (1998). Linhas espessas indicam tempo de mudança documentado por registro fóssil. Linhas pontilhadas representam relações filogenéticas presumidas por outros dados. Barras verticais indicam as subordens de Chiroptera e infra-ordens dentro de Microchiroptera. Fonte: Simmons (2005).

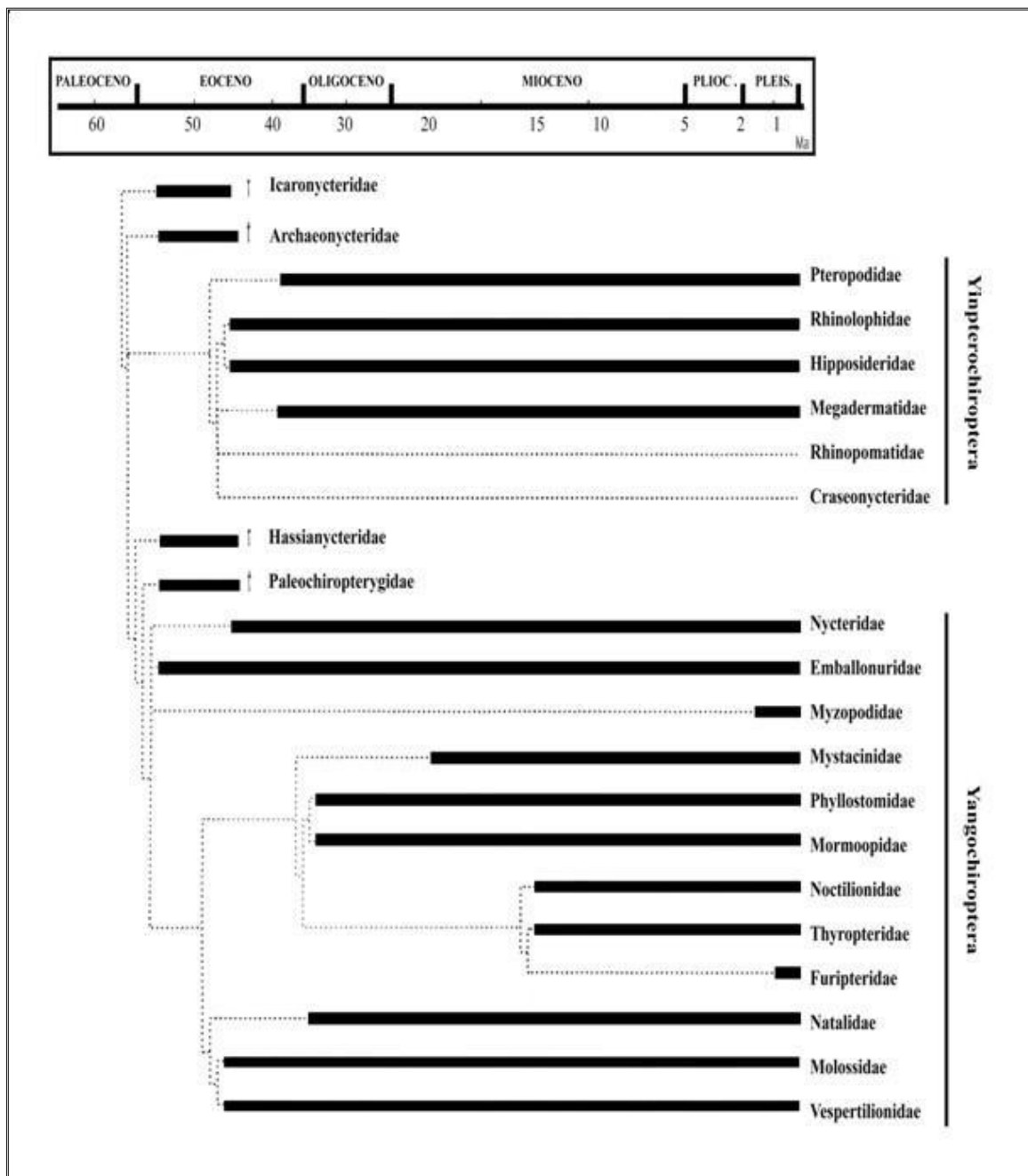


Figura 6: Reconstrução do padrão temporal de diversificação das principais linhagens de morcegos baseada em árvores filogenéticas geradas a partir de dados moleculares. Linhas espessas indicam tempo de mudança documentado por registro fóssil. Linhas pontilhadas representam relações filogenéticas presumidas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

### 1.3 - FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE

Os morcegos desta família apresentam como característica marcante a presença de uma folha nasal membranosa em forma de lança ou folha, na extremidade do focinho. Porém na subfamília Desmodontinae e em uma única espécie da subfamília Stenodermatinae (*Centurio scenex*) a folha nasal é bastante reduzida (Hill & Smith, 1986, Nowak, 1994, 1999). Esta estrutura tem como função auxiliar na ecolocalização, sendo seu desenvolvimento mais marcante nas espécies que capturam insetos durante o voo (Nowak, 1999)

As espécies representantes desta família exibem uma grande variação morfológica, apresentando espécies com o tamanho corpóreo que vai desde o diminuto *Choeroniscus minor*, um nectarívoro que pesa cerca de 9 g, até a espécie reconhecida como o maior morcego das Américas, *Vampyrum spectrum*, cujo peso pode chegar a mais de 200 g. O comprimento corpóreo pode variar de 40 a aproximadamente 133 mm (Nowak, 1994, 1999).

A diversidade de nichos ecológicos a que eles podem estar associados também é marcante, não havendo família, dentro da Ordem Chiroptera, que apresente tamanha diversificação de formas de alimentação quanto os filostomídeos. Os representantes desta família podem ser insetívoros, nectarívoros, polinívoros, frugívoros, carnívoros, piscívoros, onívoros ou hematófagos.

De acordo com Hill & Smith (1986), a família Phyllostomidae é exclusiva do Novo Mundo, apresentando uma distribuição geográfica que se estende desde o sudeste dos Estados Unidos até o nordeste da Argentina. Constitui a terceira maior família dentro da Ordem Chiroptera em número de espécies. Segundo Simmons (2005), a família possui 160 espécies distribuídas em 55 gêneros. Entre as representantes neotropicais, a família Phyllostomidae é a mais numerosa. Segundo Marques- Aguiar (1994), cerca de 50% da

quirópterofauna encontrada na América Latina é constituída por espécies de filostomídeos. Com relação às espécies catalogadas para o Brasil, são encontradas 90 espécies, representantes de 40 gêneros (Reis *et al.*, 2006).

A grande diversidade de características morfológicas que os morcegos filostomídeos apresentam tem causado dificuldades para a sistemática, pois complica a construção de uma história filogenética para a família. Devido a essa problemática, historicamente o grupo vem sofrendo uma série de alterações com relação a sua divisão em subfamílias, sem um consenso entre os diferentes arranjos filogenéticos propostos. O número de subfamílias propostas para Phyllostomidae tem variado de no mínimo duas a no máximo onze, obtidas através de diversas classes de dados. Na maioria das árvores, procura-se agrupar as espécies que possuem hábitos alimentares correlatos, assim como as adaptações morfológicas associadas a esses hábitos (Wetterer *et al.* 2000; Baker *et al.*, 2003).

Os trabalhos iniciais envolveram análises baseadas em dados morfológicos, em sua maioria, a identificação de espécies pertencentes à família Phyllostomidae, em revisão proposta por Miller (1907 *apud* Wetterer *et al.* 2000), para Chiroptera. Este estudo constituiu a base para muitos trabalhos posteriores e a classificação de filostomídeos proposta por esse autor permaneceu estável até meados de 1960. As maiores modificações referem-se à proposta de inclusão dos Sturnirinae como membros da subfamília Stenodermatinae, proposta por Baker (1967), o reconhecimento da família Desmondontidae, como membros da família Phyllostomidae (subfamília Desmondontinae), por Forman *et al.* (1967), e o reconhecimento dos mormoopídeos como uma família distinta de morcegos, onde Smith (1972) eleva a subfamília Chylonicterinae ao *status* de família Mormoopidae, representando um grupo irmão de Phyllostomidae.

Baker *et al.* (1989), investigaram o mais alto nível de classificação taxonômica entre os filostomídeos, produzindo uma árvore consenso que incorporou os dados de diversos trabalhos anteriores, baseados em análises morfológicas, imunológicas e cromossômicas. Redefinindo a família, eles reconheceram 47 gêneros, agrupados em três subfamílias: Desmondontinae, Vampyrinea e Phyllostominae. Eles consideraram os clados *Macrotus* e *Micronycteris* como em uma “posição incerta” (*incertae sedis*). A subfamília Desmondontinae foi a única reconhecida como monofilética.

Posteriormente a esse trabalho, a classificação mais aceita foi à baseada em dados morfológicos proposta por Koopman (1993), reconhecendo oito subfamílias, o maior número de agrupamentos proposto até a data, onde a maior parte delas aparece como táxons monofiléticos. Já para Stenodermatinae foram reconhecidos dois táxons Sturnirini incluindo *Sturnira*, enquanto Stenodermatini abrangeu o restante dos gêneros de Stenodermatini.

Atualmente com a possibilidade de agrupar-se um número maior de dados tanto morfológicos quanto moleculares através de métodos de análise filogenética, novas hipóteses foram sugeridas para a família, onde duas delas são as mais aceitas. A primeira proposta por Wetterer *et al.* (2000), baseada em mais de 150 caracteres morfológicos, dados moleculares, imunológicos e cromossomos sexuais, “árvore da evidência total”, reconhece 7 subfamílias, com 53 gêneros e 141 espécies, onde os resultados das análises de parcimônia entre os dados combinados indicam que todas as subfamílias tradicionalmente propostas para Phyllostomidae são monofiléticas e que os clados são formados a partir das especializações alimentares compartilhadas entre as espécies. Eles propõem assim uma nova classificação que, segundo os autores, reflete melhor as relações evolutivas dentro de Phyllostomidae (Figura 7).

Baker *et al.* (2003), avaliaram as relações filogenéticas entre 48 dos 53 gêneros de Phyllostomidae, através de dados de seqüências do DNA mitocondrial, agrupando-os com estudos do gene nuclear RAG2 (Baker *et al.* 2000), mais as informações obtidas com as filogenias propostas por Wetterer *et al.* (2000) e Jones *et al.* (2002). Dessa forma, uma nova classificação foi proposta, gerando o maior agrupamento de número de táxons já reconhecido para a família, compreendendo 56 gêneros distribuídos em 11 subfamílias. Essa classificação é reconhecida como a mais completa e atualizada (Figura 8).

O trabalho de Baker *et al.* (2003), agrupa a maioria das informações dos trabalhos anteriores, e segundo os autores, a divisão em 11 subfamílias é necessário para melhor expressar as relações filogenéticas entre as espécies de morcegos filostomídeos. Apesar das discordâncias entre as classificações em nível de subfamília, a maioria dos trabalhos apóia a monofilia da família (Wetterer *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2003).

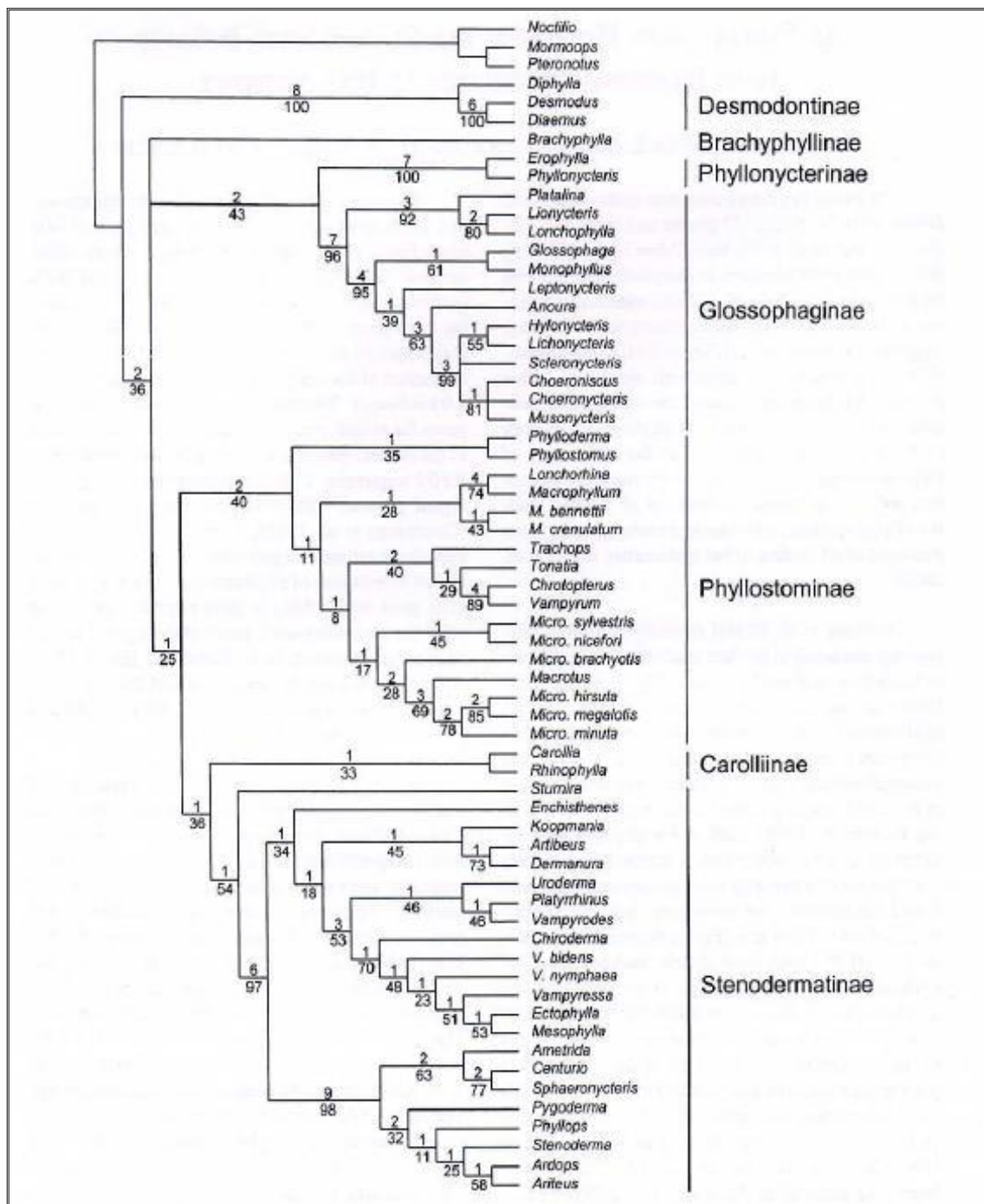


Figura 7: Árvore de evidência total, proposta por Wetterer *et al.* (2000) construída a partir da análise de máxima parcimônia de 150 caracteres, principalmente morfológicos, de 63 táxons. Os números acima das linhas indicam os valores de decaimento de Bremer; números abaixo indicam valores do *bootstrap*.

