



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLÓGICA  
MOLECULAR**

**EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA E MAPEAMENTO GENÔMICO  
COMPARATIVO EM MORCEGOS DA SUBFAMÍLIA PHYLLOSTOMINAE  
(MAMMALIA, CHIROPTERA)**

NATALIA KARINA NASCIMENTO DA SILVA

Orientador: Dr. Julio Cesar Pieczarka

BELÉM - PA  
ABRIL de 2016



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

**EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA E MAPEAMENTO GENÔMICO  
COMPARATIVO EM MORCEGOS DA SUBFAMÍLIA PHYLLOSTOMINAE  
(MAMMALIA, CHIROPTERA)**

NATALIA KARINA NASCIMENTO DA SILVA

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará (UFPA) como requisito para obtenção do grau de Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Julio Cesar Pieczarka.

BELÉM - PA  
ABRIL de 2016

O presente trabalho foi realizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA), sob a orientação do Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka, com auxílio 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

## AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador Dr Júlio Cesar Pieczarka pela oportunidade, orientação, confiança e compreensão que foram fundamentais para o desenvolvimento desse 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> Renata Noronha pela amizade, disponibilidade, e auxílio sempre que necessário.

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, Dona Conceição e Shirley Silva pela manutenção do laboratório

Aos meus companheiros de equipe Bat's: Anderson, Ramon e Tayse, Talita e Jessica 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 nas técnicas e análise dos resultados. Sou muito grata.

Aos colegas do laboratório de Citogenética: Pablo Suarez, Danillo, Patrícia, Karina, Stella, Willan, Marlyson, Vergiana, Bruno, Jessica, 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 e que mesmo distante continua meu doando incondicional apoio em todas as horas.

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.

Ao CNPq pelo financiamento através da bolsa de doutorado, durante o desenvolvimento deste projeto.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
1.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ORDEM CHIROPTERA	1
1.2	ORIGEM E EVOLUÇÃO DA ORDEM CHIROPTERA	3
1.3	FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE	6
1.3.1	<b>Subfamília Phyllostominae</b>	12
1.4	DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA E EVOLUÇÃO NA FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE	16
1.4.1	<b>Subfamília Phyllostominae (<i>sensu</i> Baker et al., 2003)</b>	18
1.5	PINTURA CROMOSSÔMICA	23
1.5.1	<b>Pintura cromossômica em Morcegos</b>	24
2	<b>OBJETIVOS</b>	28
2.1	OBJETIVOS GERAIS	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	<b>RESULTADOS</b>	29
3.1	CAPITULO 1	30
3.2	CAPITULO 2	57
4	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	81
5	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	83
6	<b>ANEXO I: METODOLOGIA DETALHADA</b>	92
7	<b>ANEXO II: ARTIGO MESTRADO</b>	99

## RESUMO

Os morcegos representam um grupo amplamente distribuído e diversificado. A variedade de hábitos alimentares faz da ordem Chiroptera uma das mais bem-sucedidas entre os mamíferos. 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 por citogenética clássica e molecular oito espécies representantes de seis gêneros da subfamília Phyllostominae: *Phylloderma stenops* (2n=32 NF=58), *Lophostoma brasiliense* (2n=30, NF=56), *L. carrikeri* (2n=26, NF=46), *L. schulzi* (2n=28, NF=36) (Tribo Phyllostomini), *Trachops cirrhosus* (2n=30 NF=56) e *Macrophyllum macrophyllum* (2n=34 NF=62) (tribo Macrophyllini) e *Chrotopterus auritus* (2n=28 NF=52) e *Vampyrum spectrum* (2n=30 NF=56) (tribo Vampyrini). Utilizando técnicas de bandeamentos cromossômicos e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNA ribossomal 18S e 45S, sequências teloméricas e sondas cromossomo totais. Descrevemos um novo citótipo para *M. macrophyllum* (2n=34 NF=62) e *L. schulzi* (2n=26, NF=36). Phyllostominae, que constitui um clado diversificado, com relações filogenéticas não resolvidas. Utilizamos pintura cromossômica utilizando sondas cromossomo totais de *Phyllostomus hastatus* e *Carollia brevicauda* para investigar a evolução cariotípica intergenérica na subfamília e construir uma filogenia de caracteres cromossômicos. A análise comparativa entre elas sugere um extenso grau de diferenciação cromossômica, com poucos cromossomos compartilhados entre os seis gêneros. Nossos resultados de pintura cromossômica mostram grande reorganização cromossômica entre os gêneros, em particular para o gênero *Lophostoma* que é caracterizado por grande número de rearranjos diferenciando o cariótipo das espécies que o compõe, demonstrando que rearranjos não-Robertsonianos foram responsáveis pela evolução cromossômica desses genomas quando comparados a condição ancestral.

Palavras chave: Chiroptera, Phyllostominae, FISH, evolução cromossômica, diversidade.



# 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 uma das ordens de maior sucesso de mamíferos do planeta, representando mais de 20% da diversidade de mamíferos vivos (Simmons, 2005). Os quirópteros apresentam-se divididos em dezenove famílias, 202 gêneros e 1120 espécies (Simmons, 2005; Miller-Butterworth et al., 2007, Telling et al., 2012).

Os morcegos estão distribuídos por todo o mundo, ocorrendo 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).

Segundo Jones et al. (2002), a maioria das espécies de morcegos ocorre nos trópicos, sendo raramente encontradas em latitudes maiores do que 50°. Somente algumas famílias 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>.

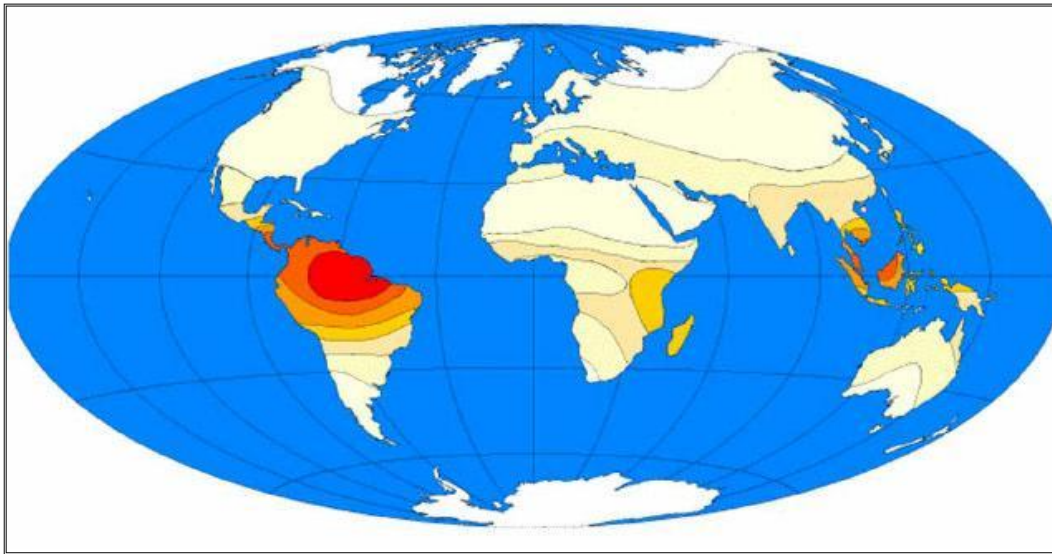


Figura 1. Diversidade de morcegos baseados no número de espécies por 500 Km<sup>2</sup> através do mundo (adaptado de Findley, 1993). Gradientes de cores do branco (ausência de espécies) ao vermelho (120 espécies por 500 Km<sup>2</sup>) com acréscimo de 20.

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). 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).

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. 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, Teeling et al., 2012).

Na ordem Chiroptera é observada uma grande variedade de hábitos alimentares entre as espécies. 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).

A morfologia e o tamanho corpóreo dos quirópteros variam bastante. 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).

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

As dezenove famílias que compreendem a ordem foram tradicionalmente divididas em duas subordens, os Megachiroptera e Microchiroptera (Koopman, 1994; Simmons, 1998; Simmons & Geisler, 1998). Essa divisão foi baseada principalmente de dados morfológicos e paleontológicos (Teeling et al., 2012).

Com o advento das análises baseadas em dados moleculares, essas novas classes de dados não sustentaram as filogenias tradicionais, logo a monofilia de Microchiroptera. Dessa forma, os dados moleculares sugerem a parafilia de Microchiroptera, gerando nova classificação:

Yinpterochiroptera, o qual incluiria as famílias Pteropodidae, Rhinolophidae, Hipposideridae, Megadermatidae, Craseonycteridae e Rhinopomatidae, e Yangochiroptera seria formada pelas superfamílias Noctilinoidea (Mystacinidae, Noctilinoidea, Mormoopidae e Phyllostomidae) e Vespertilionoidea (Vespertilionidae, Natalidae, Furipteridae, Thyropteridae, Myzopodidae e Molossidae), (Telling *et al.* 2000; Telling, 2005, Van Den Bussche & Hooper, 2004; Eick *et al.*, 2005; Miller-Butterworth *et al.*, 2007, Telling *et al.*, 2012) (Figura 02).

Atualmente evidências moleculares consistentes rejeitam o arranjo anterior (Megachiroptera e Microchiroptera) 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 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 *et al.*, 2005, Eick *et al.*, 2005; Miller-Butterworth *et al.*, 2007, Telling *et al.*, 2012).

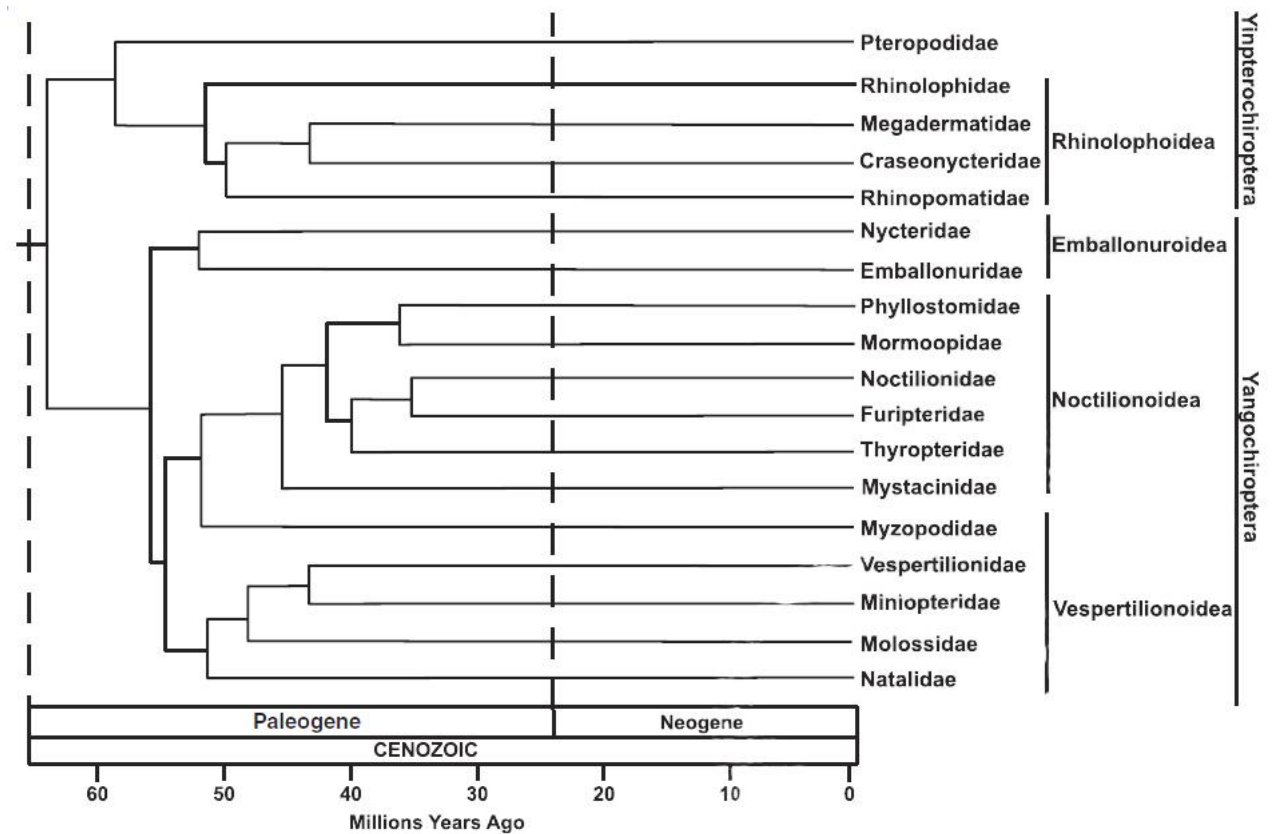


Figura 02: Reconstrução do padrão temporal de diversificação das principais linhagens de morcegos, baseada em análises moleculares, utilizando topologia *Maximum Likelihood*. Retirada de Miller-Butterworth et al,(2007).

### 1.3 FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE

A família Phyllostomidae, pertencente à Infraordem Yangochiroptera, é exclusiva do Novo Mundo, apresentando uma distribuição geográfica que se estende desde o sudeste dos Estados Unidos até o nordeste da Argentina (Hill & Smith, 1986). Constitui a terceira maior família dentro da Ordem Chiroptera em número de espécies. Segundo Simmons (2005), a família possui em torno de 160 espécies distribuídas em 55 gêneros, representando uma das famílias de mamíferos mais ecológica e morfologicamente diversificadas. Entre as representantes neotropicais, a família Phyllostomidae é a mais numerosa.

O grande sucesso das radiações adaptativas conquistadas por essa família diz respeito à diversidade de nichos ecológicos e a ampla variedade de hábitos alimentares a que eles podem estar associados, 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 (Wetterer et al. 2000; Baker et al, 2003, Baker et al, 2012).

Os morcegos filostomíneos formam um clado monofilético, apoiado por várias classes de dados (Koopman, 1993; Wetterer et al. 2000; Jones et al., 2002; Simmons et al. 2005; Baker et al. 2003; Datzmann *et al.*, 2010; Rojas *et al.* 2011; Baker et al., 2012). Contudo a grande diversidade de características morfológicas, acompanhada de uma rápida radiação ecológica que os morcegos filostomídeos, têm 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. 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 (Forman et al. 1967; Smith, 1972; Koopman, 1993; Wetterer et al. 2000; Baker et al, 2003).

Atualmente duas delas são as mais aceitas e conflitantes. A primeira proposta por Wetterer et al. (2000), foi baseada em dados morfológicos, moleculares, imunológicos e cromossomos sexuais, onde são reconhecidas 7 subfamílias, com 53 gêneros e 141 espécies. 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 (Figura 3). Embora esse estudo tenha sido gerado a partir de uma grande classe de dados, manteve-se limitado pela falta de resolução para as os pontos de ramificação mais profundos dentro da família (Baker et al. 2003, Baker et al, 2012, Dávalos et al, 2012).

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). Os resultados desta análise foram bastante diferenciados de todas as propostas baseadas em dados morfológicos sugeridas até então. 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 (Figura 4). Essa classificação é reconhecida como a mais completa e atualizada, e vem sendo utilizada como “filogenia de referência” para recentes estudos de evolução das estratégias de alimentação presentes no grupo. No presente trabalho seguiremos a filogenia de Baker et al. (2003).

Até agora, as tentativas de realizar a reconstrução filogenética neste grupo de morcegos proporcionaram resultados que concordam com as hipóteses evolutivas de Baker et al. (2003), com relação a topologia ao nível de subfamília (Datzman et al., 2010; Rojas et al., 2011), contudo as diferenças topológicas tendem a estar presentes para os nós mais mal apoiados e conflitantes nas respectivas árvores (Baker et al., 2003; Datzman et al., 2010; Rojas et al., 2011; Dumont et al., 2011; Baker et al., 2012; Dávalos et al., 2012).