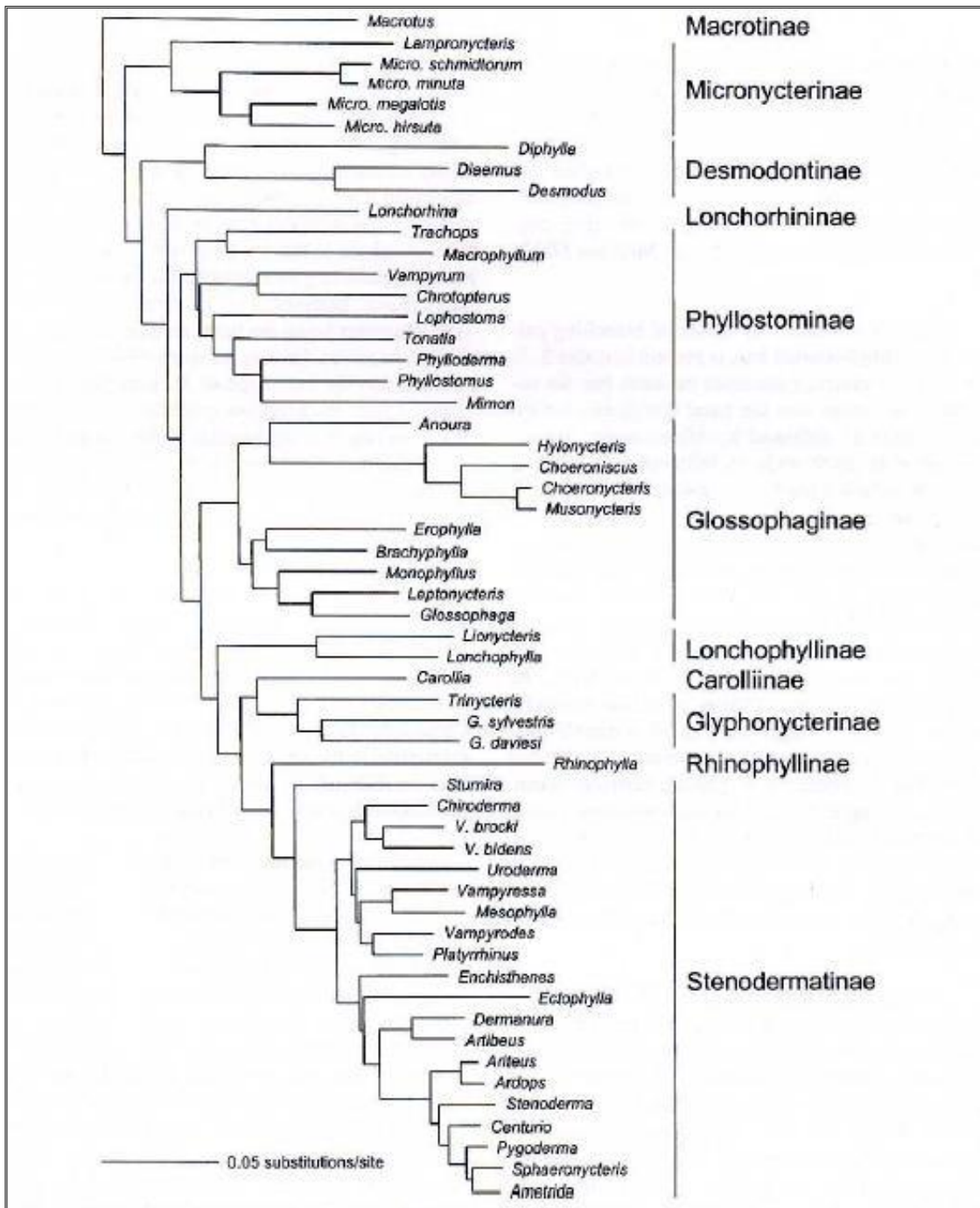


Figura 8: Filogenia mostrando as relações de divergência de seqüências entre os gêneros de Phyllostomidae, apresentado por Baker *et al.* (2003). À direita, classificação definida por esses autores.



### 1.3.1- Subfamília Phyllostominae

A subfamília Phyllostominae constitui um clado diversificado de morcegos, em sua maioria neotropical, com apenas uma das 47 espécies reconhecidas alcançando o sudoeste dos Estados Unidos (Simmons, 2005). Dos 16 gêneros descritos, 15 ocorrem no Brasil, onde há registro para 33 espécies (Reis *et al.*, 2007). Eles possuem uma ampla variação de tamanho, onde a maioria apresenta orelhas bastante desenvolvidas, que auxiliam na ecolocalização e na percepção dos sinais sonoros de suas presas, além de asas largas e curtas, que permitem um voo mais lento (Reid, 1997). A folha nasal é excepcionalmente desenvolvida em alguns gêneros, o que deve refletir na importância da ecolocalização para esses grupos (Zhuang & Muller, 2006). A grande maioria dos filostomíneos é predominantemente carnívora, embora haja espécies que consomem vegetais (Giannini & Kalko, 2005). A maioria preda pequenos vertebrados como rãs, lagartos, roedores e eventualmente outros morcegos. Por se situarem no topo da cadeia alimentar, os táxons carnívoros apresentam densidade populacional mais baixa. Segundo Wilson (1989), os morcegos carnívoros do Novo Mundo são habitantes preferenciais de florestas chuvosas primárias.

As relações filogenéticas entre os gêneros incluídos em Phyllostominae e até mesmo seu posicionamento com relação às outras subfamílias ainda são controversas, onde os diferentes conjuntos de dados levam a diferentes propostas de filogenias para o grupo. Na proposição idealizada por Miller (1907 *apud* Wetterer *et al.* 2000), a subfamília aparece como grupo monofilético; contudo, a partir do trabalho de De La Torre (1961), iniciaram as propostas para o reconhecimento de grupos dentro da subfamília que, através de análises de morfologia dentária, reconhece os filostomíneos como o ramo mais basal da família e dentro de Phyllostominae reconhece três grupos: 1. (*Chrotopterus* e *Vampyrum*), 2. (*Trachops*), 3. (*Macrotus*, *Micronycteris*, *Mimon* e *Phyllostomus*).

Slaughter (1970), também por análises de similaridade dental, identificou dois grandes grupos dentro de Phyllostominae. Segundo o autor, as formas totalmente similares entre *Lonchorhina*, *Mimon*, *Phyllostomus*, *Trachops* e *Vampyrum* formariam um clado, enquanto *Macrotus* representaria outra linhagem. Ele sugere também que *Lonchorhina*, *Mimon*, *Phyllostomus* apresentavam maior semelhança dentária uns com os outros do que com os táxons com linhagens distintas, *Trachops* e *Vampyrum*.

Diferentemente de Slaughter (1970), que une *Lonchorhina* e *Phyllostomus* em um clado, Smith (1976) divide a subfamília e sugere duas linhagens primárias de filostomíneos: o “grupo *Macrotus*” onde *Macrotus* e *Micronycteris* formam são grupos irmãos, assim como *Lonchorhina* e *Macrophyllum*, já para o “grupo *Phyllostomus*” reconheceu três pares de táxons irmãos: *Phylloderma* e *Phyllostomus*, *Mimon* e *Tonatia*, *Chrotopterus* e *Trachops* formando assim uma politomia. Já *Vampyrum* apareceria como táxon irmão deste grupo.

Dados de Honeycutt & Sarich (1987), através de estudos de imunologia, investigaram as relações dentro de Phyllostomidae, onde *Macrotus* foi o gênero mais divergente, mostrando-se associado aos desmodontíneos para formar a linhagem basal para a família. Eles reconhecem a subfamília Phyllostominae como um grupo parafilético, contudo as linhagens indicadas pela imunologia não são totalmente coerentes com as reconhecidas por diversos autores (Slaughter, 1970; Smith, 1976; Walton & Walton, 1968). Eles reconhecem *Chrotopterus* associado com grupo *Micronycteris-Vampyrum* e *Lonchorhina*, *Macrophyllum* e *Mimon* associados ao grupo *Phyllostomus -Tonatia*.

Na filogenia proposta por Baker *et al* (1989), já citada neste trabalho, gerada através de dados de morfologia, imunologia e cromossomos, com relação a subfamília Phyllostominae (*sensu* Honeycutt & Sarich, 1987) ele retira os gêneros *Trachops*, *Chrotopterus* e *Vampyrum* elevando-os a nível de subfamília Vampyrinae, representando um clado monofilético. Os outros táxons permanecem na subfamília Phyllostominae como

tribo Phyllostomini. Baseado em dados morfológicos, Koopman (1993) afirma a monofilia da subfamília Phyllostominae. Essa proposta foi contestada por muitos autores (Slaughter, 1970, Smith 1972, 1976, Honeycutt & Sarich 1987, Patton & Baker, 1978).

Wetterer *et al.* (2000), testaram a monofilia dentro da famílias de Phyllostomidae. Phyllostominae (*sensu* Wetterer *et al.*, 2000) seria um agrupamento monofilético, onde são reconhecidos táxons a nível tribal, havendo assim quatro tribos: Phyllostomini, Lonchorhinini, Vampyrini e Micronycterini. Segundo os autores, o clado Vampyrini, composto pelos gêneros *Trachops*, *Chrotopterus*, *Vampyrum* e *Tonatia*, estão reunidos predominantemente pelo caráter carnivoría, que seria a sinapomorfia que une os quatro gêneros. *Tonatia*, porém, se alimenta de insetos, sendo essa condição o caráter primitivo ou uma reversão.

Baker *et al.* (2003), questionam o clado, pois os valores de *bootstrap* que sustentam os ramos são muito baixos (menos de 50%). Estes autores sugerem o monofiletismo da subfamília Phyllostominae, que seria constituída de 9 gêneros com 20 espécies (Simmons, 2005), organizados em três tribos: Phyllostomini, composta por *Phyllostomus*, *Tonatia*, *Mimon*, *Phylloderma*, *Lophostoma*; Macrophyllini contendo dois gêneros: *Trachops* e *Macrophyllum*, sendo esta monofilia sustentada pelas análises do gene nuclear RAG2 (Baker *et al.*, 2000) e Vampyrini, composta por *Chrotopterus* e *Vampyrum*, sendo este clado sustentado tanto pelos dados tanto de Wetterer *et al.* (2000) quanto de Honeycutt & Sarich (1987), que demonstram que a distância imunológica que os separa é a menor distância intergenérica vista entre morcegos.

Outro debate instigante acerca do relacionamento filogenético dentro da subfamília Phyllostominae, diz respeito aos gêneros *Tonatia* e *Lophostoma*. Lee *et al.* (2002), baseados em análise de seqüências do DNA mitocondrial, sugerem que as 9 espécies que formavam o gênero *Tonatia* não corresponderiam a um agrupamento monofilético. Eles recomendaram uma revisão taxonômica para o gênero, propondo a mudança de todas as

espécies do gênero *Tonatia* para *Lophostoma*, exceto *T. bidens* e *T. saurophila*. Neste estudo eles avaliaram o relacionamento entre todos os representantes da subfamília Phyllostominae e, em seu arranjo, observaram duas linhagens bem definidas, uma contendo *Trachops*, *Macrophyllum*, *T. bidens* e *T. saurophila* e a outra *Phylloderma*, *Phyllostomus*, *Mimon* e as outras sete espécies, agora pertencentes ao gênero *Lophostoma*. Os resultados de Lee *et al.* (2002), apóiam o arranjo sugerido por Baker *et al.* (2003).

Dados de Porter *et al.* (2003), baseados em análises de seqüências DNA mitocondrial e do gene nuclear RAG2, reafirmam a separação e o reconhecimento de *Lophostoma* como um gênero válido. Com relação ao gênero *Tonatia*, seus dados apóiam fortemente os de Avilla *et al.* (1998) e Williams *et al.* (1995), que sugerem o reconhecimento de *T. bidens* como uma espécie distinta de *T. saurophila* pois, segundo estes autores, as duas espécies são geneticamente distantes, com uma média de divergência das seqüências de DNA mitocondrial e proteína RAG2 que se aproximam ou ultrapassam o grau de divergência genética encontrada entre alguns gêneros.

Hoffmann *et al.* (2008), através de análises moleculares, realizaram uma estimativa do tempo de divergência entre as três tribos da subfamília Phyllostominae (*sensu* Baker *et al.*, 2003). Seus resultados demonstram que o tempo molecular de divergência entre as tribos e gêneros se estendeu do início ao médio Mioceno, sugerindo também que as tribos Macrophyllini e Phyllostomini formavam um grupo irmão, com Vampyrini como a primeira divergência dentro da subfamília (Figura 9).

Assim, os dados morfológicos, imunológicos, moleculares e cariotípicos, embora nem sempre congruentes, buscam interpretar a evolução dentro de Phyllostominae, que é dificultada segundo Lee *et al.* (2002), pela diversificação que avançou rapidamente entre os membros desta família, produzindo um conjunto de morcegos no qual algumas espécies mantêm morfotipos primitivos, enquanto outros tem caracteres altamente derivados.

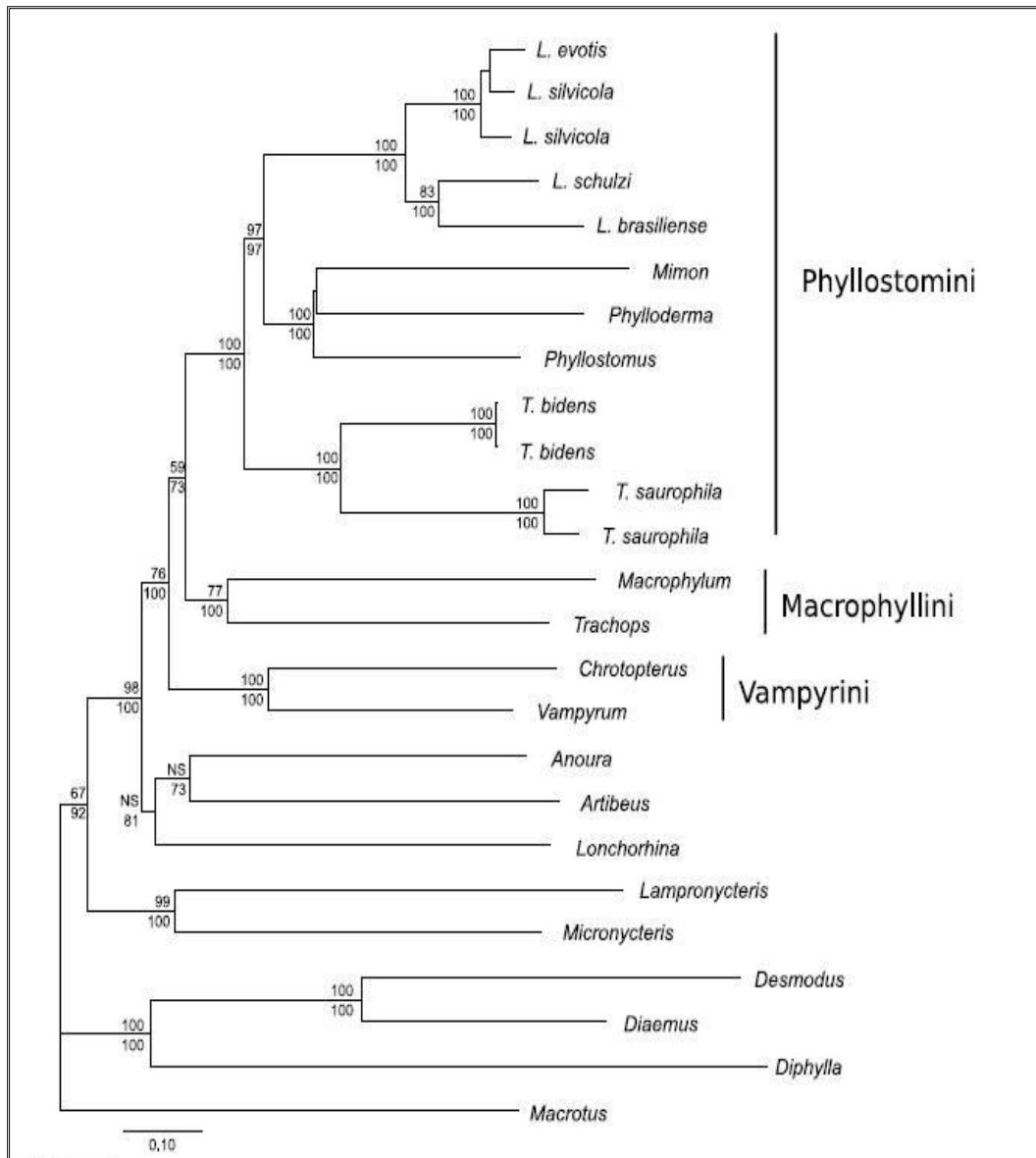


Figura 9: Filogenia proposta por Hoffmann *et al.* (2008) baseada em máxima parcimônia, descrevendo as relações entre os gêneros de morcegos da subfamília Phyllostominae. Os números acima das linhas indicam os valores de *bootstrap*, os números abaixo indicam valores de probabilidade Bayesiana. As barras verticais indicam a relação a nível tribal dos gêneros na subfamília Phyllostominae.

A espécie *Chrotopterus auritus* (anexo 1- figura 1a) representa um dos maiores morcegos do Novo Mundo, sendo superado somente por *Vampyrum spectrum*, podendo ser encontrado do México até as Guianas, Peru, Bolívia, Brasil e norte da Argentina (Simmons, 2005). Ela é facilmente reconhecida pelo tamanho grande, orelhas desenvolvidas, ovais e separadas e a pelagem felpuda, cinza no dorso e mais clara no ventre (Reis *et al.*, 2007). Sua dieta inclui pequenos vertebrados, onde pequenos mamíferos como roedores, marsupiais e outros morcegos são as presas mais consumidas (Bonato *et al.* 2004). Podem ocorrer em todos os biomas brasileiros, tendo sido encontrado principalmente as áreas florestadas de vegetação primária (Pedro *et al.*, 2001).

*Trachops cirrhosus* (anexo 1- figura 1b), ocorre desde o México às Guianas, Brasil, Bolívia, Equador e Trinidad (Simmons, 2005). Morcego de porte médio, pelagem longa e felpuda, pardo-ferrugínea no dorso, mais clara nas partes inferiores, possuindo numerosas verrugas nos lábios. A folha nasal apresenta bordas serrilhadas e as orelhas são grandes e arredondadas (Nowak, 1994). A cauda é curta e projeta-se no dorso da membrana interfemural, que é bem desenvolvida (Reis *et al.*, 2007). A espécie é amplamente conhecida por seu hábito de predação de pequenos anfíbios, sendo capazes inclusive de identificar espécies de sapos pela vocalização que emitem e evitar as mais venenosas (Cramer *et al.* 2001), mas também consomem pequenos lagartos, aves, e pequenos mamíferos (Peracchi *et al.* 1982). Ocorrem em todos os biomas brasileiros, sendo frequentemente encontrados nas proximidades de rios, brejos e lagoas, o que pode ter relação com seus hábitos de predação de anfíbios (LaVal & Rodríguez-H, 2003).

*Vampyrum spectrum* (anexo 1- figura 1c) ocorre do México ao Equador, Peru, Bolívia, Brasil, Guianas e Trinidad (Simmons, 2005). Representa a maior espécie já encontrada no Novo Mundo, com envergadura variando de 70 a 90 cm, havendo registro de alguns espécimes alcançando cerca de 1 m (Nowak, 1994). A espécie é reconhecida pelo

tamanho grande, e por apresentar orelhas grandes, longas e arredondadas, focinho robusto, longo e estreito e ausência de cauda. A característica da folha nasal em formato de taça é somente compartilhada com *C. auritus* (Reid, 1997). Predam pássaros, roedores, morcegos e insetos (Bonato & Facure, 2000). No Brasil, *V. spectrum* ocorre nos biomas amazônicos e no Pantanal (Marinho-Filho & Sazima, 1998).

#### 1.4 - CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO NA FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE

Tradicionalmente a descrição de espécies e as relações filogenéticas entre elas têm sido realizadas a partir de estudos taxonômicos e sistemáticos baseados nas características morfológicas e biométricas, avaliadas basicamente no crânio e dentição. Contudo, pelo fato dos morcegos estarem entre os grupos de mamíferos mais antigos e divergentes, existe dificuldade de identificar as relações de parentesco entre eles, baseadas apenas em caracteres intensamente envolvidos no processo adaptativo, sendo necessária a análise de outros aspectos relacionados ao processo evolutivo (Varella-Garcia & Taddei, 1989). Dentre estes aspectos, a citogenética animal é um importante recurso para se estudar mudanças cromossômicas que ocorrem durante o curso da evolução e diversificação dos táxons. É possível realizar a caracterização cromossômica das espécies, análise cariotípica comparativa detalhada entre espécies relacionadas através de técnicas de bandeamento, contribuindo para o estabelecimento de hipóteses sobre os rearranjos cromossômicos que teriam levado às diferenças cariotípicas observadas entre elas e também a identificação dos padrões de evolução cromossômica ocorridos na ordem (Dobigny & Yang, 2008).

Através de análise cariotípica, Baker & Bickham (1980) verificaram que a evolução cromossômica nas espécies de morcegos não ocorre de maneira uniforme. Assim, algumas linhagens apresentam mudanças rápidas e consideráveis, apresentando cariótipos derivados por extensos rearranjos cromossômicos, tornando praticamente impossível, por

bandeamento G, o reconhecimento dos eventos que levaram a diferenciação cariotípica entre eles, enquanto outras linhagens apresentam uma taxa mais lenta de evolução cariotípica, onde as espécies mais relacionadas dentro dos táxons, em sua maioria apresentam cariótipos com o mesmo número diplóide, diferindo por poucos rearranjos e com o padrão de bandeamento G similares, o que eles chamaram de conservacionismo cromossômico.

Os morcegos da família Phyllostomidae apresentam números diplóides ( $2n$ ) que variam de  $2n = 14$  em *Vampyressa melissa* à  $2n = 46$  em *Macrotus waterhousii*, com números de braços cromossômicos (número fundamental = NF) variando de 20 a 68 (Baker, 1979), onde os valores mais comumente encontrados são  $2n = 32$  e  $NF = 56$ , apresentados por espécies de várias subfamílias. As variações cromossômicas observadas entre a maior parte dos representantes da família Phyllostomidae não são extensas, onde a provável tendência evolutiva seria a redução do número diplóide por eventos de fusão cêntrica, com a retenção do grupo de ligação. Por esse motivo, a homeologia de muitos segmentos cromossômicos tem sido constatada em espécies pertencentes a diferentes subfamílias, como por exemplo, Phyllostominae (Rodrigues *et al.*, 2000; Pieczarka *et al.*, 2005), Glossophaginae (Haiduk & Baker, 1982; Ribeiro *et al.*, 2003) e Stenodermatinae (Souza & Araújo, 1990; Silva *et al.*, 2005).

Apesar do conservacionismo cromossômico apresentado em alguns gêneros, como *Artibeus* (Stenodermatinae), onde a maioria das espécies apresenta o mesmo número diplóide ( $2n = 30/31$ ) com praticamente nenhuma variação no padrão de bandeamento G (Souza & Araújo, 1990), outros gêneros demonstram uma ampla variabilidade intra e interespecífica, como em *Uroderma* e *Vampyressa*. Na espécie *U. bilobatum* já foram encontrados três citótipos cromossômicos:  $2n = 38, 42$  e  $44$ ; já para *V. pusilla* foram encontrados citótipos com número diplóide variando de 18 a 24, devido à ocorrência de



diversos rearranjos (Baker, 1979; Baker & Bickham, 1980; Baker *et al.*, 1982). Outros gêneros que apresentam uma alta taxa de diversificação cromossômica são *Tonatia* ( $2N = 16$ ) e algumas espécies do gênero *Lophostoma* ( $2N = 26, 28, 30$  e  $34$ ), (Patton & Bsker, 1978; Baker, 1979; Baker & Bass, 1979, Baker & Bickham, 1980; Arnold *et al.* 1983).

Com relação ao sistema de determinação sexual, o sistema simples (XX/XY) assim como é o mais comum em mamíferos em geral, é o mais freqüentemente encontrado em morcegos. Contudo, com relação à família Phyllostomidae, dois sistemas adicionais foram encontrados, ambos originando-se de eventos de translocação envolvendo autossomos e alossomos. No sistema múltiplo XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> um cromossomo do complemento autossômico foi translocado para o cromossomo X. Assim, nos machos o homólogo do cromossomo translocado para o X permanece livre, denominado Y<sub>2</sub>. Essa forma de determinação sexual foi descrita nas subfamílias Carollinae, Glossophaginae e Stenodermatinae, apresentando nesta última um maior número de espécies. O sistema de determinação do sexo Neo-XY é considerado como derivado do sistema múltiplo, ocorrendo nos morcegos da subfamília Stenodermatinae, onde após a formação da condição XX: XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> houve uma translocação subsequente (Y<sub>1</sub>.Y<sub>2</sub>), que deu origem aos cromossomos X e Y compostos (Tucker, 1986, Tucker & Bickham, 1986).

Os estudos citogenéticos iniciais na família Phyllostomidae, a partir de 1960, eram baseados na descrição dos cariótipos por análise convencional, contribuindo para gerar informações sobre a taxonomia e filogenia dos membros dessa família. Isso permitiu que fossem analisados os números diplóides ( $2n$ ) e fundamentais (NF), a morfologia cromossômica e o sistema de determinação sexual em diversas espécies (Baker, 1967; Yonenaga *et al.*, 1969; Baker, 1970). O início da década de 70 representa o advento das técnicas Q, G e R que geram uma diferenciação longitudinal dos cromossomos e a verificação dos rearranjos, contribuindo significativamente para o entendimento dos

mecanismos envolvidos na evolução cariotípica da família (Patton & Baker, 1978; Baker & Bickahm, 1980). As técnicas de bandeamento C (Summer, 1972) e coloração com nitrato de prata (Howell & Black, 1980) também são importantes na análise de regiões cromossômicas específicas, respectivamente, heterocromatina constitutiva (HC) e regiões organizadoras de nucléolos (NORs).

Um dos primeiros trabalhos realizados para o entendimento das relações entre os Phyllostomidae e outras famílias de morcegos através de bandeamento, foi o de Patton & Baker (1978) que, por análise de bandeamento G, propôs o cariótipo de *Macrotus waterhousii* ( $2n = 46$ ,  $NF = 60$ ) como mais próximo do ancestral para a família Phyllostomidae. Eles inferiram também sobre o relacionamento com outras famílias de morcegos, onde Mormoopidae e Noctilionidae compartilham cinco fusões Robertsonianas, estando mais proximamente relacionados entre si do que com Phyllostomidae.

Ribeiro *et al.* (2003), analisando citogeneticamente quatro espécies da subfamília Glossophaginae através de bandeamento G, identificaram poucas homeologias entre os cariótipos de *Glossophaga soricina*, *Lonchophylla thomasi* e *Lionycteris spurrelli*, e nenhuma entre estas e *Choeroniscus minor*. Estes dados apóiam o conservadorismo do cariótipo de *Glossophaga* como sugerido por Baker & Bass (1979) e a alta taxa de rearranjos presente nas demais espécies e corrobora a hipótese de Haiduk & Baker (1982), que consideram a existência de dois grupos entre os morcegos nectarívoros, um sendo cromossomicamente conservado e outro apresentando vários caracteres cromossômicos derivados.

Silva *et al.* (2005), realizaram um estudo comparativo entre os cariótipos de duas espécies de morcegos do gênero *Uroderma*: *U. bilobatum* (cariótipo  $2n = 42$ ) e *U. magnirostrum* ( $2n = 36$ ), pertencentes a subfamília Stenodermatinae, encontrando várias homeologias cromossômicas entre eles e sugerindo que o cariótipo de *U. magnirostrum*

representaria o mais próximo da condição ancestral para o gênero, por apresentar um maior número de caracteres cromossômicos compartilhados com o gênero *Artibeus*.

Dados de Varella-Garcia *et al.* (1989) e Santos *et al.* (2001), através de bandeamento G, demonstraram que boa parte dos cromossomos dos desmodontíneos são compartilhados entre si. Baker *et al.* (1988), analisando o cariótipo das três espécies de hematófagos, além de considerarem as homeologias entre elas, sugerem que o cariótipo de *Diaemus yougi*, dentre os três, é o mais próximo do cariótipo primitivo para a família Phyllostomidae.

Com relação à visualização da heterocromatina constitutiva (HC), o bandeamento C é uma das técnicas mais utilizadas para evidenciar a HC em diferentes organismos eucariotos (Summer, 1972). Os resultados obtidos através desta técnica em morcegos da família Phyllostomidae demonstraram que a HC pode restringir-se às regiões centroméricas ou ocorrer também em regiões teloméricas e intersticiais, apresentando variações em relação ao tamanho do bloco heterocromático. Os cromossomos X e Y são quase totalmente heterocromáticos, com algumas exceções (Varella-Garcia *et al.* 1989; Varella-Garcia & Taddei 1989; Santos *et al.*, 2001).

Com relação à distribuição da HC nas análises das espécies do gênero *Uroderma* através do bandeamento C, Silva *et al.* (2005), observaram em *U. magnirostrum* a HC localizada na região pericentromérica de todos os autossomos e na porção distal do braço curto dos pares submetacêntricos (5 ou 14). *U. bilobatum* apresentou HC pericentromérica em todos os autossomos e na região distal do braço curto de dois pares submetacêntrico (1 e 2). Os cromossomos sexuais, nas duas espécies apresentaram heterocromatina centromérica e terminal no braço curto do cromossomo X, enquanto o Y apresentou bloco heterocromático no braço longo.

Um padrão exclusivamente pericentromérico de distribuição da HC foi verificado em *Phyllostomus hastatus*, *P. discolor*, *P. elongatus* (Varella-Garcia *et al.* 1989; Santos & Sousa, 1998; Rodrigues *et al.* 2000), *Anoura caudifer*, *Chiroderma villosum* e *C. doriae* (Varella-Garcia *et al.*, 1989).

As Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) encontram-se em áreas cromossômicas específicas, geralmente aparecendo como estruturas evidentes nas constrições secundárias dos cromossomos. A localização cromossômica das NORs é comumente estudada usando nitrato de prata (Ag-NOR), onde a coloração detecta somente as NORs que estavam ativas na interfase anterior (Miller *et al.*, 1976).

Em morcegos, as NORs podem ter localização em um único par de cromossomos, presente em regiões teloméricas ou intersticiais, ou em vários pares, sendo geralmente encontradas nos autossomos (Volleth, 1987; Varella-Garcia & Taddei 1989; Sousa & Araújo, 1990). A localização das NORs em cromossomos sexuais foi descrita para o cariótipo de *Carollia perspicilata*, no cromossomo X e *C. castanea*, nos cromossomos X e Y (Hsu *et al.*, 1975; Morielle & Varella-Garcia, 1988). A ocorrência de NORs múltiplas tem sido observada nos gêneros *Choeroniscus* (Baker *et al.*, 1992; Neves *et al.*, 2001) e *Uroderma* (Silva *et al.*, 2005) assim como nas espécies *Lonchophylla thomasi* (Ribeiro *et al.*, 2003) e *Chiroderma doriae* (Morielle & Varella-Garcia, 1988).