Dados de Datzman et al. (2010) confirmam, como alto apoio (bootstrap maior que 90%), o monofiletismo de todas as subfamílias reconhecidas por Baker et al. (2003). São verificadas três linhagens basais, composto pelas subfamílias Macrochinae, Micronycterinae e Desmodontinae, onde a primeira bifurcação se dá na divisão entre a subfamília Phyllostominae, composta por morcegos de dieta mista (onívoros), seguido dos demais grupos de espécies de dieta vegetal (Figura 05). Ainda assim, segundo Dávalos et al. (2012), mesmo utilizando várias classes de dados necessários para estimar a filogenia do grupo com o menor viés sistemático, aspectos-chave da filogenia dos filostomídeos ainda permanecem incertos.



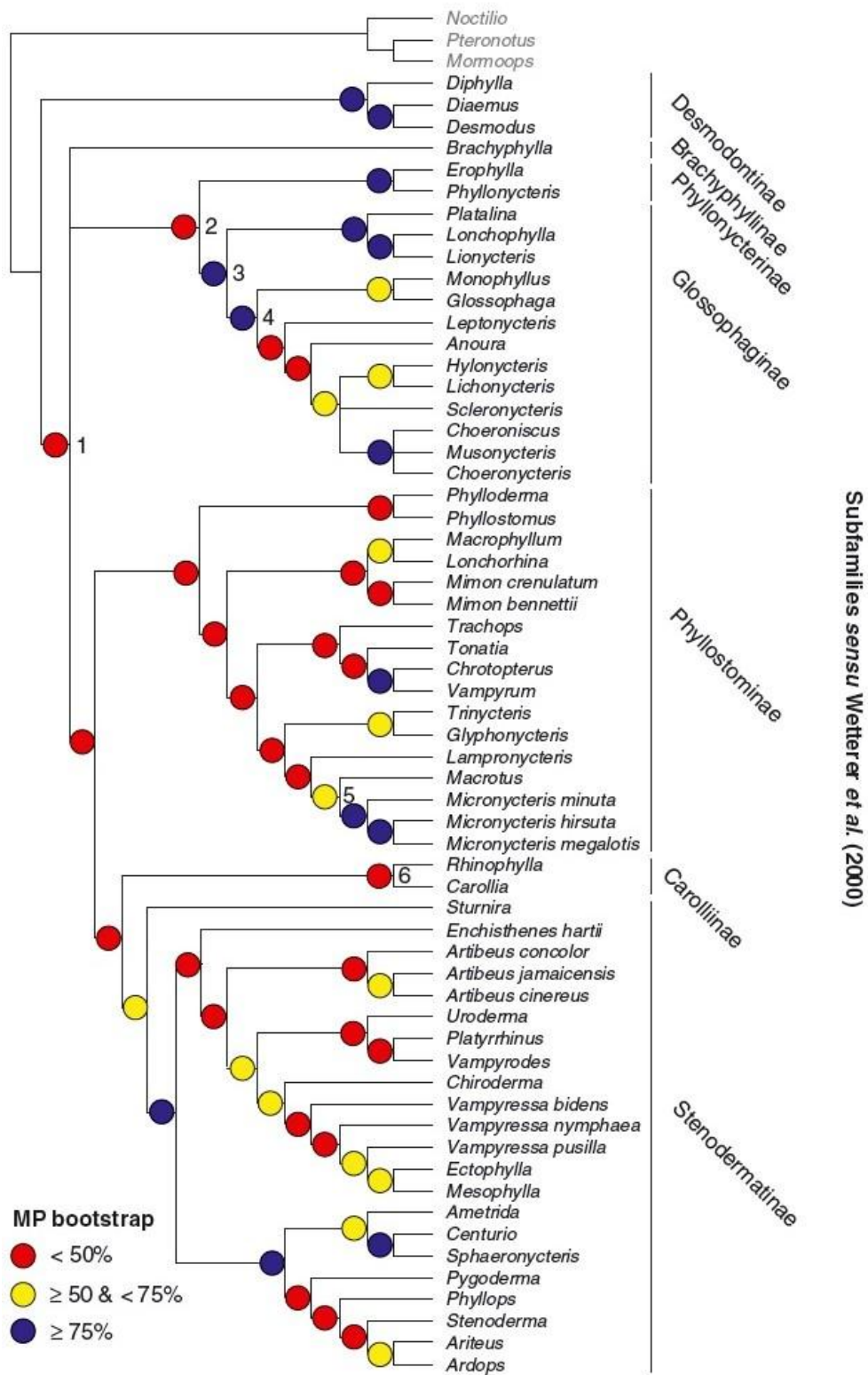


Figura 3: Árvore consenso, proposta por Wetterer et al. (2000) construída a partir da análise de máxima parcimônia. Os circos coloridos indicam valores do *bootstrap*. Retirado de Dávalos et al. (2012).

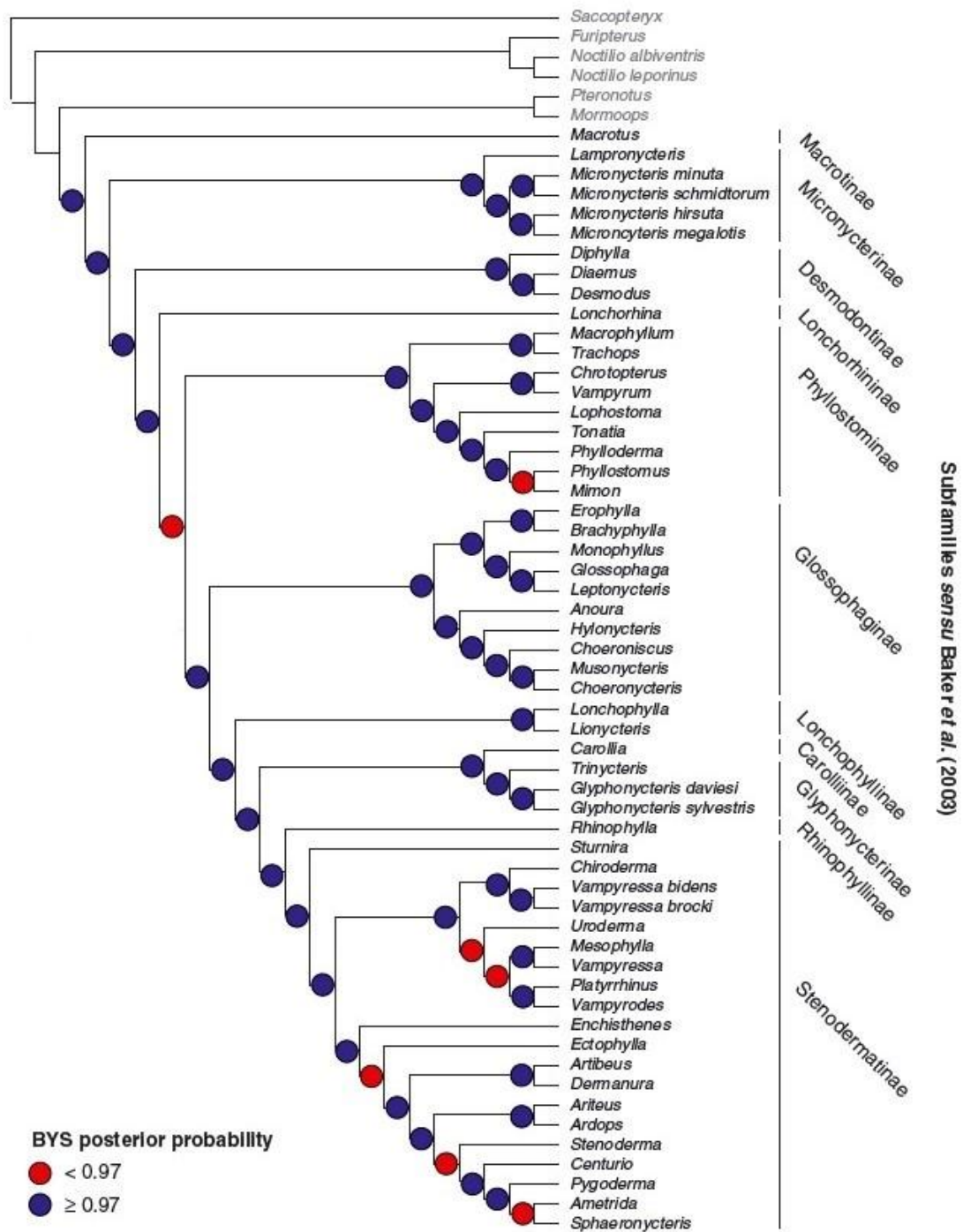


Figura 4: Árvore consenso, através de análise Bayesiana, como proposto por Baker et al. (2003). Retirado de Dávalos et al. (2012).

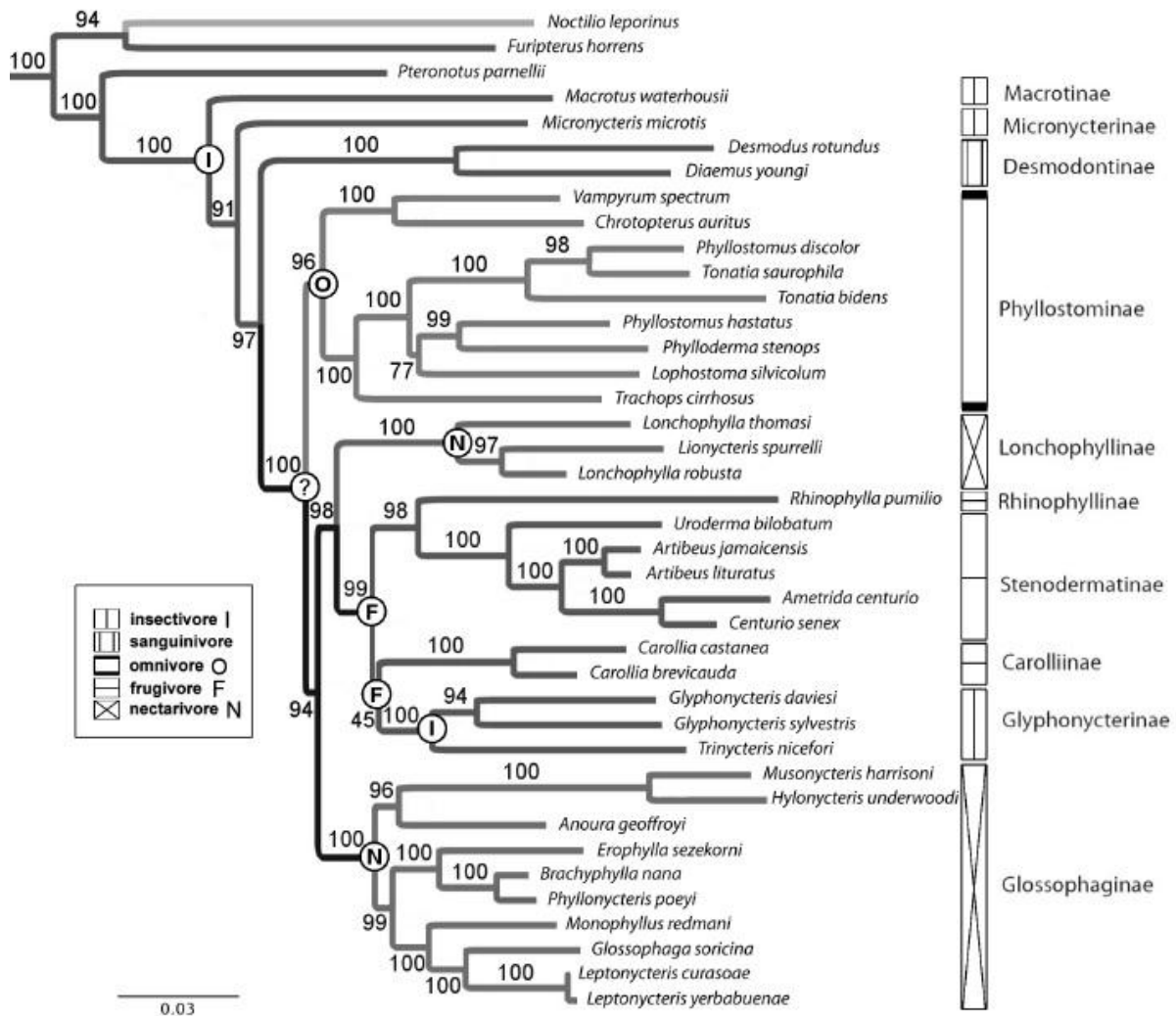


Figura 05: Filogenia proposta por Datzman et al. (2010). Estimativa da Máxima Verossimilhança, a melhor árvore foi demonstrada, descrevendo as relações entre 10 subfamílias de morcegos da família Phyllostomidae e representantes das famílias mais estreitamente relacionadas (Noctilionidae, Furipteridae e Mormoopidae) são mostrados.

### 1.3.1. Subfamília Phyllostominae

A subfamília Phyllostominae constitui um clado diversificado de morcegos, em sua maioria neotropical, com seus membros apresentando uma dieta mista. Uma elevada plasticidade espacial e sazonal é observada (Rex et al., 2010). Alguns filostomíneos são carnívoros, embora haja espécies frugívoras, nectarívoras ou insetívoros (Giannini & Kalko, 2005). As relações filogenéticas entre os gêneros incluídos em Phyllostominae e até mesmo seu posicionamento com relação às outras subfamílias ainda são controversos.

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. Os gêneros *Lonchorhina* e *Macrophyllum* estariam intimamente relacionados, unidos pelo caráter insetivoria.

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 que os gêneros inclusos na subfamília Phyllostominae (*sensu* Wetterer et al., 2000) não representavam um clado monofilético, retirando alguns gêneros e dividindo-os em outras subfamílias: Macroquinae, Micronycterinae, Lonchorhininae e Glyphonycterinae. Dessa forma, a subfamília Phyllostominae (*sensu* Baker et al., 2003) seria constituída de 9 gêneros com 20 espécies, organizados em três tribos: Phyllostomini, composta por *Phyllostomus*, *Tonatia*, *Mimon*, *Phylloderma*, *Lophostoma*; Macrophyllini contendo os gêneros *Trachops* e *Macrophyllum*, sendo esta monofília 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 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. Segundo Baker et al. (2003) as tribos Phyllostomini e Vampyrini formavam um grupo irmão, com Macrophyllini como a primeira divergência dentro da subfamília.

Outro debate 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 7 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*.

Estudos anteriores através de dados de citogenéticos, aloenzimas e distância imunológica (Patton & Baker 1978; Baker & Bickham 1980; Arnold et al., 1983; Honeycutt & Sarich 1987) já mostravam a divergência de *T. bidens* que foi confirmado por Lee et al. (2002). Neste estudo eles avaliaram o relacionamento entre todos os representantes da subfamília Phyllostominae e seus dados forneceram pouco apoio para as relações entre as três tribos sugeridas por Baker et al. (2003), mas claramente demonstram duas linhagens bem definidas, uma contendo *Trachops*, *Macrophyllum*, *T. bidens* e *T. saurophila* e a outra *Phylloderma*, *Phyllostomus*, *Mimon* e as outras cinco espécies, agora pertencentes ao gênero *Lophostoma*. Em seus dados, sugerem um clado contendo *L. evotis* e *L. silviculum*, que seria irmão de *L. carrikeri*, apoiando a relação entre *L. carrikeri* e *L. silviculum* já sugeridos por estudos enzimáticos (Arnold et al., 1983), onde *L. schulzi* seria a linhagem mais basal dentro do clado contendo as cinco espécies do gênero *Lophostoma* (Arnold et al., 1983; Lee et al., 2002).