#### **1.4.1 - Subfamília Phyllostominae (*sensu* Baker *et al.*, 2003)**

Segundo Baker *et al.* (2003), esta subfamília encontra-se dividida em três tribos: Phyllostomini, Macrophyllini e Vampyrini. Esta subfamília tem sido investigada citogeneticamente por quase todas as técnicas mencionadas anteriormente.

Representante da tribo Phyllostomini, o gênero *Phyllostomus* é composto por quatro espécies: *P. discolor*, *P. hastatus*, *P. elongatus* e *P. latifolious*, sendo caracterizado pelo conservacionismo cariotípico, onde quase todas as espécies possuem  $2n = 32$  e  $NF = 58$ , exceto *P. discolor* por apresentar  $NF = 60$  (Baker, 1979). Tendo em vista esta variação, Rodrigues *et al.* (2000), analisaram as relações cromossômicas entre *P. hastatus* e *P. discolor*, propondo uma filogenia cromossômica baseada na evolução do par 15. Segundo seus dados, *P. discolor* encontra-se na base do cladograma por compartilhar com *Mimom crenulatum*, representante do grupo externo, a forma metacêntrica do par 15. As demais espécies do gênero mais *Phylloderma stenops* formariam outro clado por possuírem a forma acrocêntrica do par 15.

Rodrigues *et al.* (2003) realizaram uma análise cariotípica comparativa entre *Phyllostomus hastatus* e *Artibeus lituratus* (Stenodermatinae), a primeira espécie possuindo a condição primitiva (XY) e a segunda apresentando uma condição derivada (sistema  $XY_1Y_2$ ) para o sistema cromossômico de determinação do sexo. O cromossomo X de *P. hastatus* em posição invertida apresentou homeologia ao braço longo de *A. lituratus*, propondo que o sistema  $XY_1Y_2$  de *A. lituratus* surgiu de um evento de fusão em *tandem* envolvendo o cromossomo X de dois braços, original em Stenodermatinae, com o autossomo acrocêntrico homólogo ao  $Y_2$ . Assim, segundo esses autores, se o ponto inicial da evolução dos cromossomos sexuais de filostomídeos for um cromossomo de dois braços, essa hipótese é mais parcimoniosa, pois requer somente um rearranjo da condição ancestral para a atual, enquanto a hipótese de fusão cêntrica (Tucker, 1986) requer um passo evolutivo a mais, necessário para produzir o cromossomo X acrocêntrico intermediário.

A tribo Macrophyllini é constituída pelos gêneros *Macrophyllum* e *Trachops*, ambos monotípicos. Até o momento, apenas estudos de coloração convencional foram

descritos para a espécie *Macrophyllum macrophyllum*, apresentando  $2n = 30$  e  $NF = 56$  (Baker *et al.*, 1982). Em *Trachops cirrhosus*, além destes dados fornecidos através da coloração convencional,  $2n = 30$  e  $NF = 56$  com todos os autossomos de dois braços, o cromossomo X subtelocêntrico e o Y acrocêntrico (Baker & Hsu, 1970; Baker, 1979), as NORs nesta espécie foram estudadas por coloração com nitrato de prata, sendo encontrado um único par localizado no braço curto do cromossomo 11 (Santos *et al.*, 2002).

Barros *et al.* (2009), realizaram uma análise comparativa entre *Lonchorhina aurita* ( $2n = 32$ ) e *Trachops cirrhosus* ( $2n = 30$ ), através do bandeamento G, C, NOR, fluorocromos DAPI e CMA<sub>3</sub> identificando homeologias cromossômicas entre as duas espécies, presentes nos cromossomos 9, 10, 11, 15 de *L. aurita* que correspondem aos pares 13, 12, 19, 14 de *T. cirrhosus*, respectivamente. O bandeamento C revelou a HC nas regiões pericentroméricas de todos os autossomos e no cromossomo X, já o Y era quase totalmente heterocromático nas duas espécies. Com relação à morfologia dos cromossomos sexuais, os mesmos estavam de acordo com a literatura, com exceção do cromossomo X acrocêntrico de *T. cirrosus* em suas amostras provenientes de Pernambuco, diferindo da descrição subtelocêntrica em indivíduos do México e Trinidad e Tobago (Baker, 1967; Hsu *et al.* 1968, Baker e Hsu, 1970). Contudo, entre alguns cromossomos, não foi possível detectar homeologias devido o padrão de bandas distinto, sendo provável que a maioria destes braços tenha sofrido inversões antes da translocação, dificultando a identificação dos rearranjos somente pelas técnicas de coloração convencional.

Com relação à tribo Vampyrini, representada pelos gêneros monotípicos *Chropterus* e *Vampyrum*, observa-se que *Chropterus auritus* apresenta  $2n = 28$  e  $NF = 52$  (Toledo, 1973). A caracterização cromossômica, através de bandeamento G, C e NOR foi realizadas para *C. auritus*, comparando seu cariótipo com o de *M. waterhoussi* (Patton & Baker, 1978), sendo detectadas homeologias para praticamente todo o complemento

autossômico entre estas espécies. Segundo os autores, *C. auritus* compartilha sete pares autossômicos com *M. waterhousii*: 1/2, 4/5, 6/7, 10/11, 15/16, 19/20 e 23/24. Os pares 1, 2 e 3 de *C. auritus* são resultado de fusões Robertsonianas entre acrocêntricos de *M. waterhousii* (8/9, 18/3 e 17/12, respectivamente). As pequenas variações estariam no par 10, resultado de fusões entre vários cromossomos, e no par 7 (4/5 *M. waterhousii*) que aparece invertido em outras espécies de filostomíneos. O par da NOR é correspondente ao braço longo do cromossomo 3 (Morielle-Versute *et al.*, 1992).

Dados cromossômicos para *Vampyrum spectrum* foram descritos apenas baseados na coloração convencional, para animais coletados em Trinidad e Tobago, possuindo  $2n = 30$  e  $NF = 56$ , com todos os autossomos de dois braços, o cromossomo X subtelocêntrico e o Y acrocêntrico (Baker & Hsu, 1970; Baker, 1973; Baker, 1979).

### 1.5 - HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

A hibridização *in situ* consiste basicamente no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA com uma seqüência de nucleotídeos complementar, visando verificar se a célula possui essa seqüência e qual a sua exata localização. Para visualização do segmento de DNA ou RNA hibridizado é necessário que ele seja marcado com alguma molécula de fácil identificação, funcionando como uma sonda para detectar a seqüência complementar de nucleotídeos, chamada seqüência-alvo (Guerra, 2004).

A hibridização tem sido utilizada para localizar as mais diversas seqüências de nucleotídeos, onde sondas cromossomo-específico são construídas a partir de segmentos de DNA ou RNA, quimicamente modificados, que podem ser um único par cromossômico ou determinadas regiões, tais como o centrômero e telômeros ou um *locus* específico (Buhler, 1989).

As sondas de DNA podem ser obtidas a partir de técnicas como microdissecção e citometria de fluxo. Esta última permite separar e purificar cromossomos segundo a sua composição de pares de bases, após serem corados com um ou mais corantes fluorescentes (Rocha, 2002), havendo vários tipos de sondas: teloméricas, centroméricas, rDNA como também de regiões, braços e cromossomos inteiros, sendo utilizadas na detecção de rearranjos intracromossômicos, que poderão ser usados para a reconstrução filogenética e mapeamentos comparativos.

Após a obtenção da sonda, esta precisa ser amplificada e fragmentada em segmentos, para facilitar a hibridização. Para a amplificação é utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase com um *primer* degenerado (DOP-PCR). Este *primer* apresenta uma seqüência reconhecida pela enzima de restrição *Xho*I, produzindo fragmentos de 200pb a 2kb.

A marcação da sonda pode ser de maneira direta e indireta. Na marcação indireta a sonda é ligada covalentemente com um antígeno (por exemplo, digoxigenina) ou biotina, que posteriormente é reconhecido por um anticorpo (anti-digoxigenina) ou avidina (ou estreptoavidina), ligado a um fluorocromo. No método direto o fluorocromo é ligado diretamente à desoxiuridina trifosfato através de um braço espaçador.

Através da FISH tem-se gerado um maior entendimento quanto à variabilidade e atividade dos genes ribossomais, devido o fato da coloração Ag-NOR detectar somente as NORs que estavam ativas na interfase anterior, enquanto o emprego das sondas para seqüências 18S marcam tanto NORs ativas quanto inativas, já que não dependem da presença do produto da transcrição, podendo localizar todas as seqüências repetidas que estejam no genoma (Porter, 1994).

A técnica de FISH também tem permitido analisar a distribuição das seqüências teloméricas (TTAGG)<sub>n</sub> nos cromossomos. Esta seqüência repetitiva tem sido observada



principalmente nas regiões distais, sendo a presença das seqüências em sítios não - distais (regiões intersticiais ou próximos ao centrômero) também sido observada em uma variedade de espécies de vertebrados (Lear, 2001). A presença das seqüências em sítios não - distais, podem estar relacionada a resquícios de telômeros verdadeiros resultantes de rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a evolução cariotípica (Lee *et al.*, 1993; Fagundes *et al.*, 1997; Pellegrino *et al.*, 1999) ou podem ter sido geradas através de mecanismos como crossing-over desigual, elementos de transposição, mutação ou amplificação de seqüências endógenas (TTAGGG)<sub>n</sub> (Wiley *et al.* 1992; Vermeesch *et al.* 1996; Silva & Silva 1998, Pagnozzi *et al.*, 2000). Meyne *et al.* (1990), sugerem que as espécies primitivas de um determinado grupo tendem a ter somente seqüências teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> nas regiões distais, enquanto que as altamente evoluídas podem exibir a seqüências em sítios não – distais. É importante notar que em alguns mamíferos os locais de fusão de cromossomos ancestrais podem não mostrar vestígios detectáveis de seqüências (TTAGGG)<sub>n</sub> (Nanda *et al.*, 1995; Garagna *et al.*, 1995; Nanda *et al.*, 2002).

## 2 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altringham, JD (1996). **Bats. Biology and Behaviour**. New York: Oxford University Press. 255p.
- Avilla, L S, Salles, LO e Simmons, NB (1998). **A new species of *Tonatia* from the Brazilian savannas and its phylogenetic interrelationships (Chiroptera, Phyllostominae)**. *Bat Research News* 39:127.
- Arnold, ML, Baker RJ e Honeycutt RL (1983). **Genic differentiation and phylogenetic relationship within two New World bat genera**. *Biochemical Systematics and Ecology* 11:295–303.
- Baker, RJ (1967). **Karyotypes of bats of the family Phyllostomidae and their taxonomic implications**. *Southwestern Nat* 12: 407-428.
- Baker, RJ & Hsu, TC (1970). **Further studies on the sex- chromosome systems of the American leaf-nosed bats (Chiroptera, Phyllostomidae)**. *Cytogenet* 9: 131-138.
- Baker, RJ (1970). **Karyotypic trends in Bats** *In*: Wimsatt, W. A. (Ed.) *Biology of Bats*. Academic Press, NY. v.1: 65-96.
- Baker, RJ e Bass, RA (1979). **Evolutionary relationship of the Brachyphyllinae to Glossophaginae genera *Glossophaga* and *Monophyllus***. *Journal of Mammalogy* 60: 364-372.
- Baker, RJ (1979) *Karyology* *In*: R. J. Baker, J. K. Jones, Jr., and D. C. Carter (Eds), **Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae**, p. III. *Spec. Publ. Mus. Texas Tech Univ* 16: 1107–155.
- Baker, RJ e Bickham JW (1980). **Karyotypic Evolution in bats: Evidence of extensive and conservative chromosomal evolution in closely related taxa**. *Systematic Zoology*, 29, 239-253.
- Baker, RJ, Haiduk, MW, Robbins, LK, Cadena, A e Koop, BF (1982). **Chromosomal studies of south American bats and their systematic implications**. *In*: Mares MA and Genoways HH. (Eds). *Mammalian biology in South America*. Special Publications Series-Pymatuning Laboratory, v.1: 3003-327.
- Baker, RJ, Hood, CS e Honeycutt, RL (1989). **Phylogenetic relationships and classification of the higher categories of the New World bat family Phyllostomidae**. *Systematic Zoology* 38: 228–238.
- Baker, RJ, Maltibie, M, Owen, JG, Hamilton, MJ e Bradley, RD (1992). **Reduced number of ribosomal sites in bats: evidence for a mechanism to contain genome size**. *Journal of Mammalogy* 73: 847-858.

Baker, RJ, Porter, CA, Patton, JC e Van Den Bussche, RA (2000). **Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences**. Occasional pappers of Museum of Texas Tech University 202: 1-16.

Baker, RJ, Porter, CA, Patton, JC e Van Den Bussche, RA (2003). **Diversification among New World leaf-nosed bats: an evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence**. Occasional Pappers of Museum Texas Tech University 230: 1–32.

Barros, HMD, Sotero-Caio, CG, Santos, N, Souza, MJ (2009). **Comparative cytogenetic analysis between *Lonchorhina aurita* and *Trachops cirrhosus*** (Chiroptera, Phyllostomidae). Genetics and Molecular Biology, 32, 4, 748-752.

Bonato, V & Facure, KG (2000). **Bats predation by fringweliped bat *Trachops cirrhosus* (Chiroptera: Phyllostomidae)**. Mammalia. v. 64, p. 241-243.

Buhler, EM (1989). **Molecular approaches to cytogenetics**. In: **Molecular aspects of Humans Genetic**. Vol.1 Gorrod, J. W., Albano, O. and Papa, S., (eds) Ellis Horwwod Publishers, Chichestes, West Sussex, England, p.135-146.

Cramer, MJ, Willing, MR e Jones, C (2001). ***Trachops cirrhosus***. Mammalian Species 656:1-6.

De La Torre, L (1961). **The evolution, variation, and systematics of the neotropical bats of the genus *Sturnira***. Ph.D. Diss., Univ. Illiois, Urbana.

Dobigny, G & Yang, F (2008). **Comparative cytogenetics in the genomics era: cytogenomics comes of age**. Chromosome Research. 16:1-4.

Fagundes, V, Scalzi-Martin, JM, SIMS, K, Hozier, J, Yonenaga-Yassuda, Y (1997). **ZOO-FISH of microdissection DNA library and G-banding patterns reveal the homeology between the Brazilian rodents *Akodon cursor* and *A. montesis***. Cytogenet Cell Genet 78:224-228.

Forman, GL, Baker, RJ e Gerber, J (1967). **Comments on the systematic status of vampire bats (Family Desmodontinae)**. Syst Zool 31: 252-265.

Freeman, PW (1981). **Correspondence of Food Habits and Morphology in Insectivorous bats**. Journal of Mammalogy, 62(1) Lawrence & Provo, p. 166-173.

Freeman, PW (2000). **Macroevolution in microchiroptera. Recoupling morphology and ecology with pehylogeny**. Evol. Ecology Res 2: 317- 335

Finotelo, LF de M (2006). **Filogenia cromossômica da subfamília Pitheceinae (Platyrrhini, Primates) por citogenética clássica e pintura cromossômica**. Dissertação de mestrado. Belém, Universidade Federal do Pará.

Findley, JS (1993). **Bats. A Community Perspective**. Cambridge: Cambridge University Press.

- Garagna S, Broccoli D, Redi CA, Searle JB, Cooke HJ, Capanna E (1995). **Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area.** *Chromosoma* 103:685–692
- Giannini, NP e Kalko, EKV (2004). **Trophic structure in a large assemblage of phyllostomid bats in Panama.** *Oikos*. v. 105. Lund: p.209-220
- Guerra, M (2004). **FISH - Conceitos e aplicações da citogenética.** Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.
- Hill, JE e Smith, JD (1986). **Bats: A Natural History.** ed. Austin, University of Texas., 243 p.
- Howell, W e Black, AD (1980). **Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method.** *Experientia*, v.36, p.1014-1015.
- Hooffmann, FG, Hooper, SR e Baker, RJ (2008). **Molecular dating of the diversification of Phyllostominae bats based on nuclear and mitochondrial DNA sequences.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 653–658.
- Haiduk, MW & Baker, RJ (1982). **Cladistical analysis of G-banded chromosomes of nectar-feeding bats (Glossophaginae, Phyllostomidae).** *Systematic Zoology* 31: 252-265.
- Hsu, T, Spirito, SE e Pardue, ML (1975). **Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes.** *Chromosoma* 53:25-36.
- Honeycutt, RL e Sarich, VM (1987). **Albumin evolution and subfamilial relationships among New World leaf-nosed bats (Family Phyllostomidae).** *Journal of Mammalogy* 68: 505-517.
- Jones, JK, Purvis, A, Maclarron, A, Bininda-Emonds, ORP E Simmons, NB (2002). **A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera).** *Biol Rev.* 77: 223-259.
- Jones G e Teeling EC (2006). **The evolution of echolocation in bats.** *Trends in Ecology and Evolution*, 21: 149-156.
- Koopman, KF (1993). Order Chiroptera *In*: WILSON, D.E.; REEDER, D. M. **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference** (Ed.). Washington and London: Smithsonian Institution Press, 137-241p.
- Lee, TE, Hooper S R e Van Den Bussche, RAR (2002). **Molecular Phylogenetics and taxonomic revision of the genus *Tonatia* (Chiroptera : Phyllostomidae).** *Journal of Mammalogy*, 83(1):49–57.
- Lear, TL (2001). **Chromosomal distribution of the telomere sequence (TTAGGG)<sub>N</sub> in the Equidae.** *Cytogenetic Cell Genet* 93:127-130.

- Lee, C, Sasi, R e Lin, CC (1993). **Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of the Asian muntjacs.** *Cytogenet Cell Genet* 63: 156-159.
- LaVal, RK e Rodríguez-H, B (2002). **Murciélagos de Costa Rica / Costa Rica Bats.** Santo Domingo de Heredia: Costa Rica. Instituto Nacional de Biodiversidad, 320p.
- Mao, X, Nie, W, Wang, J *et al.* (2008). **Comparative cytogenetics of bats (Chiroptera): The prevalence of Robertsonian translocation limits the power of chromosomal characters in resolving interfamily phylogenetic relationships.** *Chromosome Research* 16: 155-170.
- Marques-Aguiar, SA, Reis-Filho, VA, Saldanha, N, Rocha, MMB, Aguiar, GFS, Queiróz, JA E Brigida, JNS (2002). **Levantamento de Quirópteros na Região de Implementação da CHE Belo Monte, Pará, Relatório Final.** Belém, Eletronorte, 53p.
- Madsen, O, Scally, M, Douady, C J, Kao, DJ, Debry, RW, Adkins, R, Amrine, HM, Stanhope, MJ, De Jong, WW e Springer, MS (2001). **Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals.** *Nature (London)* 409, 614–617.
- Murphy, WJ, Eizirik, E, Johnson, WE, Zhang, YP, Ryder, OA e O'Brien, SJ (2001). **Molecular phylogenetics and origins of placental mammals.** *Nature* 409: 614-618.
- Marinho-Filho, JS e Sazima, I (1998). **Brazilian bats and conservation biology: a first survey.** *In:* Kunz, T.H.; Racey, P. A.(Eds.). **Bat biology and Conservation.** Washington: Smithsonian Institution Press. p.282-294.
- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyzis RK (1990) **Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences in vertebrate chromosomes.** *Chromosoma* 99:3–10.
- Miller, DA, Dev, VG, Tantravahi, R e Miller, OJ (1976). **Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells.** *Exp Cell Res* 101: 235-243.
- Miler-Butterworth, M C, Murphy, JW, O'Brien, JS, Springer, SM, Teeling CE (2007). **A Family Matter: Conclusive Resolution of the Taxonomic Position of the Long-Fingered Bats, *Miniopterus*.** *Mol. Biol.Evol.* 24(7):1553-1561.
- Morielle, E e Varella-Garcia, M (1988). **Variability of nucleolus organizer regions in phyllostomid bats.** *Rev Brasil Genet* 11: 853-871.
- Morielle-Versute, E, Taddei, VA, Varrilla-Garcia, M (1992). **Chromosome banding studies of *Chrotopterus auritus* (Chiroptera, Phyllostomidae).** *Rev Brasil Genet* 15: 569-573.
- Nanda I, Schneider-Rasp S, Winking H, Schmid M (1995) **Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements.** *Chromosome Res* 3:399–409.

Nanda I, Schrama D, Feichtinger W, Haaf T, Scharl M, Schmid M **Distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in avian chromosomes** Chromosoma (2002) 111:215–227.

Neves, ACB, Pieczarka, JC, Barros, RMS, Marques-Aguiar, S, Rodrigues, LRR e Nagamachi, CY (2001). **Cytogenetic studies on *Choeroniscus minor* (Chiroptera, Phyllostomidae) from the Amazon region.** Cytobios, 105, 91-98.

Nowak, RM (1999). **Walker's mammals of the world.** 6. ed., Baltimore: Johns Hopkins University Press, v.1 p: 253-470.

Nowak, RM (1994). **Walker's mammals of the world.** Fifth Edition. Baltimore: The Johns Hopkins Univ. Press.

Pagnozzi, J.M.; Silva M.J.J. and Yonenaga-Yassuda Y. (2000) **Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae).** Chromosome Res 8: 585-591.

Patton, JC e Baker, RJ (1978). **Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoid bats.** Systematic Zoology 27: 449-462.

Pellegrino, KCM, Rodrigues, MT e Yonenaga-Yassuda, Y (1999). **Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences.** Hereditas 131:15-21.

Pedro, WA, Passos, FC, Lim, BK (2001). **Morcegos (Chiroptera;Mammalia) da Estação Ecológica dos Caetetus, estado de São Paulo.** Chiroptera Neotropical. v.7, n.1-2, p. 136-140 Brasília.

Peracchi, AL, Albuquerque, ST, Raimundo, SDL (1982). **Notas para o conhecimento dos hábitos alimentares de *Trachops cirrhosus* (Spix, 1823) (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae).** Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. v.5, n.1, p.1-5 Seropédica.

Pettigrew, JD (1986). **Flying primates? Megabats have the advanced pathway from eye to midbrain.** Science 231: 1304-1306.

Pettigrew JD, Jamieson, BGM, Robson, SK, Hall, LS, Mcanally, KL e Cooper HM (1989). **Phylogenetic relation microbats, megabats and primates (Mammalia: Chiroptera and Primates).** Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 325: 489-559.

Pettigrew JD (1995). **Flying primates: crashed, or crashed through?** Symposium of the Zoological Society of London 67:3-26.

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

Porter, CA, Hooper, SR, Van Den Bussche, RA, Lee, TE e Baker, RJ (2003). **Systematic of round-eared bats (*Tonatia* and *Lophostoma*) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences**. *Journal of Mammalogy* 84(3):791–808.

Porter, CA (1994). **Organization and chromosomal location of repetitive DNA sequences in three species of squamate reptiles**. *Chromosome Res* 2:263-273.

Ribeiro, NAB, Nagamachi, CY, Pieczarka, JC, Rissino, JD, Neves, ACB, Gonçalves, ACO, Marques-Aguiar, S e 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, Marques-Aguiar, S, Assis, MFL, 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*, 3, 593-59.

Rocha, DCC (2002). **Mapeamento citogenético comparativo de *Saimiri boliviensis*, *Saimiri ustus* com *Homo sapiens* e *Saguinus oedipus* por FISH multicolor**. Dissertação de mestrado. Belém, Universidade Federal do Pará.

Reis, NR, Peracchi, AL, Pedro, WA, Lima, IP (2006). **Mamíferos do Brasil**.1. ed. Londrina. 437pp.

Reis, NR, Peracchi, AL, Pedro, WA, Lima, IP (2007). **Morcegos do Brasil**. Londrina. 253 pp.

Reid, FA (1997). **A field guide to the mammals of Central America and southeast Mexico**. New York: Oxford University Press, 334p.

Santos, N, Fagundes, V, Yonenaga-Yassuda, Y e Sousa, MJ (2002). **Localization of rRNA genes in Phyllostomidae bats reveals silent NORs in *Artibeus cinereus***. *Hereditas* 136:137-143.

Santos, N e Sousa, MJ (1998). **Use of fluorochromes chromomycin A<sub>3</sub> and DAPI to study constitutive heterochromatin and NORs in four species of bats (Phyllostomidae)**. *Caryologia* 51:265-278.

Santos, N, Fagundes, V, Yonenaga-Yassuda, Y e Souza MJ (2001). **Comparative karyology of Brazilian vampire bats *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata* (Phyllostomidae-Chiroptera): banding patterns, base-specific fluorochromes and FISH of ribosomal genes**. *Hereditas* 134: 189-194.

Simmons, NB (1994). **The case for Chiropteran Monophyly**. *American Museum Novitates*. n.3103. New York: 54p.

Souza, MJ e Araújo, MCP (1990). **Conservative pattern of the G-bands and diversity of C- banding patterns and NORs in Stenodermatinae (Chiroptera-Phyllostomidae)**. *Rev Brasil Genet* 13: 255-268.

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

Szalay, FS e Drawhorn, G (1980). **In Comparative Biology and Evolutionary Relationships of Tree Shrews**, ed. Lockett, W. P. (Plenum, New York), pp. 133–170.

Simmons, NB e 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.** Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 235: 1-182.

Smith, JD (1972). **Systematic of the chiropteran family Mormoopidae.** Univ. Kansas Mus Nat. Hist Misc Publ 56: 1-132.

Smith, JD Chiropteran Evolution (1976). **In: BAKER RJ, JONES JR JK e CARTER DC (Eds.) Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae, Part I.** Special Publications of the Museum of the Texas Tech University 10: 1-218.

Simmons, NB Order Chiroptera (2005). **In: Wilson DE and Reeder DM (Eds.) Mammal species of the world: taxonomic and geographic reference.** 3rd edition. Baltimor: Johns Hopkins University Press, p.312-529.

Slaughter, BH (1970). **Evolutionarily trends of chiroptera dentitions.** In B. H. Slaughter and W. D. Walton (eds), About bats: 51-83. Dalas: Southern Methodist Univ. Press.

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

Toledo, LA (1973). **Estudos citogenéticos em morcegos brasileiros (Mammalia: Chiroptera).** Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Médicas e biológica de Botucatu, USP, Botucatu.

Teeling, CE, Springer, SM, Madsen, O, Bates, P, O'Brien, JS; Murphy, JW (2005). **A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record.** Science 307, 580.

Tucker, PK (1986). **Sex chromosome-autosome translocations in the leaf-nosed bats family Phyllostomidae. I. Mitotic analyses of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae.** Cytogenet Cell Genet 43: 19-27.

Tucker, PK e Bickham, JK (1986). **Sex chromosome-autosome translocations in the leaf-nosed bats family Phyllostomidae. II. Meiotic analyses of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae.** Cytogenet Cell Genet 43:28-37.

Teeling, EC, Scally, M, Kao, DJ, Romagnoli, ML, Springer, MS e Stanhipe, MJ (2000). **Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats.** Nature 403: 188-192.



Teeling, EC, Madsen, O, Van Den Busseche, RA, JONG, WW, Stanhope, MJ e Springer, MS (2002) **Microbat paraphyly and the convergent evolution of the key innovation in old world rhinolophoid microbat**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 1431-1436.

Varella-Garcia, M e Taddei, VA (1989). **Citogenética de Quirópteros: Métodos e Aplicações**. Rev Bras Zool 6:297-323.

Van Den Bussche, RA, Hooper, SR e Hansen, EW (2002). **Characterization and phylogenetic utility of the mammalian protamine P1 gene**. Molecular Phylogenetics and Evolution 22:333-341.

Van Den Bussche, RA & Hooper SR (2004). **Phylogenetic relationships among recent chiropteran families and the importance of choosing appropriate out-group taxa**. Journal of Mammalogy 85: 321-330.

Varella-Garcia, M, Morielle-Versute, E e Taddei VA (1989). **A survey of cytogenetic data on brazilian bats**. Rev Brasil Genet 12: 761-793.

Vermeesch JR, De Meurichy W, Van Den Berghe H, Marynen P, Petit P (1996). **Differences in the distribution and nature of the interstitial telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in the chromosomes of the Giraffidae, okapai (*Okapia johnstoni*), and giraffe (*Giraffa camelopardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob(5;26) fusion site**. Cytogenet Cell Genet 72:310–315.

Volleth, M (1987). **Differences in location of nucleolus organizer regions in European vespertilionid bats**. Cytogenetic Cell Genetic.v.44, p.186-187.

Wilson, DE e Reeder, DM (Eds) (2005). **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. 3 ed. v.1 Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2181p.

Wetterer, AL, Rockman, MV e Simmons NB (2000). **Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes and restriction sites**. Bulletin of the American Museum of Natural History, New York, 248: 1-200.

Zhuang, Q e Müller, R (2006). **Noseleaf furrows in a horseshoe bat biosonar beam**. Physical Review Letters. v.24, n.97. New York, p. 218701-1 218701-4.

Wilson, DE Bats (1989). *In*: LIETH, H. & M.J.A. WERGNER (eds.). **Tropical Rainforest Ecosystems**. Amsterdam, Amsterdam Elsevier Science Publishers, Pp. 365-382.

Walton, DW e Walton, GM (1968). **Comparative osteology of the pelvic and pectoral girdles of the Phyllostomatidae (Mammalia: Chiroptera)**. J.Grad. Res. Cent. South. Methodist Univ. 37: 1–35.

Williams, SL, Willig, MR e Reid, FA (1995). **Review of the *Tonatia bidens* complex (Mammalia: Chiroptera), with descriptions of two new subspecies**. Journal of Mammalogy 76:612–626.

Wiley JE, Meyne J, Little ML, Stout JC (1992) **Interstitial hybridization sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence on the chromosomes of some North American hylid frogs.** Cytogenet Cell Genet 61:55–57.

Yonenaga, Y, Frota-Pessoa, O e Lewis, KR (1969). **Karyotypes of seven species of brazilian bats.** Caryologia 22: 63-80.

### 3 – OBJETIVOS

#### 3.1 – GERAL

- Caracterizar através de citogenética clássica e molecular espécies pertencentes à subfamília Phyllostominae, buscando reconhecer os mecanismos de evolução cromossômica responsáveis pela diferenciação cariotípica observada entre as espécies.

#### 3.2 – ESPECÍFICOS

- Caracterizar citogeneticamente através das técnicas de bandeamento G, C e Ag-NOR as espécies *Chrotopterus auritus*, *Trachops cirrhosus* e *Vampyrum spectrum*;
- Localizar as seqüências teloméricas e sítios de DNA ribossomal 18S e 28S através da técnica de Hbridização *in situ* Fluorescente;
- Identificar os blocos sintênicos existentes nestas espécies;
- Fazer uma análise comparativa interespecífica através dos padrões de bandeamento G e inferir sobre a relação de parentesco entre os gêneros pertencentes a subfamília Phyllostominae, identificando os caracteres cromossômicos específicos que unam as espécies nas tribos e as que as diferenciam entre si;
- Correlacionar nossos dados com os já presentes na literatura.