Atualmente o gênero *Lophostoma* inclui oito espécies, das quais quatro ocorrem no Brasil (Reis et al., 2006). A espécie mais nova descrita foi *L. kalkoae* (Velasco & Gardner,

2012). Os arranjos sugeridos para as espécies pertencentes ao gênero também são conflitantes (Lee et al., 2002; Porter et al., 2003, Baker et al., 2004; Hoffmann et al., 2008; Velasco & Cadenillas, 2011).

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. Contudo as relações entre as três tribos não foram fortemente apoiadas (*bootstrap* menores que 60%), observando-se uma diferença topológica com relação à diferenciação entre as tribos, quando comparada a filogenia proposta por Baker et al., 2003 (Figura 6). Outras incongruências com relação à filogenia de Baker et al. (2003) com relação ao posicionamento das três tribos são observadas (Datzmann et al., 2010; Rojas et al., 2011).

Ainda que, através dos dados morfológicos, imunológicos e moleculares, embora nem sempre congruentes, busque-se interpretar a evolução dentro de Phyllostominae, ela é dificultada, segundo Hoffmann et al. (2008), do ponto de vista da análise molecular pois os genes utilizados no estudo evoluem muito lentamente para resolver os nós da base de Phyllostominae, ou como sugerido por Lee et al. (2002), pela diversificação que avançou rapidamente entre os membros desta subfamília, produzindo um conjunto de morcegos no qual algumas espécies mantêm morfotipos primitivos, enquanto outros tem caracteres altamente derivados.

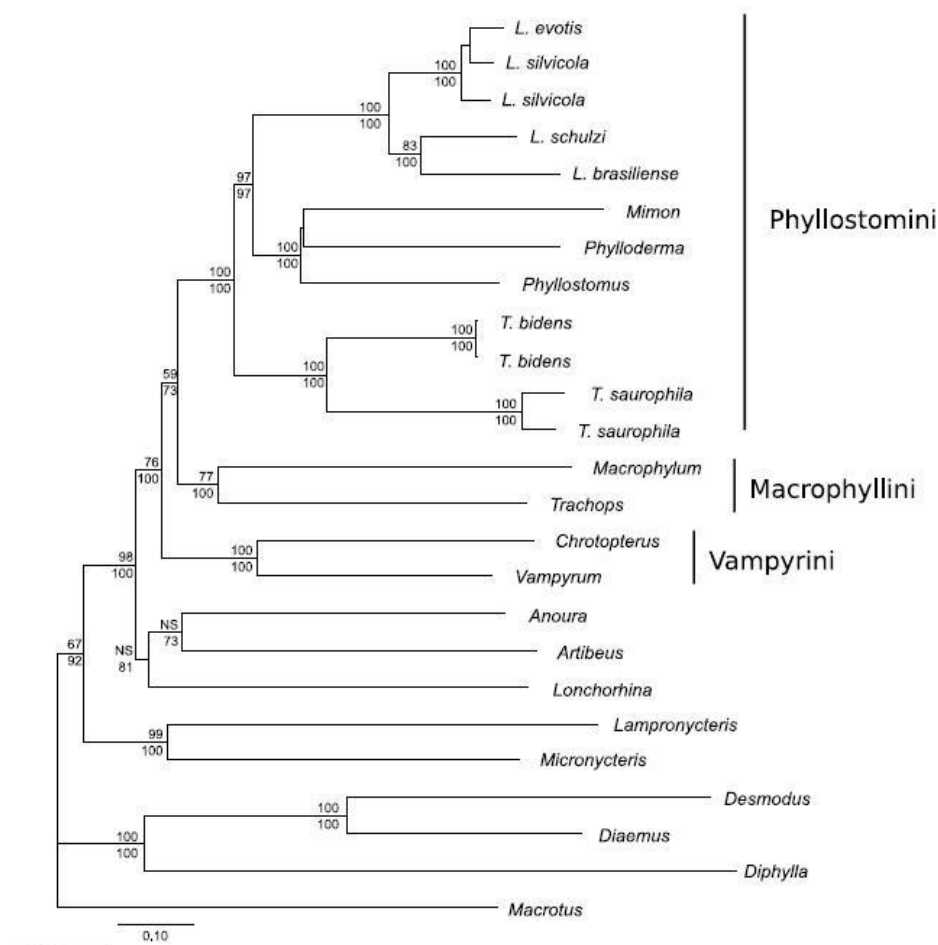


Figura 06: Filogenia proposta por Hoffmann et al. (2008) baseada em máxima parcimônia, descrevendo as relações entre os gêneros de morcegos da subfamília Phyllostominae. Os números acima das linhas indicam os valores de *bootstrap*, os números abaixo indicam valores de probabilidade Bayesiana. As barras verticais indicam a relação a nível tribal dos gêneros na subfamília Phyllostominae.

#### 1.4. DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA E EVOLUÇÃO NA FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE

Como mostrado, nem estudos baseados em análises morfológicas (Wetterer *et al.* 2000; Jones *et al.*, 2002), nem em dados de sequência de DNA nuclear ou mitocondrial (Baker *et al.* 2003; Hoffmann *et al.* 2008; Datzmann *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2011) conseguiram esclarecer as relações entre os morcegos pertencentes da subfamília Phyllostominae onde, apesar do avanços fornecidos por estes estudos, os dados geram pouco apoio para as relações entre as três tribos que contituem essa subfamília, permanecendo sem solução. Neste sentido a utilização dos dados citogenéticos constitui uma ferramenta importante e alternativa para auxiliar na compreensão das relações filogenéticas entre os morcegos da família Phyllostomidae, já que os rearranjos cromossômicos apresentam uma ocorrência rara no genoma e teriam grande valor como marcadores filogenéticos e na caracterização taxonômica (Rokas e Holland, 2000).

A diversidade cromossômica dentro da família Phyllostomidae tem sido tema de interesse nos últimos 50 anos de estudos, e esse fato se reflete na rica literatura sobre a citogenética destas espécies. 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. Dados referentes aos números diplóides ( $2n$ ), fundamentais (NF), a morfologia cromossômica e o sistema de determinação sexual foram gerados para diversas espécies (Baker, 1967; Yonenaga *et al.*, 1969; Baker, 1970).

O início da década de 70 representa o advento das técnicas de bandeamento Q, G e R que geram um padrão de bandas longitudinais, sendo possível 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 foram importantes na análise de regiões cromossômicas específicas, respectivamente, heterocromatina constitutiva (HC) e regiões organizadoras de nucléolos (NORs).

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; Gomes et al., 2010; 2012), Glossophaginae (Haiduk & Baker, 1982; Ribeiro et al., 2003) e Stenodermatinae (Souza & Araújo, 1990; Silva et al., 2005; Pieczarka et al., 2013).

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.

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, com cariótipos altamente

rearranjados enquanto outras apresentam uma taxa mais lenta de evolução, com cariótipos com poucos rearranjos, que eles chamaram de megaevolução cariotípica e conservacionismo cromossômico, respectivamente.

Apesar do conservacionismo cromossômico apresentado em alguns gêneros, como *Artibeus*, 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* (Baker, 1979; Baker & Bickham, 1980; Baker et al., 1982; Pieczarka et al., 2013). Outros gêneros que apresentam uma alta taxa de diversificação cromossômica são *Tonatia* ( $2N = 16$ ), *Micronycteris* (Ribas et al., 2013), e algumas espécies do gênero *Lophostoma* ( $2N = 26, 28, 30$  e  $34$ ; Patton & Baker, 1978; Baker, 1979; Baker & Bass, 1979, Baker & Bickham, 1980; Baker et al., 1982).

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

Para a subfamília Phyllostominae, constituída de 9 gêneros e 20 espécies, organizados em três tribos, todos os gêneros apresentam dados cariotípicos descritos na literatura. Os estudos citogenéticos mostram diferentes taxas de evolução cromossômica entre seus gêneros, onde a maioria as espécies apresentam grande similaridade de cromossomos inteiros ou braços cromossômicos. Contudo, a subfamília também apresenta gêneros com altas taxas de evolução cariotípica, com cariótipos altamente derivados devido a diversos rearranjos cromossômicos (Patton & Baker, 1978; Baker, 1979; Baker & Bass, 1979, Baker & Bickham, 1980; Rodrigues et al., 2000).

A tribo Phyllostomini é constituída pelos gêneros: *Phyllostomus*, *Phylloderma*, *Mimon*, *Lophostoma* e *Tonatia*. O gênero *Phyllostomus* é composto por quatro espécies: *P.*

*discolor*, *P. hastatus*, *P. elongatus* e *P. latifolius*, sendo caracterizado pelo conservacionismo cariotípico, onde quase todas as espécies possuem  $2n = 32$  e  $NF = 58$ , exceto *P. discolor* com  $NF = 60$  (Baker, 1979). Tendo em vista esta variação, Rodrigues et al. (2000) propuseram 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.

O gênero *Lophostoma* é constituído por oito espécies, das quais cinco possuem dados citogenéticos publicados, demonstrando que o grupo apresenta taxas variadas de evolução cariotípica (Baker & Bickham, 1980), onde algumas espécies possuem cariótipos altamente conservados como *L. silviculum* ( $2n=34$ ,  $NF=60$ ; Gardner, 1977; Honeycutt et al., 1980; Ribas et al., 2015) e *L. aequatoriolis* ( $2n=34$ ,  $NF=62$ ; Baker et al., 2004; Sotero- Caio et al., 2015). O gênero também apresenta espécies com cariótipos altamente rearranjados, evidenciando processos de megaevolução cariotípica: *L. brasiliense* ( $2n=30$ ,  $NF=56$ ; Baker & Hsu, 1970; Baker, 1973, 1979, Baker et al., 1982), *L. carrikeri* ( $2n=26$ ,  $NF=46$ ; Gardner, 1977; Baker et al., 1981) e *L. schulzi* ( $2n=28$ ,  $NF=36$ ; Honeycutt et al. 1980; Baker et al., 1981, 1982). Baker et al. (1982), analisando a espécie *L. schulzi*, encontraram um cariótipo tão derivado que nenhum dos braços cromossômicos propostos como primitivos para a família foi identificado, sugerindo que processos de rearranjos não Robertsonianos estariam envolvidos na diferenciação desses cariótipos. Além disso, os cariótipos apresentados, em sua maioria, são de coloração convencional, impedindo comparações que poderiam fornecer informações sobre os tipos de rearranjos cromossômicos que os distinguem.

O gênero *Tonatia* inclui as espécies *T. bidens* e *T. saurophila*. Estudos cariotípicos neste gênero revelaram inúmeros rearranjos, com cariótipos altamente diferenciados das outras

espécies da subfamília e do cariótipo sugerido como primitivo para Phyllostomidae (Patton & Baker, 1978; Baker & Bickham, 1980; Ribas et al., 2015; Sotero- Caio et al. 2015).

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). *Trachops cirrhosus* possui  $2n = 30$  e  $NF = 56$  com todos os autossomos de dois braços, o cromossomo X subtelocêntrico e o Y acrocêntrico (Baker & Hsu, 1970; Baker, 1979; 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 identificaram 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. Contudo, entre a maioria dos 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 *Chrotopterus* e *Vampyrum*, observa-se que *Chrotopterus auritus* apresenta  $2n = 28$  e  $NF = 52$  (Toledo, 1973; Patton & Baker, 1978). Segundo Morielle-Versute et al. (1992), *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). Silva (2011), realizou uma análise comparativa por bandeamento G e FISH entre as espécies *C. auritus*, *V. spectrum* e *T. cirrhosus* identificando um extenso grau de diferenciação cromossômica entre elas, com poucos cromossomos compartilhados entre os três gêneros. *C. auritus* e *V. spectrum* apresentam mais elementos compartilhados entre si do que em relação a *T. cirrhosus*.

Tabela 1: Estudos citogenéticos nas subfamílias Phyllostominae

Subfamília	Phyllostominae					
Tribo	Gênero	Espécies	2n	NF	Estudos	Referências
Phyllostomini	<i>Phyllostomus</i>	<i>P. discolor</i>	32	60	G, C, NOR e FISH	Yonenaga <i>et al.</i> (1969), Patton e Baker (1978), Rodrigues <i>et al.</i> (1998), Rodrigues <i>et al.</i> (2000), Santos <i>et al.</i> (2002), Ribas <i>et al.</i> , 2015.
		<i>P. hastatus</i>	32	58	G, C, NOR e FISH	Yonenaga <i>et al.</i> (1969), Rodrigues <i>et al.</i> (2000), Pieczarka <i>et al.</i> (2005).
		<i>P. elongatus</i>	32	58	Col. conv.	Baker e Bickham (1980), Santos <i>et al.</i> (2000), Santos <i>et al.</i> (2002), Rodrigues <i>et al.</i> (2003).
		<i>P. latifolius</i>	32	58	Col. conv	Honeycutt <i>et al.</i> (1980).
	<i>Phylloderma</i>	<i>P. stenops</i>	32	58	NOR e FISH	Baker e 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 e Hsu (1970), Patton e Baker (1978).
	<i>Tonatia</i>	<i>T. bidens</i>	16	20	NOR e FISH	Santos <i>et al.</i> (2002).
		<i>T. saurophyla</i>	16	20	G, C e NOR	Baker (1970), Tucker e Bickham (1986), Ribas <i>et al.</i> , 2015.
	<i>Lophostoma</i>	<i>L. aequatorialis</i>	34	62	Col. conv	Baker <i>et al.</i> (2004), Sotero-Caio <i>et al.</i> , 2015
		<i>L. brasiliensis</i>	30	56	G e C	Baker e Hsu (1970), Baker <i>et al.</i> (1982).
		<i>L. carrikeri</i>	26	46	Col. conv	Genoways e Willians (1980), Baker <i>et al.</i> (1981b).
		<i>L. evotis</i>	-	-	-	-
		<i>L. silviculum</i>	34	60	G e NOR	Genoways e Willians (1980), Tucker e Bickham (1986).
		<i>L. schulzi</i>	28	36	Col. conv.	Genoways e Willians (1980), Baker <i>et al.</i> (1982).
	<i>L. yasuni</i>	-	-	-	-	
Macrophyllini	<i>Macrophyllum</i>	<i>M. macrophyllum</i>	32	56	Col. conv.	Baker <i>et al.</i> (1982)
		<i>T. cirrhosus</i>	30	56	G, C, NOR e FISH	Baker (1979), Santos <i>et al.</i> (2002), Barros <i>et al.</i> (2009).
Vampyrini	<i>Vampyrum</i>	<i>V. spectrum</i>	30	56	Col. cov.	Baker e Hsu (1970), Baker (1973), Baker (1979).
	<i>Chrotopterus</i>	<i>C. auritus</i>	28	52	G, C e NOR	Yonenaga <i>et al.</i> (1969) e Morielle-Versute <i>et al.</i> (1992)

## 1.5 PINTURA CROMOSSÔMICA

Estudos citogenéticos comparativos configuram-se como uma importante ferramenta para caracterização da história evolutiva das linhagens existentes. As análises tradicionais, como os métodos de bandeamentos cromossômicos demonstram ser limitadas quando os cariótipos compreendem cromossomos altamente reorganizados, sendo a comparação de bandas praticamente impossível devido à dificuldade de se estabelecer verdadeiras homeologias entre os braços cromossômicos (O'Brien *et al.*, 1999; Al *et al.*, 2007).

Com os procedimentos de pintura cromossômica (hibridização *in situ* fluorescente ou FISH), os cromossomos individuais de uma determinada espécie podem ser isolados e utilizados como sondas. As sondas de DNA podem ser obtidas a partir de técnicas de citometria de fluxo, que permite separar e purificar cromossomos segundo a sua composição de pares de bases, após serem corados com um ou mais corantes fluorescentes (Ferguson - Smith *et al.* 1998; Rocha, 2002). As sondas cromossomo-específicas são utilizadas em experimentos de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), que poderão ser úteis para a reconstrução filogenética e mapeamentos comparativos.

A pintura cromossômica entre espécies, quando uma sonda cromossomo-específica de uma dada espécie é hibridizada *in situ* nos cromossomos de outra espécie (ZOO-FISH), permite a caracterização de regiões cromossômicas conservadas, que podem ser cromossomos inteiros, blocos ou partes de um ou mais cromossomos, indicando que rearranjos inter e intracromossômicos ocorreram durante a divergência das duas espécies.

Contudo, não é possível identificar por pintura cromossômica a maioria dos rearranjos intracromossômicos, sem o uso adicional dos dados de bandeamento cromossômico. Sendo assim, o padrão de bandas gerado pelo bandeamento G é utilizado em conjunto à técnica de pintura cromossômica, permitindo a identificação dos rearranjos

internos ocorridos entre os cromossomos analisados (Chaves et al., 2002, Ventura, 2009). Essa variação da técnica de FISH, atrelada aos dados de bandeamentos cromossômicos, são de fundamental importância para elucidar os tipos de rearranjos intra-específicos e interespecíficos que ocorreram ao longo da evolução de um determinado grupo taxonômico.

### **1.5.1 Pintura cromossômica em Morcegos**

Os trabalhos envolvendo pintura cromossômica em morcegos utilizando sondas de cromossomos totais de outras espécies (ZOO-FISH) foram inicialmente realizados por Volleth et al. (1999), utilizando sondas cromossômicas humanas, hibridizadas em *Glossophaga soricina* (Phyllostomidae), encontrando 41 segmentos cromossômicos conservados. Posteriormente, Volleth et al. (2002) hibridizam as sondas cromossômicas humanas em representantes de cinco famílias de morcegos da ordem Chiroptera: Vespertilionidae, Rhinolophidae, Hipposideridae, Molossidae e Pteropodidae. Como resultado encontraram sinapomorfias que unem o grupo, dando apoio à monofilia da ordem.

Ao et al. (2006), utilizando sondas cromossomo-específicas de *Myotis myotis* ( $2n=44$ ), construíram um mapa comparativo entre esta espécie e seis outras de vespertilionídeos da China, mostrando que as translocações Robertsonianas foram o principal evento que gerou a variação cariotípica nesta família. Trabalhos posteriores confirmam que esse tipo de rearranjo é o predominante na evolução cromossômica dentro da Ordem Chiroptera (Ao et al., 2007; Eick et al., 2007; Mao et al., 2008; Richards et al., 2010; Kulemzima et al., 2011; Volleth et al., 2011; Volleth & Eick, 2012).

Mao et al. (2007) produziram sondas de cromossomos totais de *Aselliscus stoliczkanus*  $2n=30$  (Hipposideridae), gerando um mapa comparativo entre dez espécies de morcegos provenientes de quatro famílias: Rhinolophidae, Hipposideridae, Pteropodidae e



Vespertilionidae ampliando o número de famílias dentro da ordem analisadas por pintura cromossômica. Assim como no estudo de Ao et al. (2006), os resultados indicam que as translocações Robertsonianas, em diferentes combinações, foram o principal evento que gerou a diferenciação entre os cariótipos destas espécies de morcegos.

Pieczarka et al. (2005) produziram as primeiras sondas de cromossomos totais derivadas de espécies de morcegos pertencentes a família Phyllostomidae, realizando a pintura cromossômica recíproca entre as duas espécies *Phyllostomus hastatus* (Phyllostominae) e *Carollia brevicauda* (Carollinae) encontrando, respectivamente, 24 e 26 segmentos cromossômicos conservados. Eles sugerem também que diversos rearranjos cromossômicos ocorreram durante o processo de diferenciação dos dois gêneros, com posterior estabilidade cromossômica intragenérica.

Sotero-Caio et al. (2011), analisaram a diferenciação cariotípica entre as três espécies de morcegos pertencentes a subfamília Desmodontinae, utilizando sondas cromossomos totais de *P. hastatus* (Phyllostominae) e *C. brevicauda* (Carollinae) (Pieczarka et al., 2005). Seus resultados sugeriram um alto grau de conservação cromossômica dentro do grupo, identificando sinapormórfias cromossômicas para os morcegos hematófagos e uma maior homologia cromossômica entre Desmodontinae e *P. hastatus* (Phyllostominae). As comparações cariotípicas geradas entre as cinco espécies fornecem informações para construção de futuras análises de evolução cromossômica.

Pieczarka et al. (2013) realizaram uma análise comparativa por pintura cromossômica e bandeamentos cromossômicos entre três espécies de morcegos pertencentes aos gêneros *Uroderma* e *Artibeus* (Stenodermatinae), utilizando sondas cromossomos totais de *P. hastatus* (Phyllostominae) e *C. brevicauda* (Carollinae) (Pieczarka et al., 2005), identificando os rearranjos cromossômicos que geraram a diferenciação cariotípica observada nesta subfamília e juntamente com os dados da

subfamília Desmodontinae (Sotero-Caio et al., 2011), sugerem um cariótipo  $2n=42$ ,  $NF=60$ , como ancestral para estas subfamílias. Contudo, afirmam que mais estudos são necessários para confirmar ou refutar esta hipótese.

Sotero-Caio et al. (2013) produziram o segundo conjunto de sondas cromossomos totais de morcegos da família Phyllostomidae (*Macrotus californicus*  $2n=40$ ,  $NF=60$ ). Estas sondas foram utilizadas para analisar três espécies de morcegos nectarívoros, das subfamílias Glossophaginae (Gêneros *Anoura* e *Glossophaga*) e Lonchophyllinae (Gênero *Lonchophylla*). As análises revelaram uma única associação sintênica compartilhada entre as três espécies estudadas, duas assinaturas cromossômicas unindo os gêneros *Anoura* e *Glossophaga* e uma associação sintênica compartilhada entre *Anoura* e *Lonchophylla*. Em suma, os dados por pintura cromossômica demonstram uma grande reorganização cromossômica entre os clados e revelam que alguns rearranjos ocorridos ao longo da evolução cariotípica do grupo observados em *Lonchophylla* também ocorreram em *Anoura*, mas não em *Glossophaga*. Estes resultados confirmam a parafilia do grupo, anteriormente sugerida por dados moleculares (Datzmann et al., 2010).

Ribas et al. (2013) realizaram uma investigação da variação cariotípica encontrada na espécie *Micronycteris hirsuta* (Micronycterinae), descrevendo dois novos cariótipos para *M. hirsuta* ( $2n = 26$  e  $25$ ,  $NF = 32$ ), reforçando a hipótese que *M. hirsuta* não representa um táxon monotípico. Seus resultados, utilizando sondas cromossomos totais de *P. hastatus* (Phyllostominae) e *C. brevicauda* (Carolliinae) (Pieczarka et al., 2005), confirmam a hipótese de megaevolução cariotípica para o gênero *Micronycteris*, visto que todo complemento cariotípico mostra-se derivado em comparação com os outros gêneros analisados no estudo.

Gomes (2014), realizou uma análise comparativa, através de pintura cromossômica, entre oito das onze subfamílias dentro da família Phyllostomidae, buscando estabelecer as

relações de parentesco entre os grupos tanto a nível intragenérico quanto entre os representantes das subfamílias. Como resultado identificou varias autapomorfias para os membros das subfamílias Micronycterinae, Desmondontinae, Carolliinae e Stenodermatinae. Contudo uma maior definição da relação entre a maioria das subfamílias não foi obtida, devido a poucos caracteres sinapomorficos compartilhados entre seus membros. Ainda assim, em seu estudo, foi possível estabelecer a relação filogenética entre as subfamílias Carolliinae e Glyphonycterinae, relação apoiada também a partir de classes de dados moleculares. Correlacionou seus dados com aqueles de representantes de outras famílias dentro da Ordem Chiroptera para propor um cariótipo ancestral com  $2n=46$  e  $NF=60$ .

Recentemente Ribas et al. (2015), em uma análise por pintura cromossômica para três gêneros: *Tonatia saurophila* ( $2n = 16$  e  $NF = 20$ ), *Phyllostomus discolor* ( $2n= 32$   $NF = 60$ ) e *Lophostoma silviculum* ( $2n = 34$  e  $NF = 60$ ), construíram uma filogênia baseada em dados cromossômicos para a tribo Phyllostomini, confirmam a megaevolução cariotípica para o gênero *Tonatia*, geram apoio adicional a parafilia em relação ao gênero *Lophostoma* como mostrado por topologia moleculares.

Filogenias cromossômicas têm sido utilizadas com sucesso na reconstrução da evolução cariotípica dentro de Phyllostomidae (Sotero-Caio et al., 2011, 2013; Pieczarka et al., 2013; Ribas et al., 2013; Ribas et al., 2015). Considerando a importância das análises citogenéticas e a utilidade dos caracteres cromossômicos caracterizamos através de técnicas de citogenética clássica e pintura cromossômica espécies das subfamílias Phyllostominae. A Zoo-FISH, atrelada aos dados de bandeamentos cromossômicos, são importantes para elucidar os tipos de rearranjos intra-específicos e interespecíficos envolvidos no processo de diferenciação cromossômica que ocorreu ao longo da evolução deste grupo, constituindo uma importante abordagem que será utilizada em uma perspectiva evolutiva.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

- Determinar os processos de evolução cromossômica ocorridos entre as espécies pertencentes às subfamílias Phyllostominae. Utilizar esses dados citogenéticos como caracteres cromossômicos, para determinar as relações evolutivas, através de uma reconstrução filogenética utilizando uma abordagem cladística.

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Caracterizar citogeneticamente as espécies através das técnicas de bandeamento G, C e Ag-NOR;
- Localizar as seqüências teloméricas e sítios de DNA ribossomal 18S e 28S através da técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente;
- Utilizar sondas de cromossomos totais de *Carollia brevicauda* e *Phyllostomus hastatus* em experimentos de pintura cromossômica;
- Detectar os mecanismos de evolução cromossômica responsáveis pela diferenciação cariotípica observada entre as espécies;
- Realizar uma análise comparativa interespecífica através dos padrões de bandeamento G e FISH, inferindo sobre a relação de parentesco entre os gêneros pertencentes às subfamílias Phyllostominae;
- Identificar os blocos sintênicos existentes entre essas espécies. Utiliza-los como caracteres para determinar as relações evolutivas e filogenia entre os gêneros e suas respectivas subfamílias;
- Correlacionar nossos dados com os já presentes na literatura.

### 3. RESULTADOS

- **CAPÍTULO 1:** Evolução Cromossômica no Gênero *Lophostoma* (Chiroptera, Phyllostomidae) Revelada por Mapeamento Cromossômico Comparativo.
- **CAPÍTULO 2:** Filogenia cromossômica e Evolução na subfamília Phyllostominae (Chiroptera, Phyllostomidae) inferida por pintura cromossômica.

### 3.1 CAPÍTULO 1

**Título:** Evolução Cromossômica no Gênero *Lophostoma* (Chiroptera, Phyllostomidae)

Revelada por Mapeamento Cromossômico Comparativo.

**Autores:** Natalia Karina Nascimento da Silva<sup>1</sup>; Cleusa Yoshiko Nagamachi<sup>1</sup>; Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues<sup>2</sup>; O'Brien, P.C.M.<sup>3</sup>; Ferguson-Smith, M.A.<sup>3</sup> Julio Cesar Pieczarka<sup>1</sup>

**Instituição:** <sup>1</sup>Laboratório de Citogenética, UFPA-Belém; <sup>2</sup>Laboratório de Genética & Biodiversidade, UFOPA-Santarém.

**Palavras chave:** Phyllostominae, *Lophostoma*, FISH, Pintura cromossômica, evolução cariotípica

**Título curto:** Evolução Cromossômica no Gênero *Lophostoma*

## Resumo

O gênero *Lophostoma* (Phyllostominae) atualmente inclui oito espécies de morcegos neotropicais, constituindo um clado diversificado, com relações filogenéticas não resolvidas. O número diploide varia de  $2n=26$  a  $2n=34$ . Até agora, apenas duas espécies do gênero tiveram seu cariótipo estudado por abordagens citogenéticas moleculares. Aqui nós investigamos a evolução cromossômica de três espécies do gênero: *Lophostoma brasiliense* ( $2n=30$ ), *L. carrikeri* ( $2n=26$ ) e *L. schulzi* ( $2n=26$ ) por bandeamento G e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de rDNA, sequências teloméricas e sondas de cromossomo total derivadas de *Phyllostomus hastatus* e *Carollia brevicauda*. Descrevemos um novo citótipo para *Lophostoma schulzi* ( $2n=26$  NF=36). As sondas mostraram sequências teloméricas intersticiais (ITS) em *L. brasiliense* e *L. carrikeri*, que podem ser resultado de expansões de sequências repetitivas próximo a regiões pericentroméricas. A pintura cromossômica comparativa revelou extensa reorganização cromossômica para a espécie *L. schulzi* quando comparada as demais espécies do gênero. A associação PHA1/PHA6p foi encontrada em *L. brasiliense* e *L. carrikeri*, sugerindo que ela representa uma sinapomorfia para essas duas espécies. Nosso estudo fornece evidências de que rearranjos não- Robertsonianos estão envolvidos no processo de evolução cromossômica de Phyllostominae.

## Introdução

As relações filogenéticas entre os gêneros incluídos em Phyllostominae e até mesmo seu posicionamento com relação às outras subfamílias são controversos pois diferentes conjuntos de dados geram diferentes classificações (Wetterer et al., 2000, Baker et al., 2000, Baker et al. 2003a, Datzmann et al., 2010; Rojas et al., 2011). Phyllostominae (*sensu* Baker et al. 2003a) seria um agrupamento monofilético constituído de 9 gêneros com 20 espécies, organizados em três tribos: Phyllostomini (*Phyllostomus*, *Tonatia*, *Mimon*, *Phylloderma*, *Lophostom*), Macrophyllini (*Trachops*, *Macrophyllum*) e Vampyrini (*Chrotopterus*, *Vampyrum*).

Os morcegos do gênero *Lophostoma* d'Orbigny, 1836 ocorrem desde o sul do México até o centro do Paraguai (Simmons 2005, Williams e Genoways, 2008). Atualmente, esse grupo de morcegos neotropicais incluem oito espécies: *L. brasiliense*, *L. carrikeri*, *L. evotis*, *L. silviculum* (*L. silvícola*), *L. kalkoae*, *L. schulzi*, *L. yasuni* e *L. aequatorialis* (sinônimo júnior de *L. occidentalis*, Velasco e Canellidas 2011; Velasco e Gardner 2012).

Análises de genes nucleares e DNA mitocondrial (mtDNA) confirmam o monofiletismo da tribo Phyllostomini e sugerem 3 linhagens distintas, uma contém os gêneros *Phyllostomus*, *Mimon*, *Phylloderma*, outra *Tonatia* e a terceira com as 8 espécies de *Lophostoma*. Contudo, os arranjos entre elas variam entre as diferentes análises pois os valores de *bootstrap* que sustentam os ramos são muito baixos (Lee et al., 2002; Porter et al., 2003, Baker et al., 2004, Velasco & Cadenillas, 2011), mesmo possuindo um tempo de divergência para cada linhagem genérica relativamente antigo, estimado em 16,5 milhões de anos atrás (MIO) (Hoffmann et al., 2008).