#### 4. MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO

**Comparative cytogenetic analyses of the bat species  
*Chrotopterus auritus*, *Trachops cirrhosus* and *Vampyrum  
spectrum* (Chiroptera, Phyllostomidae).**

**Title:** Comparative cytogenetic analyses of the bat species *Chrotopterus auritus*, *Trachops cirrhosus* and *Vampyrum spectrum* (Chiroptera, Phyllostomidae).

**Authors:** Natalia Karina Nascimento da Silva<sup>1,3</sup>; Anderson José Baia Gomes<sup>1,4</sup>; Cleusa Yoshiko Nagamachi<sup>1,2</sup>; Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues<sup>5</sup>; Julio Cesar Pieczarka<sup>1,2</sup>

**Institutions:**

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil.

<sup>2</sup>CNPq Researcher.

<sup>3</sup>CAPES Master Scholarship on Neurosciences and Cellular Biology, Brazil

<sup>4</sup>CAPES Doctor Scholarship on Genetics and Molecular Biology, Brazil

<sup>5</sup>Laboratório de Genética & Biodiversidade, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará, Brazil.

**Short title:** cytogenetic analyses of Vampyrinae (Chiroptera).

**Correspondence to:** Dr. Julio Cesar Pieczarka.

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

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

Phone-Fax: 091-3201-7931.

e-mail: [julio@ufpa.br](mailto:julio@ufpa.br), [juliopieczarka@pesquisador.cnpq.br](mailto:juliopieczarka@pesquisador.cnpq.br)

## Abstract

The Family Phyllostomidae comprises the most abundant and diversified group of bats of the neotropical region. This diversity is problematic for systematic analysis and the construction of a phylogenetic history of this family. The analysis of cytogenetic data provides a useful tool for understanding the phylogenetic relationships in this family. We describe here the analysis of data on chromosome banding (G and C), staining (Ag-NOR), and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for three species of Phyllostomidae collected in two Brazilian states of the Amazon region (Amazonas and Pará). The chromosome data obtained for *Chrotopterus auritus* ( $2n = 28$ ,  $NF = 52$ ) and *Trachops cirrhosus* ( $2n = 30$ ,  $FN = 56$ ) are consistent with earlier reports, but the banding patterns and FISH data for *Vampyrum spectrum* ( $2n = 30$ ,  $NF = 56$ ) have not previously been reported. For all three species the C-banding showed a pericentromeric distribution pattern of the constitutive heterochromatin. Using telomeric DNA probes the FISH did not show any interstitial sequence, and the 18S rDNA probes confirmed the location of the nucleolar organizer regions (observed by Ag-NOR) in the long arm of chromosome pair 2 of *C. auritus*, in chromosome pair 11 of *T. cirrhosus*, and in the long arm of chromosome pair 1 of *V. spectrum*. Comparative analysis suggested extensive chromosome differentiation, with few chromosomes shared among the three species. *C. auritus* and *V. spectrum* had more chromosomes in common than either had with *T. cirrhosus*.

**Key words:** Chiroptera, Phyllostominae, cytogenetic, chromosome banding, diversity

## Introduction

The family Phyllostomidae is the most diversified group of neotropical bats. The extent of morphological and ecological diversity in this family is a problem in systematics studies because it creates difficulties in interpretation of both intragenetic and intergeneric phylogenetic relationships. As a consequence, datasets suggest various associations among the genera of this family (De La Torre, 1961; Slaughter, 1970; Smith, 1976; Patton and Baker, 1978; Honeycutt and Sarich, 1987; Baker *et al.*, 1989; Baker *et al.* 2000; Wetterer *et al.*, 2000; Jones, 2002; Baker *et al.*, 2003). The most recent phylogenetic proposition for the family Phyllostomidae (Baker *et al.*, 2003) combined data on mtDNA sequences with previous phylogenies based on analysis of the nuclear gene RAG2 (Baker *et al.*, 2000), morphology (Wetterer *et al.*, 2000) and karyotype (Baker *et al.*, 1973, 1989; Baker and Bass, 1979). The resulting classification for the Phyllostomidae includes 11 subfamilies, with the subfamily Phyllostominae divided into 9 genera and 20 species organized in 3 tribes: Phyllostomini (genera *Phyllostomus*, *Tonatia*, *Mimon*, *Phylloderma*, *Lophostoma*); Macrophyllini (*Trachops* and *Macrophyllum*); and Vampyrini (*Chrotopterus* and *Vampyrum*).

The phylogenetic relationships in the subfamily Phyllostominae are very controversial. Despite recent efforts to resolve the relationships among the many taxonomic levels in the subfamily using morphological (Wetterer *et al.* 2000; Jones *et al.*, 2002) and molecular (Lee *et al.* 2002; Baker *et al.* 2003; Porter *et al.* 2003; Hoffmann *et al.* 2008) data, uncertainties remain because the phylogenies that have been generated confirm the subfamily as monophyletic, but provide little support for the phylogenetic relationships among the 3 tribes.

Cytogenetic analysis offers an important alternative tool for the definition of phylogenetic relationships among these bats, because chromosome rearrangement is a rare

event in the genome, and its occurrence can be used as a phylogenetic marker (Rokas and Holland, 2000).

Cytogenetic studies of the Phyllostominae (Table 1) show different amount of chromosome evolution among the genera, within which most species have great similarity with respect to the chromosomes and chromosome arms. Further, genera including *Tonatia* and some species of *Lophostoma* have a high tax of chromosome evolution, which makes it almost impossible to establish the rearrangements that differentiate the karyotypes among them (Patton and Baker, 1978; Baker, 1979; Baker and Bass, 1979, Baker and Bickham, 1980; Arnold *et al.*, 1983; Santos and Sousa, 1998, Rodrigues *et al.*, 2000).

To improve understanding of the patterns of chromosomal evolution among the Phyllostominae, the chromosome traits of *Chrotopterus auritus*, *Vampyrum spectrum* (tribe Vampyrini) and *Trachops cirrhosus* (tribe Macrophyllini) were studied using classical cytogenetic analyses (G- and C-banding, Ag-NOR staining) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH).

## **Material and Methods**

### *Species analyzed*

The cytogenetic analyses were applied to samples collected in Brazil, which included 5 specimens (3 males, 2 females) of *C. auritus* Peters, 1856 from Itaituba, Pará State; 2 specimens (1 male, 1 female) of *T. cirrhosus* Spix, 1823 from Urucará, Amazonas State and Juruti, Pará State, respectively; and 2 specimens (females) of *V. spectrum* Linnaeus, 1815, one each from Urucará and Itacoatiara, Amazonas State (Fig. 1).

The animals were collected from natural populations using mist nets. Chromosome preparations and skin biopsy samples were sent to the Laboratório de Citogenética of the Universidade Federal do Pará, in Belém (Brazil). The animals were fixed in 10%



formaldehyde, preserved in 70% ethanol, and deposited in the mammal collection of the Museu Paraense Emilio Goeldi (Brazil).

#### *Chromosome preparations and banding techniques*

The chromosome preparations were made following the method of direct bone marrow extraction described by Baker *et al.* (2003). The G-banding pattern was obtained using a trypsin solution (Seabright, 1971), followed by incubation in saline solution (0.5  $\times$  SSC) at 60°C and staining with Wright according to Verma and Babu (1995). The C-banding was performed following Sumner (1972), and the nucleolar organizer region (NOR) staining followed Howell and Black (1980). The karyotypes were organized in a decreasing sequence of chromosome pair sizes.

#### *Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)*

FISH was performed using telomeric probes with digoxigenin (all human telomere probe; Oncor), prepared following the Oncor protocol. For confirmation of the NOR location, 18S rDNA probes were amplified from BACs (bacterial artificial chromosomes), labeled by nick translation with dUTP-biotin, and detected with avidin-Cy3 or fluorescein isothiocyanate (FITC), according to Martins and Galetti (1998). The images were digitally captured using a CCD Zeiss Axiocam camera connected to a Zeiss Axioplan 2 microscope and controlled by Axiovision 3.0 software. The chromosomes were identified according to morphology and banding patterns using inverted DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

#### **Results**

The karyotype of *C. auritus* was  $2n = 28$  and  $FN = 52$ , with the autosome complement comprising 13 bi-armed pairs (metacentric and submetacentric). The X chromosome was mid-sized and submetacentric, and the Y chromosome was small and acrocentric (Fig. 2a). The C-

banding showed that the constitutive heterochromatin (CH) was located in the pericentromeric region of each autosome and in the X chromosome, while the Y chromosome was small and had little CH (Fig. 2b). The telomeric sequences were found at the extremities of each chromosome (Fig. 2c). The rDNA probes and the Ag-NOR staining confirmed the location of the NORs in the proximal region of the long arm of chromosome pair 2 (Fig. 2d).

The karyotype of *V. spectrum* was  $2n = 30$  and  $FN = 56$ , with the autosome complement comprising 14 bi-armed pairs (metacentric and submetacentric). The X chromosome was mid-sized and submetacentric (Fig. 3a). The CH was located at the pericentromeric region of each chromosome (Fig. 3b). FISH with telomeric probes was detected at the extremities of all chromosomes, with no interstitial telomeric sequence (ITS) (Fig. 3c). The Ag-NOR staining located the NOR only in the proximal region of the long arm of chromosome pair 1, and this was confirmed using FISH with the rDNA probes (Fig. 3d).

The karyotype of *T. cirrhosus* was  $2n = 30$  and  $FN = 56$ , and all chromosome pairs were bi-armed. The X chromosome was subtelocentric and the Y chromosome acrocentric. The CH was located in the pericentromeric region of all autosomes and in the short arm of the X chromosome. The Y chromosome was almost completely heterochromatic (Fig. 4b). FISH using the telomeric probes was detected at the extremities of all chromosomes (Fig. 4c). FISH using the rDNA probes confirmed that the NOR was located only on chromosome pair 11 (Fig. 4c).

The G-banding pattern allowed precise identification of all the chromosome pairs in the 3 species. Comparative analysis among the species suggested a broad gradation of chromosome differentiation, with few shared chromosome pairs.

## **Discussion**

The *C. auritus* in this study was of karyotype  $2n = 28$  and  $FN = 52$ , which is consistent with the findings of Yonenaga *et al.* (1969) and Morielle-Versute *et al.* (1992) for samples

collected in São Paulo State, Brazil, and from Suriname (Honeycutt *et al.* 1980). The *V. spectrum* specimens had a karyotype of  $2n = 30$  and  $FN = 56$ , which is similar to that reported by Baker and Hsu (1970) and Baker (1979) for a sample collected in *Trinidad and Tobago*, but analyzed by conventional staining only. The *T. cirrhosus* specimens (karyotype  $2n = 30$  and  $FN = 56$ ) had a subtelocentric X chromosome, similar to samples collected in Mexico, *Guyana*, and *Trinidad and Tobago* (Baker, 1967, 1979; Baker and Hsu, 1970), but different from a sample from Pernambuco State, Brazil (Barros *et al.*, 2009), in which the X chromosome was acrocentric. This difference can be explained by the presence of a CH block in the short arm of the X chromosome in our sample.

The pericentromeric CH distribution pattern observed in *C. auritus*, *T. cirrhosus* and *V. spectrum* has frequently been reported in the Phyllostomidae (Varella-Garcia *et al.*, 1989; Santos and Sousa, 1998; Rodrigues *et al.*, 2000). The Y chromosome of *T. cirrhosus* was almost completely heterochromatic, as previously observed by Barros *et al.* (2009), but the Y chromosome of *C. auritus* had little heterochromatin.

In *V. spectrum* and *C. auritus* the NOR was located in the proximal region of the long arm of chromosome pairs 1 and 2, respectively. In *T. cirrhosus* the NOR was located in the distal region of the long arm of a small metacentric chromosome (pair 11), as it is in the species of the genus *Phyllostomus*, where the NOR is located on the short arm of chromosome pair 15 (Morielle and Varella-Garcia, 1988; Rodrigues *et al.*, 2000). These chromosomes do not seem to have conserved synteny in relation to the NOR location.

Comparative analysis of the G-banding pattern among *V. spectrum*, *C. auritus* (Vampyrini) and *T. cirrhosus* (Macrophyllini) enabled identification of chromosomes or chromosome segments shared among the genera. It is likely that the non-identified chromosomes/segments were subject to different kinds of chromosome rearrangement, which made comparative analysis of the 3 species difficult. However, 5 chromosome pairs

(3, 4, 5, 8 and 10 in *T. cirrhosus*; 4, 3, 5, 10 and 12 in *V. spectrum*; and 3, 5, 6, 9 and 12 in *C. auritus*) were conserved with no rearrangement after divergence of the species, suggesting that these chromosomes were present in the common ancestor and are symplesiomorphic traits. Two other chromosome pairs were common between *V. spectrum* (pairs 9 and 14) and *C. auritus* (pairs 8 and 13) respectively, but different in *T. cirrhosus* (pairs 7 and 9). This difference can be explained by pericentric inversion in *T. cirrhosus*, because in outgroups including Desmodontinae the chromosome morphology is similar to *V. spectrum* and *C. auritus* (Sotero-Caio *et al.*, 2010). The two Vampyrini species have exclusive homeologies not observed in any other Phyllostominae; the long arm with NOR in each species, and the chromosome corresponding to pair 7 in *C. auritus* and pair 11 in *V. spectrum*. The 3 species share many chromosome arms, but these are part of different metacentric chromosomes in each karyotype. This demonstrates that rearrangements such as Robertsonian translocations occurred in many combinations, differentiating the karyotypes of these species. This is in agreement with previous reports suggesting that chromosome evolution in Chiroptera is driven by these kinds of rearrangement (Ao *et al.*, 2006, 2007; Mao *et al.*, 2007, 2008, 2010). The comparative cytogenetic study of Patton and Baker (1978) suggests that the karyotype of *Macrotus waterhousii* is closest to the ancestor of the family Phyllostomidae. Barros *et al.* (2009) suggested that *T. cirrhosus* has three bi-armed chromosome pairs (8, 10 and 13) that remain unchanged, and these correspond to the bi-armed chromosome pairs (6/7, 15/16 and 25/26, respectively) of *Macrotus waterhousii*. In comparative analyses we observed that these pairs were also present in the karyotype of *V. spectrum*, corresponding to chromosome pairs 10, 12 and 13. However, in *C. auritus* only the chromosome pairs 6/7 and 15/16 corresponded to pairs 9 and 10. The 25/26 chromosome pair of *Macrotus waterhousii* was not conserved in *C. auritus*, as previously suggested by Morielle-Versute *et al.* (1992), which shows that many chromosome rearrangements

contributed to the observed karyotypic diversity, and that the karyotypes of these species are significantly different from the ancestral type. Studies supported by morphological comparisons have suggested an association among *Trachops*, *Chrotopterus* and *Vampyrum* (Slaughter, 1970), and this was corroborated by immunological data (Honeycutt and Sarich, 1987). In comparisons of these data with chromosome information, Baker *et al.* (1989) suggested a classification of the Phyllostomidae that grouped these three genera in the subfamily Vampyrinae. However, no banding data for *Trachops* were available at that time. More recent topologies (Wetterer *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002) have included the genera *Trachops*, *Chrotopterus*, *Vampyrum* and *Tonatia* in the tribe Vampyrini (subfamily Phyllostominae), with the clade based mainly on the feeding specializations shared among the genera. However, topologies based in molecular data do not support this clade, but recognize 3 tribes as proposed by Baker *et al.* (2003): Phyllostomini (*Lophostoma*, *Tonatia*, *Phylloderma*, *Phyllostomus* and *Mimon*), Vampyrini (*Chrotopterus* and *Vampyrum*) and Macrophyllini (*Macrophyllum* and *Trachops*). The monophyly in these tribes is well established and strongly supported by molecular topologies (Lee *et al.* 2002; Baker *et al.* 2003; Porter *et al.* 2003, Hoffmann *et al.*, 2008). However, there remain unsolved questions related to the evolutionary relationship among the tribes. Baker *et al.* (2003) suggested that the Phyllostomini may be a sister group of the Vampyrini, with the Macrophyllini being the most basal branch of this subfamily. Other molecular topologies suggest that the Phyllostomini and Macrophyllini are sister groups, and the Vampyrini is the basal branch (Lee *et al.*, 2002; Porter *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 2008).