Dados cromossômicos, além de dados morfológicos e moleculares, são uma ferramenta para a compreensão das relações filogenéticas entre grupos de organismos. A



pintura cromossômica entre espécies, atrelada aos dados de bandeamentos cromossômicos, são importantes para elucidar os tipos de rearranjos intra-específicos e interespecíficos envolvidos no processo de diferenciação cromossômica que ocorreu ao longo da evolução dos táxon (Wienberg e Stanyon 1997, Ferguson-Smith et al., 1998, Ferguson-Smith e Trifonov 2007).

Espécies do gênero *Lophostoma* apresentam taxas variadas de evolução cariotípica onde algumas espécies possuem cariótipos altamente conservados como *L. silvicolium* (2n=34, NF=60; Gardner, 1977; Honeycutt et al.,1980, Ribas et al., 2015) e *L. aequatoriolis* (2n=34, NF=62; Baker et al., 2004, Sotero-Caio et al., 2015). Por outro lado, o gênero também apresenta espécies com cariótipos altamente rearranjados evidenciando processos de megaevolução cariotípica: *L. brasiliense* (2n=30, NF=56; Baker & Hsu, 1970; Gardner, 1977 Baker, 1973, 1979, Baker et al.,1982), *L. carrikeri* (2n=26, NF=46; Gardner, 1977; Baker et al.,1981) e *L. schulzi* (2n=28, NF=36; Genoways e Williams, 1980; Honeycutt et al. 1980; Baker et al.,1981). Baker et al. (1982), analisando a espécie *L. schulzi*, encontraram um cariótipo tão derivado que nenhum dos braços cromossômicos propostos como primitivos para a família foi identificado, sugerindo que processos de rearranjos não Robertsonianos estariam envolvidos na diferenciação desses cariótipos. Além disso, os cariótipos apresentados, em sua maioria, são de coloração convencional, impedindo comparações que poderiam fornecer informações sobre os tipos de rearranjos cromossômicos que os distinguem.

Pintura cromossômica tem sido utilizada com sucesso na reconstrução da evolução cariotípica dentro de Phyllostomidae permitindo identificar quais rearranjos ocorreram ao longo da diversificação deste grupo, assim como a proposição de um cariótipo ancestral para a família (Sotero-Caio et al., 2011, 2013, 2015; Pieczarka et al., 2005, 2013; Ribas et al., 2013, 2015).

No presente trabalho os cariótipos de três espécies do gênero *Lophostoma* (*L. schulzi*, *L. brasiliense* e *L. carrikeri*) foram analisados por pintura cromossômica utilizando sondas de cromossomos totais de *Phyllostomus hastatus* e *Carollia brevicauda* (Pieczarka et al., 2005) com o objetivo de investigar a evolução cariotípica em *Lophostoma*, assim como reunir nossos dados aos dados de pintura cromossômica para a família Phyllostomidae publicados anteriormente e propor uma filogenia cromossômica para o gênero *Lophostoma*.

## **Material e Métodos**

### Espécimes analisados

As análises citogenéticas foram realizadas em amostras coletadas no Brasil, sendo quatro espécimes (2M, 2F) de *Lophostoma brasiliense* (2M/1F) provenientes Urucará, (S 02°28'6,3"; W 55°59'37,2") estado Amazonas, um espécime (1F) de *Lophostoma carrikeri* e três espécimes de *Lophostoma schulzi* provenientes de Juruti (S 02 ° 23'12.1";W 57 °38'22,0"), estado do Pará.

Os morcegos foram capturados a partir de populações naturais com o auxílio de redes de neblina. As preparações cromossômicas e biópsias de tecido foram enviadas para o Laboratório de Citogenética da Universidade Federal do Pará, em Belém. Os espécimes foram fixados em formol a 10%, conservados em etanol 70% e depositados na coleção de mamíferos do Museu Paraense Emilio Goeldi.

## Preparações cromossômicas e bandeamentos

As preparações cromossômicas foram obtidas pelo método de extração direta da medula óssea segundo o protocolo descrito por Baker *et al.* (2003b). Os padrões de bandas G foram obtidos utilizando solução de tripsina de acordo com Seabright (1971), com posterior incubação em solução salina (0,5XSSC) a 60° C e coloração com solução de Wright segundo Verma e Babu (1995). O bandejamento C foi realizado segundo Sumner (1972) e a marcação das Regiões Organizadoras de Nucléolos seguiu Howell & Black (1980). Os cariótipos foram organizados em ordem decrescente de tamanho dos cromossomos.

## Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A hibridização *in situ* fluorescente utilizando sondas teloméricas marcadas com digoxigenina (*All Human Telomere – Oncor*) foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para confirmação da posição da NOR, sondas de rDNA 18S e 45S foram amplificadas por BAC (Bacterial Artificial Chromosome), marcadas com dUTP-biotina por nick translation e posteriormente detectadas com avidina-Cy3 ou FITC, de acordo com Hatanaka e Galetti Jr (2004).

Pintura cromossômica usando sondas cromossomos totais de *Carollia brevicauda* e *Phyllostomus hastatus* (Pieczarka *et al.* 2005), amplificadas e marcadas por DOP-PCR (Telenius *et al.* 1992; Yang *et al.* 1995) e hibridizadas seguindo procedimentos previamente descritos (Yang *et al.* 1995; Pieczarka *et al.* 2005). Brevemente, as lâminas foram incubadas com soluções enzimáticas de pepsina, lavadas em solução de 2 X SSC e desidratadas em bateria de álcool (70%, 90% e 100%), posteriormente as lâminas foram envelhecidas em estufa a 65°C por duas horas, desnaturadas em formamida/2 X SSC a

70% por 50 segundos e incubadas em solução de hibridização (14 µl de solução contendo: 50% formamida, 2 X SSC, 10% sulfato de dextram e 1-3 µl do produto da PCR) durante três dias. Após a hibridização e lavagem de estringência, sondas marcadas com biotina foram visualizadas com avidina-Cy3 ou FITC (1 µg/ml; Amersham). As imagens foram capturadas com o auxílio da câmera CCD Zeiss Axiocam controlada pelo software Axiovision 3.0, acoplada a um microscópio Zeiss Axioplan 2. Os cromossomos foram identificados de acordo com sua morfologia e padrões de bandas invertidas usando DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

#### Análise filogenética

Usamos segmentos sintênicos e associações cromossômicas compartilhadas para estabelecer uma matriz de caracteres (tabela 1), que foram codificados com base na presença ou ausência, para ser utilizado na análise de máxima parcimônia no PAUP v.4.0b10 (Swofford,1999). Todos os caracteres foram ponderados com o mesmo peso, baseados na igual probabilidade de ocorrência de rearranjos cromossômicos. Buscou-se a árvore filogenética mais parcimoniosa que foi obtida usando a busca exaustiva. A robustez de cada nó foi avaliada por estimativa de bootstrap de 1000 repetições. Utilizamos *P. hastatus* e *P. discolor* (Pieczarka et al. 2005; Ribas et al., 2015) como grupo-externo e quatro espécies do gênero *Lophostoma* no ingroup, as três espécies estudadas aqui e a inclusão de *L. silviculum* pela integração dos dados de Ribas et al. (2015).

## Resultados

Descrição cariotípica e FISH para *Lophostoma schulzi* (LSC)

Foi observado para *L. schulzi*  $2n=26$   $NF=36$ , compreendendo cromossomos submetacêntricos (par 1, 2 e 9), subtelocêntricos (7 e 8) e 7 pares acrocêntricos (3, 4, 5, 6, 10, 11 e 12). Aparentemente o sistema sexual cromossômico é XX/XY, mas como só obtivemos amostras de fêmeas, esta questão permanece em aberto até que o cariótipo de um macho seja descrito. O cromossomo X apresentara morfologia acrocêntrica (Figura 1a). A partir do bandeamento C foi observada a presença de heterocromatina constitutiva (HC) na região pericentromérica de todos os cromossomos, blocos heterocromáticos C- positivos mais extensos foram observados nos pares 1, 2, 3, 7 e 11 (Figura 2a). A hibridização *in situ* com sondas teloméricas ocorreu somente nos telômeros de todos os cromossomos (Figura 2b). A hibridização *in situ* com sondas de DNA ribossomal 18S confirmou a localização da NOR no par 8. Pintura cromossômica utilizando sondas de *P. hastatus* (PHA) e *C. brevicauda* (CBR) delimitaram 24 e 39 segmentos homólogos no genoma de *Lophostoma schulzi* respectivamente. O número de sinais por par de cromossomos variou de um a cinco.

#### Descrição cariotípica e FISH para *Lophostoma brasiliense* (LBR)

Para *L. brasiliense* foi observado  $2n=30$   $NF=56$ , sendo o complemento autossômico constituído por 10 pares de cromossomos metacêntricos (pares 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14), um par submetacêntricos (par 3) e três pares subtelocêntricos (pares 1, 2 e 10). Aparentemente o sistema sexual cromossômico é XX/XY, mas como só obtivemos amostras de fêmeas, esta questão permanece em aberto até que o cariótipo de um macho seja descrito. O cromossomo X é subtelocêntrico de tamanho médio (Figura 1b). A técnica de bandeamento C demonstrou que a heterocromatina constitutiva está localizada na região pericentromérica de todos os cromossomos autossômicos e sexuais (Figura 2c). A hibridização *in situ* com sondas teloméricas mostrou marcações distais, comuns nos telômeros de todos os cromossomos e a detecção de uma marcação em um sítios não-

teloméricos, presente no par 1 (Figura 2d). FISH com sondas de 18S rDNA mostraram que Região Organizadora de Nucléolos (NOR) está localizada na região distal do braço curto dos pares 2 e 3. Pintura cromossômica utilizando sondas de *P. hastatus* (PHA) e *C. brevicauda* (CBR) delimitaram 17 e 24 segmentos homólogos no genoma de *Lophostoma brasiliense*, respectivamente. O número de sinais por par de cromossomos variou de um a quatro.

#### Descrição cariotípica e FISH para *Lophostoma carrikeri* (LCA)

*L. carrikeri* apresentou número diploide  $2n=26$   $NF=46$ , compreendendo 10 pares de cromossomos metacêntricos (pares 3, 4,5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12), e dois pares subtelocêntricos grandes (pares 1 e 2). Aparentemente o sistema sexual cromossômico é XX/XY, mas como só obtivemos amostras de fêmeas, esta questão permanece em aberto até que o cariótipo de um macho seja descrito. O cromossomo X apresentou morfologia acrocêntrica (Figura 1c). A análise da heterocromatina constitutiva (HC), através do bandeamento C, revelou um padrão pericentromérico de distribuição da HC em todos os autossomos e no X (Figura 2e). A hibridização *in situ* com sondas teloméricas ocorreu nos telômeros e na região pericentromérica em sete pares de cromossomos metacêntricos exibindo fortes sinais co-localizados a blocos heterocromáticos identificados pelo padrão de banda C-positivo (Figura 2f). A hibridização *in situ* com sondas de DNA ribossomal 18S identificou a localização da NOR no braço logo do par 2. Pintura cromossômica utilizando sondas de *P. hastatus* (PHA) e *C. brevicauda* (CBR) delimitaram 19 e 26 segmentos homólogos no genoma de *Lophostoma carrikeri* respectivamente O número de sinais por par de cromossomos variou de um a quatro. Nenhum sinal de hibridização foi

encontrado no braço curto do subtelocêntrico par 2, o qual mostrou ser heterocromático por bandeamento C.

Exemplos dos resultados das hibridizações realizadas nas metáfases das três espécies estudadas são mostrados na Figura 3.

### Análise Filogenética

Uma única árvore foi recuperada pela nossa análise de máxima parcimônia (figura 4). Todas as espécies do gênero *Lophostoma* foram agrupadas em um único ramo, *L. brasiliense* e *L. carrikeri* foram agrupadas como linhagens irmãs, enquanto que *L. silviculum* foi basal para as quatro espécies investigadas aqui. O suporte global da análise foi elevado, com índice de consistência (CI) = 0.9444 e índice de retenção (RI) = 0.8182, confirmando o nível baixo de homoplasia (HI) = 0.0556. Os valores de Bootstrap foram altos (BP=93 e 84).

### Discussão

#### **Diferenças cromossômica em *Lophostoma***

Os dados referentes ao cariótipo dos espécimes de *Lophostoma brasiliense* ( $2n=30$  NF=56) e *Lophostoma carrikeri* ( $2n=26$  NF=46) analisados aqui, estão de acordo com os estudos realizados por Gardner (1977), em exemplares coletados no Peru e para os espécimes coletados no Suriname (Honeycutt *et al.* 1980, Baker *et al.*, 1980, 1982). Descrevemos um novo citótipo para *Lophostoma schulzi*  $2n=26$  (6 SM/ 4ST+ 16 A) para indivíduos coletados em Juruti, Estado do Pará, Brasil (este estudo) que difere do *L. schulzi* citótipo  $2n=28$  (4SM/ 6ST+ 18A), para indivíduos coletados no Suriname (Honeycutt *et al.* 1980, Baker *et al.*, 1981, Genoways e Williams, 1984), que foi estudado apenas por coloração convencional. A análise comparativa entre os cariótipos de *L. schulzi* do

Suriname e do Brasil mostrou que a diferença é devido a um rearranjo do tipo fusão/fissão cêntrica. Variações cromossômicas para populações para esta espécie ainda não haviam sido relatadas, embora já tenham sido registradas para outros filostomídeos (Baker and Lopez, 1970; Baker et al. 1979; Baker et al. 1982; Silva et al.,2005; Gomes et al.,2010, Ribas et al.,2013).

A maioria das espécies de Phyllostomidae apresenta o cromossomo X de dois braços, sendo essa condição considerada basal para a família (Patton e Baker 1978; Baker 1979; Rodrigues et al. 2000). A forma acrocêntrica do X foi relatada apenas para alguns gêneros, como *Mycronycteris* e *Mesophylla* (Baker et al. 1979, Baker e Hsu, 1970, Baker et al., 1973) forma admitida como caráter homoplásico nessas espécies por não serem intimamente relacionadas. Em *Lophostoma* a condição X acrocêntrica é encontrada apenas em *L. carrikeri* e *L. schulzi*, (Honeycutt et al.,1980, Baker et al., 2004, Sotero-Caio et al.,2015, Ribas et al., 2015), sugerindo ser esta forma um caráter sinapomórfico presente do ancestral comum a essas duas linhagens.

#### Distribuição da heterocromatina e sítios teloméricos **em *Lophostoma***

Um padrão pericentromérico de distribuição da heterocromatina constitutiva foi observado em *L. brasiliense*, sendo comumente encontrada em morcegos filostomídeos (Varella-Garcia *et al.*, 1989; Santos e Sousa, 1998; Rodrigues *et al.*, 2000; Barros et al. 2010). Distribuição incomum foi observada no cariótipo de *L. schulzi* e *L. carrikeri* que possuem extensões de heterocromatina, para além da região pericentromérica.

A localização de sequências teloméricas utilizando hibridização *in situ* (FISH) vem sendo identificada em vários grupos de animais (Lee et al., 1993; Fagundes et al., 1997; Pellegrino et al., 1999; Faria et al. 2009), além das marcações distais a presença de sítios teloméricos intersticiais (ITS) são relatados (Meyne et al., 1990; Ventura et al., 2004;



Calixto et al., 2013). Marcações teloméricas foram observadas na extremidade de todos os cromossomos das espécies do gênero *Lophostoma*. Adicionalmente, marcações teloméricas intersticiais (ITS) foram observadas em duas espécies *L. brasiliense* e *L. carrikeri*, onde identificamos fortes sinais co-localizados a blocos heterocromáticos marcados pelo padrão de banda C-positivo, tendo realizado o mapeamento cromossômico para essas espécies, sugerimos que essas sequências estão presentes como componentes do DNA satélite na região centromérica e não como resultado de processos de fusões. Contudo a presença /ausência de grandes blocos de banda C-positivo não está diretamente relacionada com a presença /ausência de sequências teloméricas. Encontramos extensos blocos com bandeamento C positivo no cariótipo de *L. schulzi*, mas nenhuma sequências teloméricas intersticial foi observada nos indivíduos analisados neste estudo, exemplificando a heterogeneidade do DNA repetitivo que compõem as regiões heterocromáticas no genoma de mamíferos (Meyne et al., 1990).

### **Mapeamento cromossômico comparativo para *L. brasiliense*, *L. carrikeri* e *L. schulzi*.**

O mapeamento cromossômico comparativo de *P. hastatus* e *C. brevicauda* para três espécies do gênero *Lophostoma* permitiu estabelecer um mapa de homologia entre o genoma de PHA e CBR e as espécies mapeadas. Uma comparação com as espécies de filostomídeos já mapeadas também foi realizada (Pieczarka et al., 2005, Pieczarka et al., 2013, Ribas et al., 2013; Ribas et al., 2015 Sotero-Caio et al., 2015) demonstrando conservadorismo cariotípico para as espécies *L. brasiliense* e *L. carrikeri* e grande reorganização cromossômica envolvendo o cariótipo de *L. schulzi*, quando comparadas ao cariótipo de PHA. Encontramos um maior número de cromossomos compartilhados entre PHA e LBR do que em relação as outras duas espécies analisadas, pois ambos diferem apenas por três cromossomos, as associações PHA 1/6p =LBR 1, PHA 15/6q =LBR 9 e um

par metacêntrico com expansões de heterocromatina LBR 2 = PHA 5 no cariótipo de *L. brasiliense*. As diferenças relativas aos cariótipos de *L. carrikeri* e PHA são resultado da associação PHA 13p/1/6p =LCA 1, PHA 7/12/14 = LCA=2, PHA 11/15 =LCA 11, as associações identificadas em LCA sugerem que rearranjos do tipo fusão em tandem foram os principais mecanismos que levaram a diversificação desses cariótipos. *L. carrikeri* apresenta expansões de heterocromatina na região pericentroméricas dos maiores metacêntricos, dessa forma a comparação de bandas G não foi clara, no entanto foi realizada pela análise da pintura cromossômica. Para *L. schulzi* confirmamos o elevado grau de diversificação, com todos os braços cromossômicos indistinguíveis quando comparados com cariótipo primitivo para família (Baker et al.,1982). A análise revelou apenas dois pares de cromossomos inteiramente conservados entre PHA e *L. schulzi*, PHA 5=LSC 5 e PHA 8 = LSC 9. O segmento referente ao cromossomo PHA 9 está preservado LSC=8=PHA 9/7p. Outros pares de dois braços presentes em PHA (1,2,3,4,6,7,10,11) encontram-se ou associados a outros pares cromossômicos no cariótipo de LSC e os pares PHA 12, 13,14 e 15 encontram-se associados como resultado de complexas fusões em tandem.

Dados da pintura cromossômica revelaram um pequeno número de segmentos conservados entre *L. brasiliense*, *L. carrikeri* e *L. schulzi*. As três espécies compartilham apenas dois cromossomos inteiros, correspondentes aos pares PHA8 e PHA5, correspondente aos pares LBR 6 e LBR 2, LCA 7 e LCA 6, LSC 9 e LSC 5, respectivamente. Outros segmentos cromossômicos são compartilhados entre as três espécies, mas constituindo outros cromossomos. Encontramos mais formas compartilhadas por LBR e LCA quando comparados a LSC. As espécies LBR e LCA compartilham 9 pares de cromossomos intactos, adicionalmente identificamos a associação PHA 13p/1/PHA6p correspondente ao cromossomo 1 nas duas espécies, esse cromossomo não foi

identificado em nenhuma outra espécie do gênero *Lophostoma*, portanto pode ser utilizado como sinapomorfia para LBR e LCA.

Um cariótipo semelhante ao do gênero *Phyllostomus* ( $2n=32$ ) foi proposto como ancestral para quatro subfamílias de Phyllostomidae (Pieczarka et al., 2013), composto por  $2n=42$  NF 60. É formado por 11 pares de cromossomo de dois braços incluindo o cromossomo X e 10 pares de cromossomos acrocêntricos. Para os pares 11 e 14 de *P. hastatus* que apresentam forma conservada em outras subfamílias e estariam presentes no cariótipo Phyllostomidae ancestral (Pieczarka et al., 2005; Sotero-Caio et al. 2010, Gomes et al., 2012; Pieczarka et al., 2013) encontram-se conservados em *L. brasiliense* pares LBR= 13 e 14 respectivamente, os mesmos encontram-se quebrados e envolvidos em fusões para *L. carrikeri*, pares LCA 2= e LCA=11 e *L. schulzi*, pares LSC =2= LSC= 4 respectivamente. Para os pares de dois braços referidos no cariótipo proposto como basal (Pieczarka et al., 2013), pares PHA 3, 8, 9, 10 encontram-se conservados em LBR e LCA, para LSC estão reorganizados e envolvidos a rearranjos, como translocações e fusões em tandem. O par metacêntrico PHA 6 encontra-se fissionado nas três espécies analisadas. Como sugerido no cariótipo ancestral a forma fissionada dos pares PHA 1, 2, 4 foram encontradas no cariótipo de LCA e LSC, na forma acrocêntrica semelhante ao basal ou reorganizados como produto de rearranjos do tipo translocações Robertsonianas ou fusões em tandem.

Pieczarka et al. (2013) sugerem quatro sinapormofias cromossômicas (pares PHA 1, 2, 4 e 7) para a subfamília Phyllostominae identificadas a partir de *P. hastatus* (tribo Phyllostomini) encontramos esses cromossomos inteiros compartilhados com LBR e LCA. Todos esses pares são encontrados fissionados e reorganizados no cariótipo de LSC. Encontramos um maior número de rearranjos ocorridos na evolução do cariótipo de *L. schulzi* onde a maioria do complemento autossômico é formado por acrocêntricos assim

como o cromossomo X, levando a uma indistinguível comparação por padrões de bandeamento G. Essa reorganização confirma que processos de megaevolução cariotípica (Baker e Bickham, 1980; Baker et al.,1982), onde inversões e fusões em tandem tiveram um papel importante na diferenciação do cariótipo dessa espécie; a maioria parece ser autopomórficas e não foram encontradas nos cariótipos de LBR e LSC examinados aqui e nos outros demais membros da subfamília já mapeados até a data (Pieczarka et al., 2005, Ribas et al.,2015).

Nossos dados para as três espécies foram comparados ao cariótipo de *Lophostoma silviculum* já pintado pelo mesmo conjunto de sondas (Ribas et al. 2015), como sugerido, LSI apresenta grande semelhança a PHA, logo encontramos mais formas conservadas entre *L. silviculum*, *L. brasiliense* e *L. carrikere* quando comparados a *L. schulzi*. Isso demonstra a retenção de formas cariotípicas como presente no cariótipo ancestral (Pieczarka et al., 2013) para essas três espécies e que diferentes tipos de rearranjos cromossômicos ocorreram para produzir as diferenças na organização do cariótipo de *L. schulzi*.

Nossos resultados de pintura cromossômica mostram extensa reorganização cromossômica do gênero *Lophostoma* quando comparadas as cinco espécies de morcegos da subfamília Phyllostominae já mapeadas (Pieczarka et al., 2005; Ribas et al., 2015; Sotero-Caio et al., 2015), demonstrando que rearranjos não-Robertsonianos foram responsáveis pela evolução cromossômica desses genomas quando comparados a condição ancestral (Pieczarka et al., 2013). Diferindo do padrão que parece moldar a variação dos genomas de morcegos (Ao et al. 2006, 2007, Mao et al. 2007, 2008). Como mostrado, apresentam cromossomos envolvidos em rearranjos complexos.

### **Relação Filogenética no gênero *Lophostoma***

Nós aumentamos o número de espécies de morcegos filostomídeos analisados por pintura cromossômica, tendo mapeado o cariótipo de três espécies do gênero *Lophostoma* (*L. brasiliense*, *L. carrikeri* e *L. schulzi*) e integramos nossos dados aos mapas anteriormente publicados para PHA (Pieczarka et al. 2003) LSI e PDI (Ribas et al. 2015), sendo assim possível reconstruir o caminho evolutivo dos rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a evolução desse gênero e inferir relações filogenéticas.

As relações entre as espécies do gênero *Lophostoma* vem sendo testadas por várias classes de dados, como estudos imunológicos (Honeycutt e Sarich, 1987), estudos enzimáticos (Arnold et al., 1983), morfológicos (Wetterer et al., 2000) e mais recentemente, estudos moleculares (Lee et al. 2002; Baker et al., 2004; Hoffmann et al., 2008; Velasco e Cadenillas, 2011) sugerindo vários arranjos para as espécies do gênero. Dados moleculares de Lee et al. (2002) coincidem com estudos enzimáticos (Arnold et al., 1983), sugerindo uma relação entre *L. silviculum* e *L. carrikeri* onde *L. schulzi* seria o mais basal. Já Baker et al. (2004), sugerem estreita relação entre as espécies *L. aequatorialis* e *L. schulzi* baseado em dados morfológicos e moleculares. Para *L. aequatorialis* foi encontrado  $2n=34$  NF=60 (Baker et al. 2004; Sotero- Caio et al.2015) bastante semelhante pelo padrão de bandas a *L. silviculum*  $2n=34$  NF 60, já *L. schulzi* apresenta  $2n=26$  NF 36. A análise cromossômica não sustenta essa relação, tendo em vista que cada uma das espécies exibe diferenças cariotípicas extremas, uma com retenção de caracteres basais e a outra com cariótipo altamente rearranjados, como mostramos aqui.

Foi possível gerar uma filogenia cromossômica por análise cladística dos segmentos sintênicos detectados entre as espécies, que diverge das filogenias obtidas a partir de dados de substituição de nucleotídeos (Lee et al. 2002; Sotero- Caio et al., 2015). De acordo com nossa análise, *L. carrikeri* e *L. brasiliense* formam um clado, sustentado pela sinapomorfia LCA 1= LBR1 referente ao PHA 13p/1/6p. *L. schulzi* é o clado irmão

para eles, enquanto *L. silviculum* seria o mais basal, onde foram retidas as formas cariotípicas similares a condição basal (Pieczarka et al. 2013). Nossos resultados são consistentes com os estudos moleculares de Velasco e Cadenillas (2011), mostramos que rearranjos podem fornecer informações utilizáveis em análises cladísticas.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao grupo de Quiróptera do Laboratório de Citogenética da UFPa pela ajuda no trabalho de campo e preparações cromossômicas; à Sapopema, Conservação Internacional do Brasil, Rio e Aotus Consultoria Ambiental pelo apoio logístico para a coleta das amostras.; Dr. Anderson José Baia Gomes por sugestões a ajuda com a análise filogenética; à Maria da Conceição e Shirley Nascimento por ajuda com o trabalho no laboratório; ao CNPq, FAPESPA, CAPES e BNDES pelo apoio financeiro. A coleta das amostras foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).

### **Referências Bibliográficas**

- 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.
- 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).
- Baker RJ and Lopez G (1970) Chromosomal variation in bats of the genus *Uroderma* (Phyllostomidae). *J Mammal* 51:786- 789.
- 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: 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, Bass RA: Evolutionary relationship of the Brachyphyllinae to Glossophaginae genera *Glossophaga* and *Monophyllus*. Journal of Mammalogy 60: 364-372. (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).

Baker, Robert J.; Genoways, Hugh H.; and Seyfarth, Paisley A., "Results of the Alcoa Foundation-Suriname Expeditions. VI. Additional Chromosomal Data for Bats (Mammalia: Chiroptera) from Suriname" *Mammalogy Papers: University of Nebraska State Museum*. Paper 230. " (1981).

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. Stecial Publications Series - Pymatuning Laboratory of Ecology, Pittsburg, p.303-327. (1982).

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

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 Pappers of Museum Texas Tech University 230: 1–32. (2003a).

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

Baker, R.J., Fonseca, R.M., Parish, D.A., Phillips, C.J. & Hoffmann, F.G. (2004) New bat of the genus *Lophostoma* (Phyllostomidae: Phyllostominae) from Northwestern Ecuador. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University*, 232, 1–16.

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).

Calixto M. S., Andrade I. S., Cabral-de-Mello D. C., Santos N., Martins C., Loreto V., Souza M. J. Patterns of rDNA and telomeric sequences diversification: contribution to repetitive DNA organization in Phyllostomidae bats *Genetica*. (2013)

Datzmann T, von Helversen O, Mayer F Evolution of nectarivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia). *BMC Evol Biol* 10:165(2010).

Faria KC, Marchesin SRC, Moreira PRL, Beguelini MR, Morielle- Versute E New insights into telomeric DNA sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> location in bat chromosomes. *Genet Mol Res* 8(3):1079–1084(2009).

Fagundes, V, Scalzi-Martin JM, Hozier K., 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.

Ferguson-Smith MA, Yang F and O'Brien PCM (1998) Comparative mapping using chromosome sorting and painting. *ILAR J* 39: 68-76.

Genoways, H.H. & Williams, S.L. (1980) Results of the Alcoa Foundation-Suriname Expeditions. I. A new species of bat of the genus *Tonatia* (Mammalia: Phyllostomatidae). *Annals of Carnegie Museum*, 49, 203–211.

Giannini NP e Kalko EKV (2004). Trophic structure in a large assemblage of phyllostomid bats in Panama. *Oikos*. v. 105. Lund: p.209-220.

Gomes AJB, Rodrigues LRR, Rissino JD, Nagamachi CY, Pieczarka JC Biogeographical karyotypic variation of *Rhinophylla fischeriae* (Chiroptera, Phyllostomidae) suggests the occurrence of cryptic species. *Comparative Cytogenetics* 4: 79–85. (2010).

Gomes AJB, Nagamachi CY, Rodrigues LRR, Farias SG, Rissino JD, Pieczarka JC Karyotypic variation in *Rhinophylla pumilio* Peters, 1865 and comparative analysis with representatives of two subfamilies of Phyllostomidae (Chiroptera). *Comp Cytogenet* 6(2):213–225(2012).

Hatanaka, T., Galetti, P.M.Jr Mapping of 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239 – 244 ( 2004).

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).

Hooffmann FG, Hofer 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).

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.

Lee TE, Hofer 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).

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.

Rojas D, Vale A, Ferrero V. e Navarro L. When did plants become important to leaf-nosed bats? Diversification of feeding habits in the family Phyllostomidae *Molecular Ecology* (2011) 20, 2217–2228 (2011).

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).

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.

Velazco, P. M., and R. Cadenillas R. 2011. On the identity of *Lophostoma silvicolium occidentale* (Davis & Carter, 1978) (Chiroptera: Phyllostomidae). *Zootaxa* 2962:1–20.

Williams, S.L. & Genoways, H.H. (2008) Subfamily Phyllostominae Gray, 1825. *In*: Gardner, A.L. (Ed), *Mammals of South America. Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. The University of Chicago Press, Chicago and London, pp. 255–300.