From the chromosome study the most parsimonious tribes would place the Phyllostomini and Macrophyllini as sister groups, as *T. cirrhosus* has an inverted chromosome (pair 7), which is a synapomorphy for the *Phyllostomus* genus clade (chromosome pair 7, tribe Phyllostomini) in Patton and Baker (1978). This condition is not found in *C. auritus*

(chromosome pair 8), *V. spectrum* (chromosome pair 9), or in species of other subfamilies including the Desmodontinae, which is accepted as the base of the family, where the three species have this pair metacentric (Sotero-Caio *et al.*, 2010). In addition, *T. cirrhosus* has a small number of chromosomes in common with species of the Vampyrini, Apart from the 5 pairs that are common to the 3 genera, *T. cirrhosus* has 3 more pairs of chromosomes in common including a symplesiomorphic pair (pair 9 in *V. spectrum* and pair 8 in *C. auritus*), and the chromosome pairs 14 and 11 in *V. spectrum*, and 13 and 7 in *C. auritus*, respectively; this represents a synapomorphy for the clade. Additional cytogenetic studies, such as chromosome painting, will be necessary to understand the intergeneric relationships among this subfamily.

### **Acknowledgements**

The authors thank to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES for financial support.

### **Figure Legends**

**Figure 1.** Map from the regions where the three species were collected. Source: SISCOM/IBAMA. Design: NOGUEIRA KNS (2011).

**Figure 2, a-d.** Metaphases of *Chrotopterus auritus*. **a** – G-banding. **b** - C-banding. **c** - FISH using telomeric probes. **d** - FISH using 18S rDNA probes.

**Figure 3, a-d.** Metaphases of *Vampyrum spectrum*. **a** – G-banding. **b** - C-banding. **c** - FISH using telomeric probes. **d** - FISH using 18S rDNA probes.

**Figure 4, a-d.** Metaphases of *Trachops cirrhosus*. **a** – G-banding. **b** - C-banding. **c** - FISH using telomeric probes. **d** - FISH using 18S rDNA probes.

## References

Ao L, Gu X, Feng Q, *et al.*: Karyotypic relationships of six bat species (Chiroptera, Vespertilionidae) from China revealed by chromosome painting and G-banding comparison. *Cytogenetic and Genome Research* 115: 145-153. (2006).

Ao L, Mao X, Nie W, *et al.*: Karyotypic evolution and phylogenetic relationships in the order Chiroptera as revealed by G-banding comparison and chromosome painting. *Chromosome Research* 15: 257-268. (2007).

Arnold ML, Baker RJ, Honeycutt RL: Genic differentiation and phylogenetic relationship within two New World bat genera. *Biochemical Systematics and Ecology* 11: 295–303. (1983).

Baker RJ: Karyotypes of bats of the Phyllostomidae and their taxonomic implications. *Southwest Naturalist*, v.12, p.407-428. (1967).

Baker RJ, Hsu TC: Further studies on the sex- chromosome systems of the American leaf-nosed bats (Chiroptera, Phyllostomidae). *Cytogenetics* 9: 131-138. (1970).

Baker RJ: Comparative cytogenetics of the New World leaf-nosed bats (Phyllostomidae). *Periodicum Biologicum* 75: 37-45. (1973).

Baker RJ, Hood CS, Honeycutt RL: Phylogenetic relationships and classification of the higher categories of the New World bat family Phyllostomidae. *Systematic Zoology* 38: 228–238. (1989).

Baker RJ, Porter CA, Patton JC, Van Den Bussche RA: Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. *Occasional papers of Museum of Texas Tech University* 202: 1-16. (2000).

Baker RJ, Haiduk MW, Robbins LW, Cadena A, Koop BF: Chromosomal studies of south american bats their systematic implication. In: Mares, M. A.; Genoways, H.H. (Eds.).

Mammalian Biology in South America. Special Publications Series - Pymatuning Laboratory of Ecology, Pittsburg, p.303-327. (1982).

Baker RJ, Porter CA, Patton JC, Van Den Bussche RA: Diversification among New World leaf-nosed bats: an evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. Occasional Papers of Museum Texas Tech University 230: 1–32. (2003).

Baker RJ, Hamilton M, Parish DA: Preparations of Mammalian karyotypes under field conditions. Occasional Papers of Museum Texas Tech University 228: 1–7. (2003).

Baker RJ, Hood CS, Honeycutt RL: Phylogenetic relationships and classification of the higher categories of the New World bat family Phyllostomidae. Systematic Zoology 38: 228–238. (1989).

Baker RJ, Bass RA: Evolutionary relationship of the Brachyphyllinae to Glossophaginae genera *Glossophaga* and *Monophyllus*. Journal of Mammalogy 60: 364-372. (1979).

Baker RJ: Karyology. In: R. J. Baker, J. K. Jones, Jr., and D. C. Carter (Eds), Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae, p. III. Spec. Publ. Mus. Texas Tech Univ 16: 1107–155. (1979).

Baker RJ, Bickham JW: Karyotypic evolution in bats: Evidence of extensive and conservative chromosomal evolution in closely related taxa. Systematic Zoology 29: 239-253. (1980).

Barros HMD, Sotero-Caio CG, Santos N, Souza MJ: Comparative cytogenetic analysis between *Lonchorhina aurita* and *Trachops cirrhosus* (Chiroptera, Phyllostomidae). Genetics and Molecular Biology 32(4): 748-752. (2009).

De La Torre L: The evolution, variation, and systematics of the neotropical bats of the genus *Sturnira*. Ph.D. Diss., Univ. Illinois, Urbana (1961).



Genoways HH, Williams SL: Results of the Alcoa Foundation- Suriname Expeditions. I. A new species of the genus *Tonatia* (Mammalia: Phyllostomidae). *Annals of the Carnegie Museum* 49: 203-211. (1980).

Hooffmann FG, Hooper SR, Baker RJ: Molecular dating of the diversification of Phyllostominae bats based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 653–658. (2008).

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

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

Honeycutt RL, Sarich VM: Albumin evolution and subfamilial relationships among New World leaf-nosed bats (Family Phyllostomidae). *Journal of Mammalogy* 68: 505-517. (1987).

Jones JK, Purvis A, Maclarnon A, Bininda-Emonds ORP, Simmons NB: A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). *Biol Rev.* 77: 223-259. (2002).

Lee TE, Hooper SR, Van Den Bussche RAR: Molecular Phylogenetics and taxonomic revision of the genus *Tonatia* (Chiroptera : Phyllostomidae). *Journal of Mammalogy* 83(1): 49–57. (2002).

Mao X, Nie W, Wang J *et al.*: Karyotype evolution in *Rhinolophus* bats (Rhinolophidae, Chiroptera) illuminated by cross-species chromosome painting and G-banded comparison. *Chromosome Research* 15: 2-14. (2007).

Mao X, Nie W, Wang J, *et al.*: Comparative cytogenetics of bats (Chiroptera): The prevalence of Robertsonian translocation limits the power of chromosomal characters in resolving interfamily phylogenetic relationships. *Chromosome Research* 16: 155-170. (2008).

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

Morielle E, Varella-Garcia M: Variability of nucleolus organizer regions in phyllostomid bats. *Revista Brasileira de Genetica* 11: 853-871. (1988).

Morielle-Versute E, Taddei VA, Varella-Garcia M: Chromosome banding studies of *Chrotopterus auritus* (Chiroptera, Phyllostomidae). *Revista Brasileira de Genetica* 15: 569-573. (1992).

Patton JC, Baker RJ: Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoids bats. *Systematic Zoology* 27: 449-462. (1978).

Rokas A, Holland PWH: Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. *Science* 15: 454-459. (2000).

Rodrigues LRR, Barror RMS, Marques-Aguiar S, Assis MFL, Pieczarka JC, Nagamachi CY: Chromosome comparison between two species of *Phyllostomus* (Chiroptera-Phyllostomidae) from Eastern Amazonia, with some phylogenetic insights. *Genetics and Molecular Biology* 3: 593-59. (2000).

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

Porter CA, Hooper SR, Van Den Bussche RA, Lee TE, Baker RJ: Systematic of round-eared bats (*Tonatia* and *Lophostoma*) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Journal of Mammalogy* 84(3): 791–808. (2003).

Richards LR, Rambau RV, Lamb JM, Taylor PJ, *et al.*: Cross-species chromosome painting in bats from Madagascar: the contribution of Mysopodidae to revealing ancestral systemies in Chiroptera. *Chromosome Research* 18(6): 635-653. (2010).

Santos N, Sousa MJ: Use of fluorochromes chromomycin A<sub>3</sub> and DAPI to study constitutive heterochromatin and NORs in four species of bats (Phyllostomidae). *Caryologia* 51: 265-278. (1998).

Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y, Sousa MJ: Localization of rRNA genes in Phyllostomidae bats reveals silent NORs in *Artibeus cinereus*. *Hereditas* 136: 137-143. (2002).

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

Slaughter BH: Evolutionarily trends of chiroptera dentitions. *In* B. H. Slaughter and W. D. Walton (eds.), *About Bats*. Pp. 51-83. Dallas: Southern Methodist Univ. Press. (1970).

Smith JD: Chiropteran Evolution. *In*: Baker RJ, Jones JR JK e Carter DC (Eds.) *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae, Part I. Special Publications of the Museum of the Texas Tech University* 10: 1-218. (1976).

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

Tucker PK, Bickham JK: Sex chromosome-autosome translocations in the leaf-nosed bats family Phyllostomidae. II. Meiotic analyses of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae. *Cytogenetics and Cell Genetics* 43: 28-37. (1986).

Varella-Garcia M, Morielle-Versute E, Taddei VA: A survey of cytogenetic data on brazilian bats. *Revista Brasileira de Genetica* 12: 761-793. (1989).

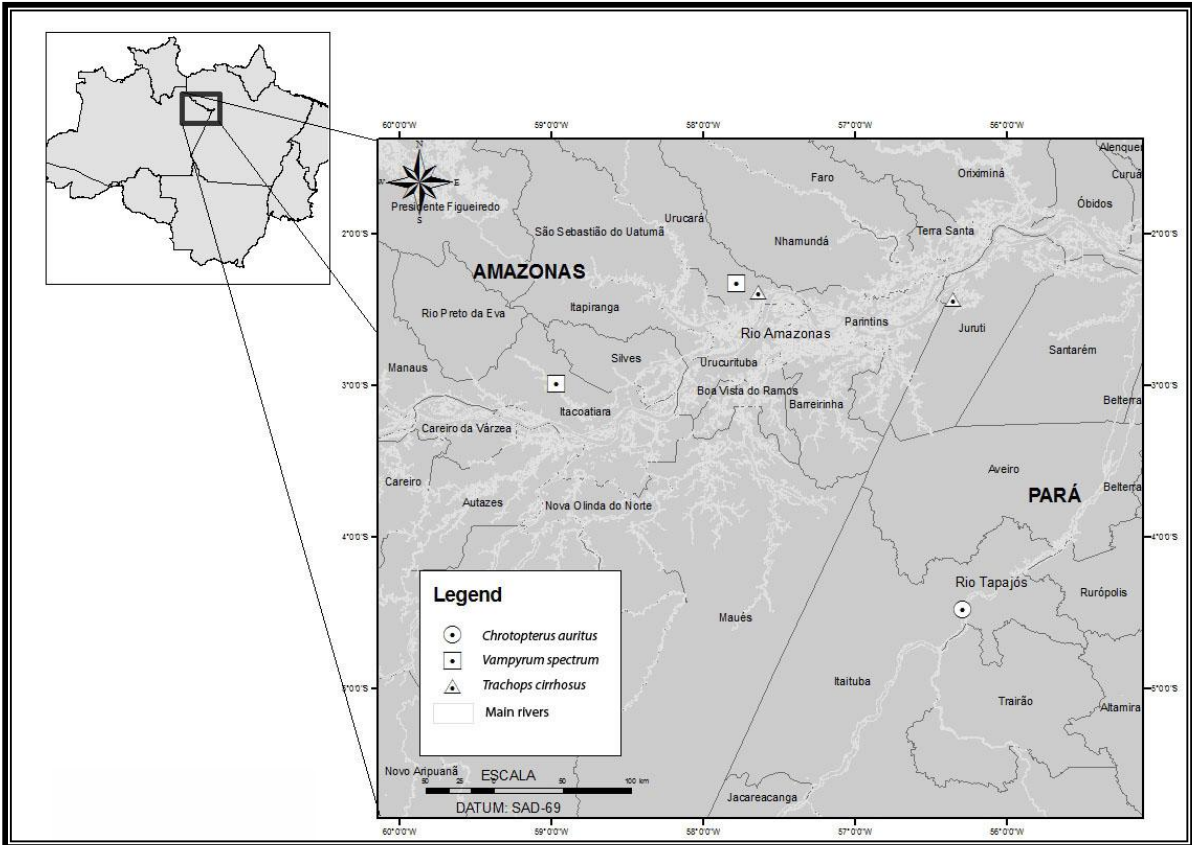
Verma RS, Babu A: Human chromosomes: Principles and techniques. 2<sup>a</sup> ed. Mcgraw-Hill, Inc. Health professional division. (1995).

Wetterer AL, Rockman MV, Simmons NB: Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes and restriction sites. Bulletin of the American Museum of Natural History, New York, 248: 1-200. (2000).