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.

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

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

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.

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).

Pieczarka JC, Gomes AJB, Nagamachi CY, Rocha DCC, Rissino JD, O'Brien PC, et al. A phylogenetic analysis using multidirectional chromosome painting of three species (*Uroderma magnirostrum*, *U. bilobatum* and *Artibeus obscurus*) of subfamily Stenodermatinae (Chiroptera-Phyllostomidae). *Chromosome Res*; 21: 383–92. (2013).

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

Ribas TFA, Rodrigues LRR, Nagamachi CY, Gomes AJB, Benathar TCM, O'Brien PCM, et al. Two new cytotypes reinforce that *Micronycteris hirsuta* Peters, 1869 does not represent a monotypic taxon. *BMC Genet.*; 14: 119. (2013).

Ribas T, Rodrigues L, Nagamachi C, Gomes A, Rissino J, O'Brien P, et al. Phylogenetic reconstruction by cross-species chromosome painting and G-banding in four species of Phyllostomini tribe (Chiroptera, Phyllostomidae) in the Brazilian Amazon: an independent evidence for monophyly. *PLoS ONE*. 2015;10(3), e0122845.

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).

Santos N and 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).

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

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

Sotero-Caio CG, Pieczarka JC, Nagamachi CY et al (2011) Chromosomal homologies among vampire bats revealed by chromosome painting (Phyllostomidae, Chiroptera). *Cytogenet Genome Res* 132:156–164

Sotero-Caio CG, Volleth M, Gollahon LS, Fu B, Cheng W, Ng BL, et al. Chromosomal evolution among leaf-nosed nectarivorous bats-evidence from cross-species chromosome painting (Phyllostomidae, Chiroptera). *BMC Evol Biol*. 2013;13(1):276.

Sotero-Caio C. G., Volleth M, Hoffmann F. G., Scott L., Wichman H. A., Yang F e Baker RJ. Integration of molecular cytogenetics, dated molecular phylogeny, and model-based predictions to understand the extreme chromosome reorganization in the Neotropical genus *Tonatia* (Chiroptera: Phyllostomidae) *BMC Evolutionary Biology* 15:220 (2015).

Telenius H, Ponder BAJ, Tunnacliffe A, Pelmeur AH, Carter NP, Ferguson-Smith MA, Behmel A, Nordenskjöld M, Pfragner R. Cytogenetic analysis by chromosome painting using dop-pcr amplified flow-sorted chromosomes. (1992)

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

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

Yang et al. (2003) Reciprocal chromosome painting among human, aardvark, and elephant (superorder Afrotheria) reveals the likely eutherian ancestral Karyotype. *PNAS* 4: 1062-1066.

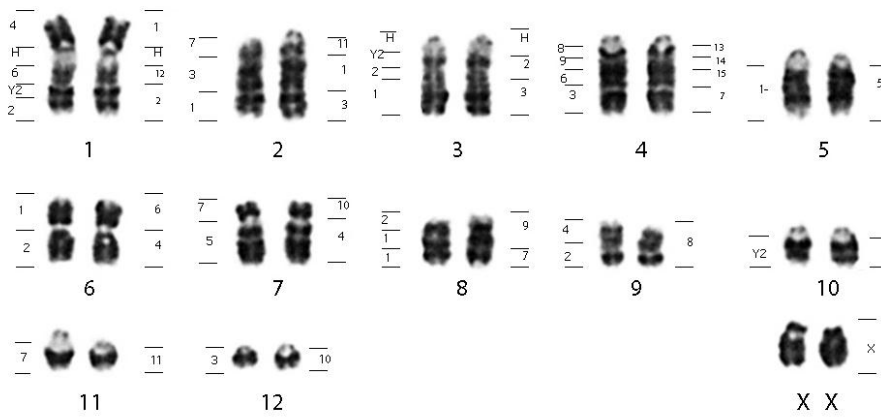
Varella-Garcia M, Morielle-Versute E, Taddei VA: A survey of cytogenetic data on Brazilian bats. *Revista Brasileira de Genética* 12: 761-793. (1989).

Ventura K., Silva M.J.J, Fagundes V., Christoff U.A. e Yonenaga-Yassuda Y. Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGG)<sub>n</sub> arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). *Cytogenetic and Genome Research* 115 (2): 169-175.(2006)

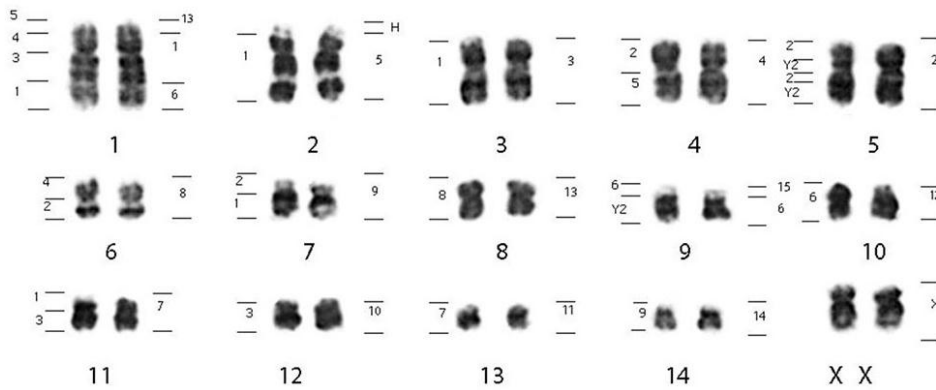
Verma RS, Babu A: *Human chromosomes: Principles and techniques*. 2<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill, Inc. Health professional division. (1995).

## Figuras e tabelas

### a *Lophostoma schulzi*



### b *Lophostoma brasiliense*



### c *Lophostoma carrikeri*

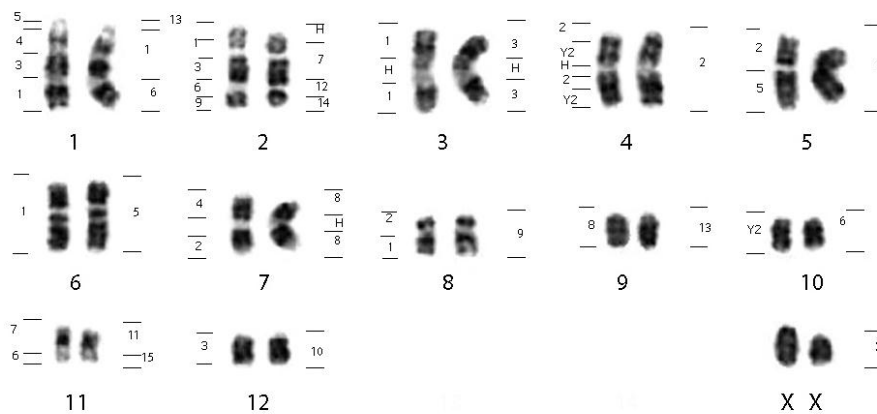


Figura 01. Cariótipos G bandeados de (a) *Lophostoma schulzi* (LSC), (b) *Lophostoma brasiliense* (LBR) e (c) *Lophostoma carrikeri* (LCA). As linhas horizontais à direita de cada par de cromossomos delimitam a hibridização com sondas cromossomos-totais de *Phyllostomus hastatus* e as linhas horizontais à esquerda as sondas de *Carollia brevicauda*. H, identifica as regiões de heterocromáticas amplificadas.

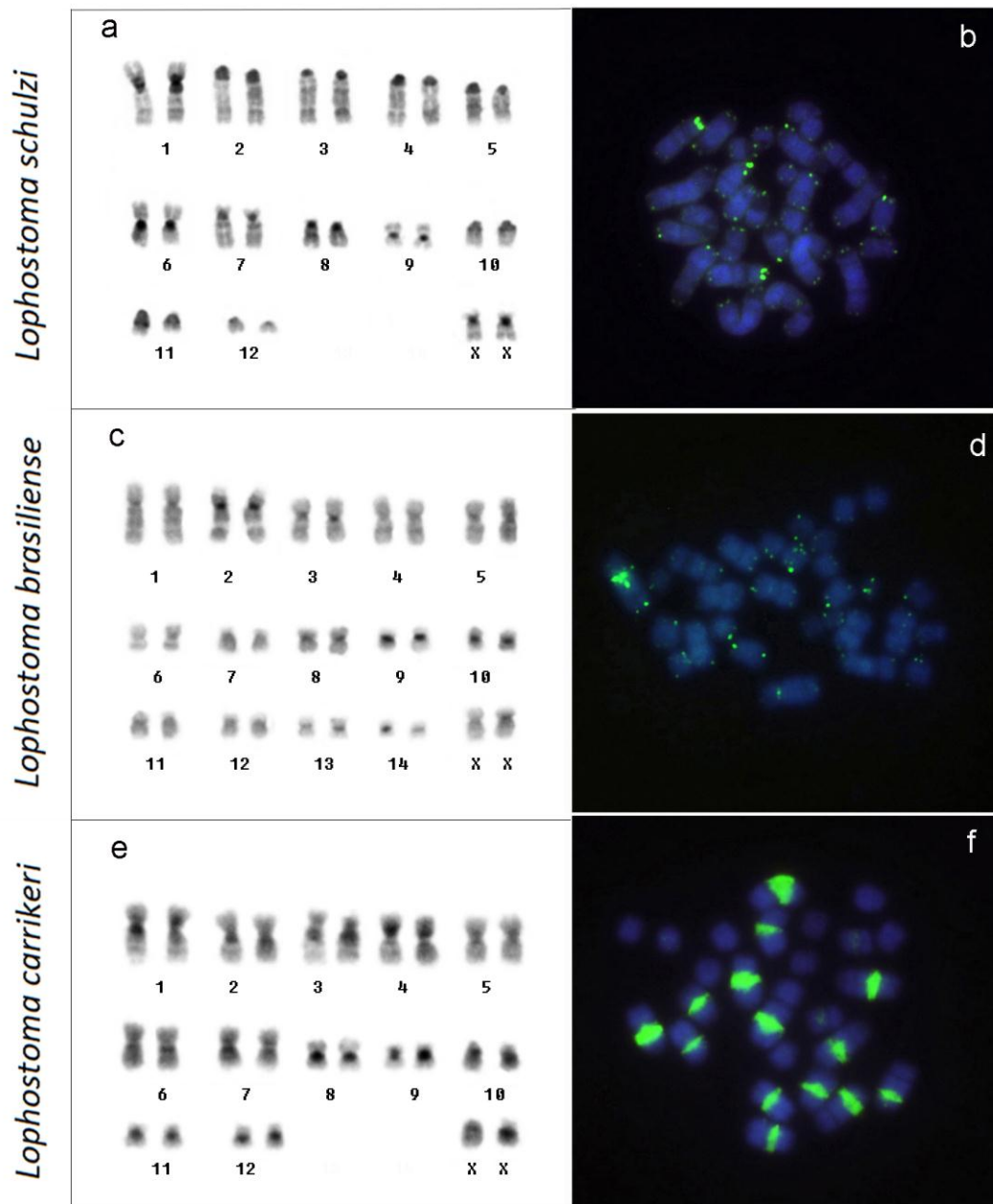


Figura 02. Padrões de bandas C e FISH como sondas teloméricas em metáfases de *Lophostoma schulzi* (a) e (b), *Lophostoma brasiliense* (c) e (f) e *Lophostoma carrikeri* (e) e (f) respectivamente.

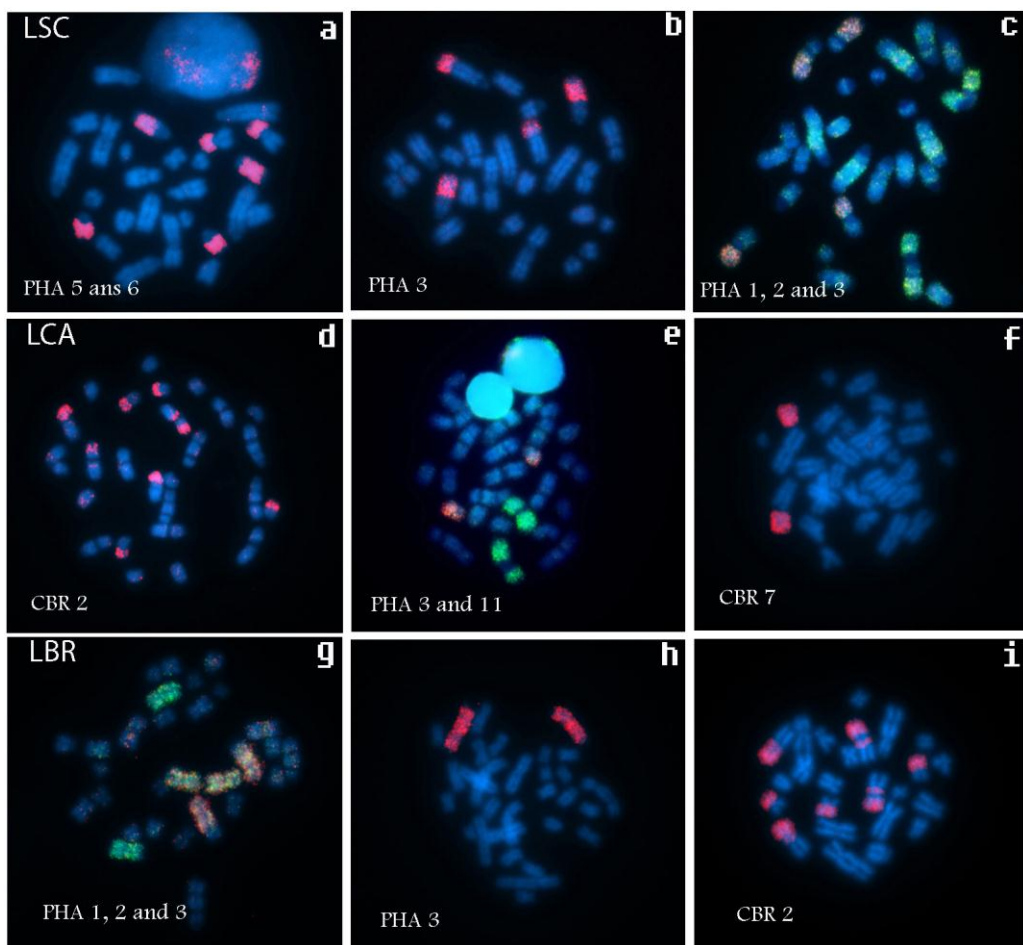


Figura 03. Imagens representativas das hibridizações *in situ* com sondas de *Phyllostomus hastatus* (PHA) e *Carollia brevicauda* (CBR) nas metáfases das espécies do gênero *Lophostoma*. As sondas de pintura utilizadas em LSC (a-c), LCA (g-i) e LBR (d-f) são indicadas em branco no canto inferior de cada imagem.