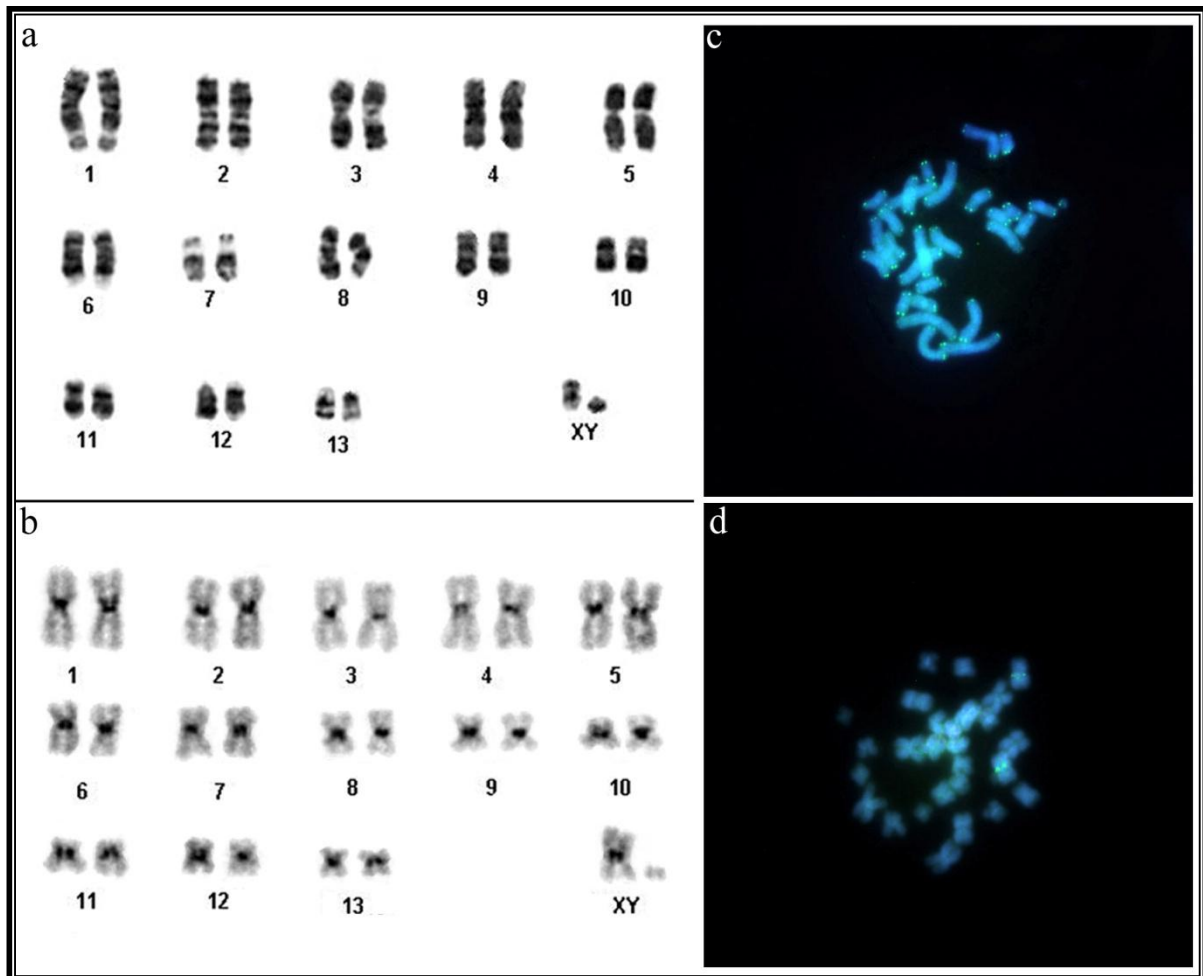
Yonenaga Y, Frota-Pessoa O, Lewis KR: Karyotypes of seven species of Brazilian bats. Caryologia 22: 63-78 (1969).

**Table 1.** Cytogenetic studies in bats of the Subfamily Phyllostominae.

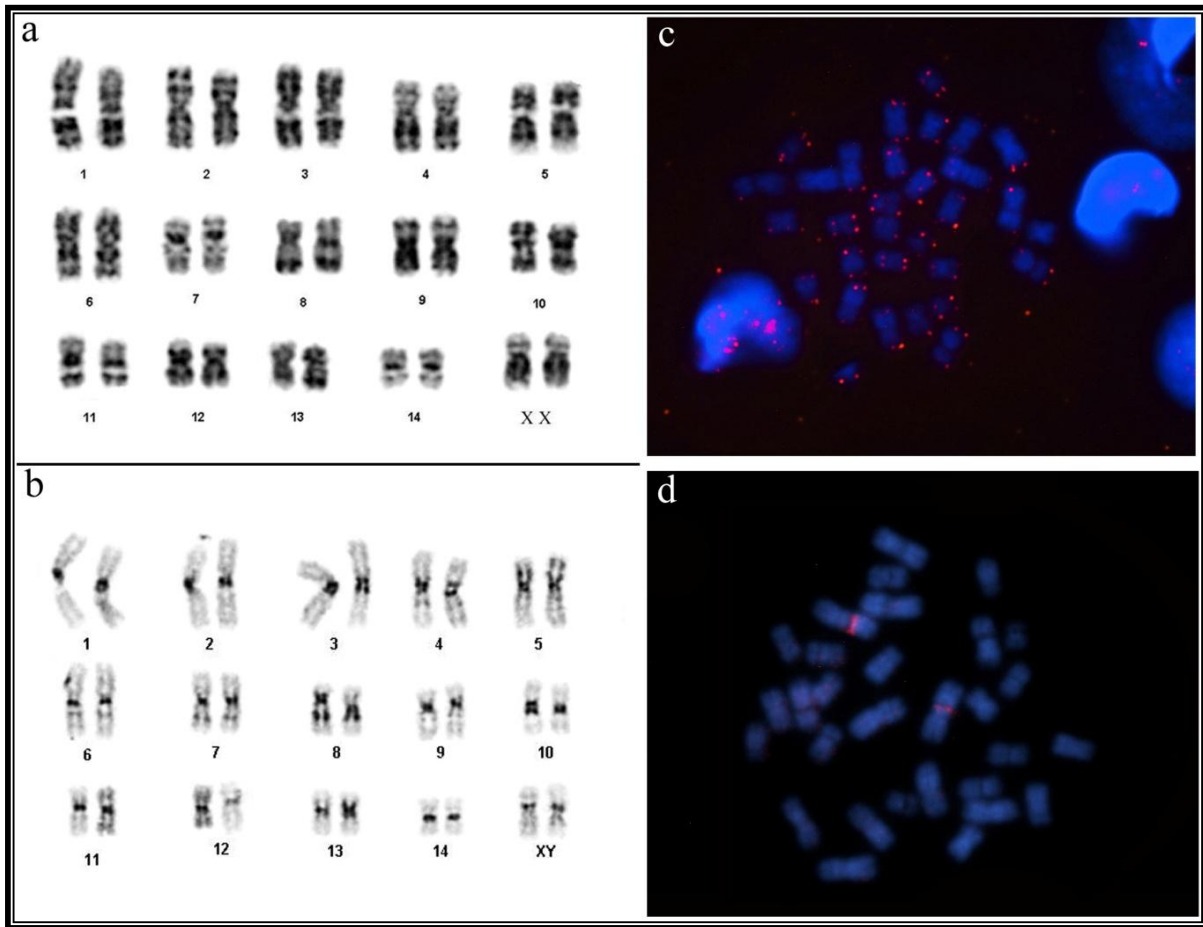
Tribe	Genus	Species	2n	FN	Techniques	References
<b>Phyllostomini</b>	<i>Phyllostomus</i>	<i>P. discolor</i>	32	60	G,C, NOR and FISH	Yonenaga <i>et al.</i> (1969), Patton and Baker (1978), Rodrigues <i>et al.</i> (1998), Rodrigues <i>et al.</i> (2000), Santos <i>et al.</i> (2002)
		<i>P. hastatus</i>	32	58	G,C, NOR and FISH	Yonenaga <i>et al.</i> (1969), Rodrigues <i>et al.</i> (2000)
		<i>P. elongatus</i>	32	58	Con. stain	Baker and Bickham (1980), Santos <i>et al.</i> (2000), Santos <i>et al.</i> (2002), Rodrigues <i>et al.</i> (2003), Pieczarka <i>et al.</i> (2005).
		<i>P. latifolius</i>	32	58	Con. stain	Honeycutt <i>et al.</i> (1980)
	<i>Phylloderma</i>	<i>P. stenops</i>	32	58	NOR and FISH	Baker and Hsu (1970), Baker (1973), Baker (1979), Santos <i>et al.</i> (2002).
	<i>Mimon</i>	<i>M. benettii</i>	30	56	G	Baker <i>et al.</i> (1981b).
		<i>M. crenulatum</i>	32	60		Baker and Hsu (1970), Patton and Baker (1978).
	<i>Tonatia</i>	<i>T. bidens</i>	16	20	NOR and FISH	Santos <i>et al.</i> (2002).
		<i>T. saurophyla</i>	16	20	G, C and NOR	Baker (1970), Tucker and Bickham (1986).
	<i>Lophostoma</i>	<i>L.</i>	34		Con. stain	Baker <i>et al.</i> (2004).
		<i>aequatorialis</i>				
		<i>L. brasiliensis</i>	30	56	G and C	Baker and Hsu (1970), Baker <i>et al.</i> (1982).
		<i>L. carrikeri</i>	26	46	Con. stain	Genoways and Willians (1980), Baker <i>et al.</i> (1981b).
		<i>L. evotis</i>			-	-
<i>L. silviculum</i>		34	60	G and NOR	Genoways and Willians (1980), Tucker and Bickham (1986).	
<b>Macrophyllini</b>	<i>Macrophyllum</i>	<i>M.</i>	32	56	Con. stain	Baker <i>et al.</i> (1982)
		<i>macrophyllum</i>				
	<i>Trachops</i>	<i>T. cirrhosus</i>	30	56	G,C, NOR and FISH	Baker (1979), Santos <i>et al.</i> (2002), Barros <i>et al.</i> (2009).
	<b>Vampyrini</b>	<i>Vampyrum</i>	<i>V. spectrum</i>	30	56	Con. stain
<i>Chrotopterus</i>		<i>C. auritus</i>	28	52	G,C and NOR	Yonenaga <i>et al.</i> (1969), Morielle-Versute <i>et al.</i> (1992)



**Figure 1.** Map from the regions where the three species were collected. Source: SISCOM/IBAMA. Design: NOGUEIRA KNS (2011).

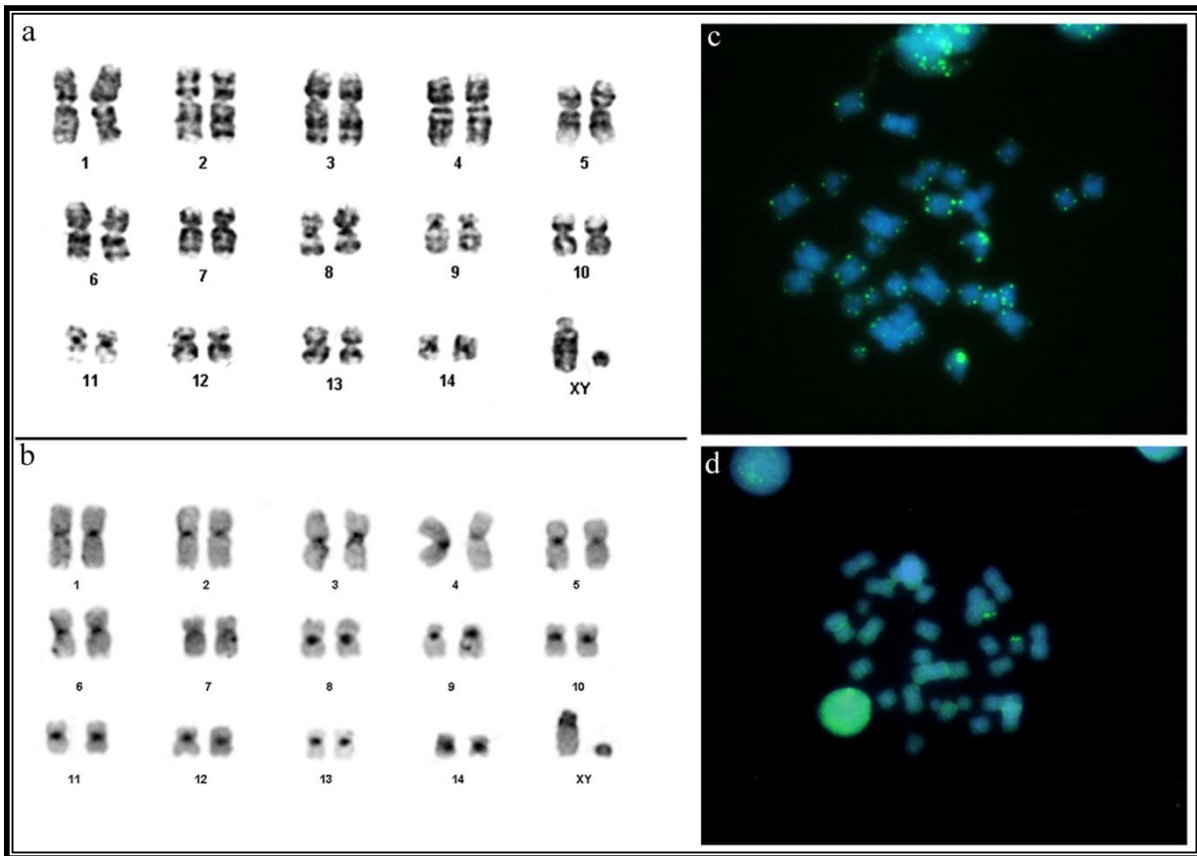


**Figure 2, a-d.** Metaphases of *Chrotopterus auritus*. **a** – G-banding. **b** - C-banding. **c** - FISH using telomeric probes. **d** - FISH using 18S rDNA probes.



**Figure 3, a-d.** Metaphases of *Vampyrum spectrum*. **a** – G-banding. **b** - C-banding. **c** - FISH using telomeric probes. **d** - FISH using 18S rDNA probes.





**Figure 4, a-d.** Metaphases of *Trachops cirrhosus*. **a** – G-banding. **b** - C-banding. **c** - FISH using telomeric probes. **d** - FISH using 18S rDNA probes.

## 5. CONCLUSÕES

1. A análise cromossômica realizada em *Chrotopterus auritus*, *Trachops cirrhosus* e *Vampyrum spectrum* referentes ao número diplóide, morfologia cromossômica e sistema sexual obtidos não apresentam variação quando comparados com representantes de outras regiões geográficas, exceto pela morfologia subtelocêntrica do cromossomo X de *Chrotopterus auritus*, sugerindo uma variação cromossômica ao longo de sua distribuição geográfica.
2. Três cromossomos de dois braços mantiveram-se inalterados em relação ao cariótipo sugerido como primitivo para a família Phyllostomidae nos cariótipos de *T. cirrhosus* e *V. spectrum*. Com relação a *C. auritus*, somente dois pares estão presentes.
3. A análise comparativa utilizando bandeamentos cromossômicos entre elas sugere um extenso grau de diferenciação cromossômica, com poucos cromossomos compartilhados pelas três espécies.
4. Os cariótipos por Bandeamento G de *C. auritus* e *V. spectrum* apresentam mais elementos compartilhados entre si do que quando comparados a *T. cirrhosus*. Estas homeologias cromossômicas são indicadores de ancestralidade comum.
5. Nossos resultados confirmam a associação de *C. auritus* e *V. spectrum* na tribo Vampirini e sugerem a associação de *T. cirrhosus* (Tribo Macrophyllini) com membros da tribo Phyllostomini. Estudos mais abrangentes incluindo espécies pertencentes à tribo Phyllostomini são necessários para esclarecer as relações intergenéricas observadas nesta subfamília.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Investigar por pintura cromossômica (ZOO-FISH) as espécies *Trachops cirrhosus* (tribo Macrophyllini), *Chrotopterus auritus* e *Vampyrum spectrum* (tribo Vampyrini);
- Fazer o mapeamento cromossômico das três espécies utilizando sondas de cromossomos totais de *Carollia brevicauda* e *Phyllostomus hastatus*;
- Ampliar a análise por pintura cromossômica para outros gêneros pertencentes a tribo Phyllostomini (Subfamília Phyllostominae).

## ANEXOS 1

### Fotos das espécies estudadas



a



b



c

Fig. 1: Foto das espécimes de *Chrotopterus auritus* (a), *Trachops cirrhosus* (b) e *Vampyrum spectrum* (c).