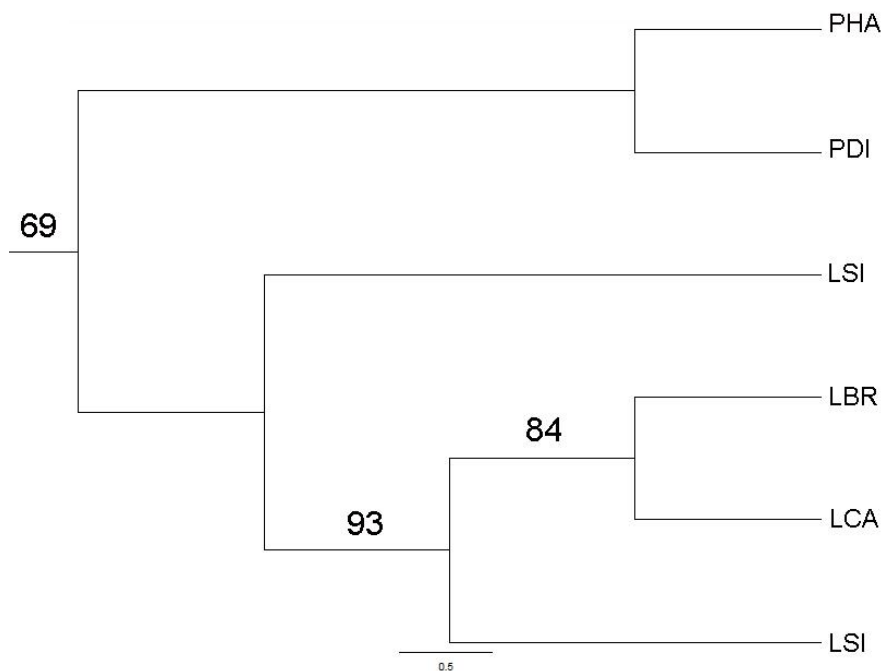


Figura 04. Árvore filogenética obtida utilizando caracteres cromossômicos a partir de máxima parcimônia no programa PAUP para representantes do gênero *Lophostoma*. Os números acima dos ramos representam os valores de bootstraps. PHA= *P. hastatus*, PDI= *P. discolor*, LSI=*L. silviculum*, LBR= *L. brasiliense*, LCA= *L. carrikeri*, LSC= *L. schulzi*.

Tabela 1. Matriz de presença/ausência de caracteres correspondendo a presença de sintenia (1) ausência (0) utilizados na análise de máxima parcimônia. PHA= *P. hastatus*, PDI= *P. discolor*, LSI=*L. silviculum*, LBR= *L. brasiliense*, LCA= *L. carrikeri*, LSC= *L. schulzi*.

Número	Caracteres a partir de PHA	PHA	PDI	LSI	LBR	LCA	LSC
1	15 as PHA	1	0	1	0	0	0
2	X as PHA	1	1	1	0	0	0
3	X acro	0	0	0	0	1	1
4	15 AS PDI	0	1	0	0	0	0
5	13 pq as LSI	0	0	1	1	1	1
6	13pdist as LSI	0	0	1	1	1	1
7	1int+13 d	0	0	0	1	1	0
8	1 int+6p	0	0	0	1	1	0
9	1 diss	0	0	0	0	0	1
10	1a diss + 12	0	0	0	0	0	1
11	1b diss 11	0	0	0	0	0	1
12	1b diss 3	0	0	0	0	0	1
13	2 diss	0	0	0	0	0	1
14	2a diss+ 3	0	0	0	0	0	1
15	2b diss + 12	0	0	0	0	0	1
16	4 diss	0	0	0	0	0	1
17	4 diss + 6p	0	0	0	0	0	1
18	4 diss + 10p	0	0	0	0	0	1
19	5 as LBR	0	0	0	0	1	0
20	5 acro	0	0	0	0	0	1
21	5 as LCA	0	0	0	1	0	0
22	6 diss	0	0	0	1	1	1
23	6q inv	0	0	0	1	1	0
24	6qinv+ 15	0	0	0	1	0	0
25	6q acro	0	0	0	0	0	1
26	7 int +12	0	0	0	0	1	0
27	7 a +15	0	0	0	0	0	1
28	7b+ 9 int	0	0	0	0	0	1
29	7 diss	0	0	0	0	0	1
30	10 diss	0	0	0	0	0	1
31	11int+15	0	0	0	0	1	0
32	11 diss	0	0	0	0	0	1
33	12+14	0	0	0	0	1	0
34	13+14	0	0	0	0	0	1



## 3.2 CAPÍTULO 2

**Título:** Filogenia cromossômica e Evolução na subfamília Phyllostominae (Chiroptera, Phyllostomidae) inferida por pintura cromossômica.

**Autores:** Natalia Karina Nascimento da Silva<sup>1</sup>; Talita Fernanda Augusto Ribas<sup>1</sup> Cleusa Yoshiko Nagamachi<sup>1</sup>; Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues<sup>2</sup>; O'Brien, P.C.M.<sup>3</sup>; Ferguson-Smith, M.A.<sup>3</sup> Julio Cesar Pieczarka<sup>1</sup>

**Instituição:** <sup>1</sup>Laboratório de Citogenética, UFPA-Belém; <sup>2</sup>Laboratório de Genética e Biodiversidade, UFOPA-Santarém; Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics, University of Cambridge, UK<sup>3</sup>;

**Palavras chave:** Citogenética, Filogenia, evolução cariotípica, Pintura cromossômica, Phyllostominae.

**Título curto:** Filogenia cromossômica e Evolução na subfamília Phyllostominae.

## Resumo

Phyllostomidae representa uma das famílias mais diversificadas ecológica e morfológicamente dentro da ordem Chiroptera. A subfamília Phyllostominae é organizada em três tribos: Phyllostomini (*Phyllostomus*, *Tonatia*, *Mimon*, *Phylloderma*, *Lophostoma*), Macrophyllini (*Trachops*, *Macrophyllum*) e Vampyrini (*Chrotopterus*, *Vampyrum*) com relações filogenéticas não resolvidas. Esse grupo de morcegos exibem diversos cariótipos, com número diploide variando de  $2n=16$  em a  $2n=34$ . Aqui investigamos a evolução cromossômica nos quatro gêneros monotípicos pertencentes as tribos Macrophyllini e Vampyrini por pintura cromossômica comparativa pela primeira vez. Um mapa comparativo foi estabelecido utilizando sondas cromossomos totais derivadas de *Phyllostomus hastatus* e *Carollia brevicauda*. Encontramos extensa conservação braço-cromossomo. Os nossos resultados foram integrados a mapas comparativos já publicados permitindo investigar a evolução cariotípica intergenérica entre sete gêneros pertencentes as três tribos da subfamília e uma espécie de grupo externo. A filogenia com base na análise cladística a partir de caracteres cromossômicos detectados pela ZOO-FISH não foi consistente com as obtidas usando sequências de DNA. A análise citogenética apoia uma relação entre os gêneros das três tribos, devido a conservação desses cariótipos e resgata uma associação entre as espécies *L. schulzi* e *T. saurophila*, que possuem cariótipos altamente rearranjados.

## Introdução

Phyllostomidae representa uma das famílias mais diversificadas ecológica e morfológicamente dentro da ordem Chiroptera, com mais de 150 espécies (Simmons et al. 2005). Os morcegos filostomíneos formam um clado monofilético, apoiado por várias classes de dados (Wetterer et al. 2000; Simmons et al. 2005; Baker et al., 2003a, Baker et al., 2012).

Phyllostominae (*sensu* Baker et al. 2003a) é uma subfamília constituída de 9 gêneros com 20 espécies, organizados em três tribos: Phyllostomini (*Phyllostomus*, *Tonatia*, *Mimon*, *Phylloderma*, *Lophostoma*), Macrophyllini (*Trachops*, *Macrophyllum*) e Vampyrini (*Chrotopterus*, *Vampyrum*). Investigações moleculares tentaram explicar as relações filogenéticas dentro do grupo, onde o monofiletismo dentro destas tribos é bem definido e fortemente apoiado em várias topologias moleculares (Lee et al. 2002; Baker et al. 2003a; Porter et al. 2003, Hoffmann et al. 2008).

Contudo, a problemática diz respeito à ambiguidade que ocorre no relacionamento evolutivo entre as tribos. Baker et al. (2003a), sugerem Phyllostomini como grupo irmão de Vampyrini, com Macrophyllini como ramo mais basal dentro da subfamília. Já as demais topologias moleculares sugerem o agrupamento de Phyllostomini e Macrophyllini como taxa irmão e com Vampyrini como ramo mais basal dentro da subfamília (Hoffmann et al. 2008, Datzmann et al., 2010; Rojas et al., 2011). As relações das tribos dentro da subfamília permanecem incertas e há duas sugestões para explicar essa falta de resolução: devido a radiação rápida que ocorreu entre os membros desse grupo, proposto por Lee et al. (2002) ou pela falta de resolução que é gerada por esses genes evoluírem muito lentamente para resolver os nós na base de Phyllostominae (Hoffmann et al. 2008).

Em relação à variabilidade no número de cromossomos, as espécies em Phyllostominae exibem diversos cariótipos, com número diploide variando de  $2n=16$  em *Tonatia saurophila* a  $2n=34$  em *Lophostoma silviculum* e *Macrophylum macrophylum* (Patton & Baker, 1978; Honeycutt et al., 1980; Baker & Bickham, 1980; Baker et al., 1982; Ribas et al., 2015). A maioria das espécies da subfamília mostram um cariótipo com  $2n=32$  em sua maioria de cromossomos de dois braços. Estudos anteriores indicam que translocações Robertsonianas foram os principais rearranjos cromossômicos que contribuíram para a diversificação destes cariótipos (Baker e Bickham, 1980; Rodrigues et al., 2000; Gomes et al., 2012, Pieczarka et al., 2005). Em contraste, o grupo exibe espécies com cariótipos altamente rearranjados, como em *T. saurophila* e *L. schulzi* onde rearranjos do tipo fusões em tandem teriam contribuído para a evolução cariotípica radical observada nessas espécies. Essas variações fazem da subfamília Phyllostominae um interessante grupo para estudos de evolução cromossômica.

Pintura cromossômica pode identificar homologies no genoma entre diferentes espécies com precisão, independente da preservação do padrão de bandeamentos cromossômicos, sendo uma importante ferramenta para estudos filogenéticos. Dentro da família Phyllostomidae essa técnica vem sendo aplicada para estudos evolutivos (Pieczarka et al., 2013; Sotero- Caio et al., 2011; 2013, 2015; Ribas et al., 2015). Uma análise comparativa por pintura cromossômica forneceu uma visão da evolução cariotípica para quatro subfamílias de Phyllostomidae (Pieczarka et al., 2013), propondo um cariótipo basal com  $2n=42$  NF=60, que é semelhante ao cariótipo de *Phyllostomus hastatus*. Contudo, mapas comparativos estão disponíveis para apenas 19 das 150 espécies de filostomídeos (Volleth et al. 1999, Pieczarka et al., 2005, 2013, Sotero- Caio et al., 2011, 2013, 2015; Ribas et al., 2013, 2015).

Utilizamos Zoo-FISH e bandeamentos cromossômicos para construir mapas comparativos de quatro espécies de Phyllostominae: *Chrotopterus auritus*, *Macrophyllum macrophyllum*, *Trachops cirrhosus* e *Vampyrum spectrum*, realizando pintura cromossômica com sondas de cromossomos totais de *Phyllostomus hastatus* e *Carollia brevicauda* (Pieczarka et al., 2005). Essas espécies foram analisadas por pintura cromossômica pela primeira vez. Realizamos a integração desses dados com mapas comparativos anteriormente publicados (Pieczarka et al., 2005; Sotero- Caio et al., 2011; Ribas et al., 2015) para elucidar os tipos de rearranjos interespecíficos envolvidos no processo de diferenciação cromossômica que ocorreu ao longo da evolução cromossômica dessa subfamília e para realizar uma reconstrução filogenética da evolução cariotípica deste grupo.

## **Material e Métodos**

Espécies analisadas, Preparações cromossômicas e bandeamento G

A amostra foi composta por *Chrotopterus auritus* (CAU, três machos e duas fêmeas), *Macrophyllum macrophyllum* (MMA, dois machos e duas fêmeas), *Trachops cirrhosus* (TCI, um macho e uma fêmea) e *Vampyrum spectrum* (VSP, um macho e duas fêmeas) (Tabela 1). As preparações cromossômicas foram obtidas pelo método de extração direta da medula óssea segundo o protocolo descrito por Baker *et al.* (2003b). Os padrões de bandas G foram obtidos utilizando solução de tripsina de acordo com Seabright (1971), com posterior incubação em solução salina (0,5XSSC) a 60° C e coloração com solução de Wright segundo Verma e Babu (1995). Os cariótipos foram organizados em ordem decrescente de tamanho dos cromossomos.

Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Pintura cromossômica foi realizada usando sondas cromossomos totais de *Carollia brevicauda* e *Phyllostomus hastatus* (Pieczarka et al. 2005), amplificadas e marcadas por DOP-PCR (Telenius et al. 1992; Yang et al. 1995) e hibridizadas seguindo procedimentos previamente descritos (Yang et al. 1995; Pieczarka et al. 2005). Brevemente, as lâminas foram incubadas com soluções enzimáticas de pepsina, lavadas em solução de 2 X SSC e desidratadas em bateria de álcool (70%, 90% e 100%); posteriormente as lâminas foram envelhecidas em estufa a 65°C por duas horas, desnaturadas em formamida/2XSSC a 70% por 50 segundos e incubadas em solução de hibridização (14 µl de solução contendo 50% formamida, 2XSSC, 10% sulfato de dextram e 1-3 µl do produto da PCR) durante três dias. Após a hibridização e lavagem de estringência, sondas marcadas com biotina foram visualizadas com avidina-Cy3 ou FITC (1 µg/ml; Amersham). As imagens foram capturadas com o auxílio da câmera CCD Zeiss Axiocam controlada pelo software Axiovision 3.0, acoplada a um microscópio Zeiss Axioplan 2. Os cromossomos foram identificados de acordo com sua morfologia e padrões de bandas invertidas usando DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

#### Análise Cladística

Uma matriz de caracteres foi construída para ser utilizada análise de máxima parcimônia no PAUP v.4.0b10 (Swofford,1999), usando segmentos sintênicos e associações cromossômicas compartilhados como caracteres (tabela 2), que foram codificados a partir dos dados de pintura cromossômica para 12 espécies. Todos os caracteres foram ponderados com o mesmo peso. Buscou-se a árvore filogenética mais parcimoniosa que foi obtida usando a busca exaustiva. A robustez de cada nó foi avaliada por estimativa de bootstrap de 1000 repetições. Realizamos a integração de nossos mapas comparativos mais sete membros da subfamília (Pieczarka et al., 2005; Ribas et al., 2015; Sotero-Caio

et al., 2015, Silva et al. (*no prelo*), hibridizados com o mesmo conjunto de sondas. Buscando a utilização de um grupo externo mais filogeneticamente próximo da subfamília Phyllostominae, realizamos a integração dos dados de Sotero-Caio et al. (2015), que utilizaram sondas de *Macrotus californicus* no cariótipo da espécie *L. aequatorialis*, que possui cariótipo idêntico por bandeamento G a *L. silviculum*, hibridizado com sondas de *P. hastatus* e *C. brevicauda* em Ribas et al. (2015). Estes dados permitiram a dedução de homologias cromossômicas entre *Macrotus californicus* (Sotero-Caio et al., 2015) e as espécies hibridizadas com sondas de *P. hastatus* e *C. brevicauda* investigadas aqui. Deste modo, foi possível utilizar *M. californicus* como grupo-externo. O cariótipo do gênero *Macrotus* é considerado por Patton & Baker (1978) como o mais próximo do ancestral para a família Phyllostomidae.

## Resultados

### Descrição cariotípica e FISH para *Chrotopterus auritus* (CAU)

O cariótipo de *C. auritus* apresenta  $2n=28$  e  $NF=52$ , sendo o complemento autossômico constituído por 12 pares de cromossomos metacêntricos e um subtelocêntrico (par 11). O sistema de determinação sexual é do tipo XX:XY, sendo o X um metacêntrico de tamanho médio e o Y um pequeno acrocêntrico (Figura 01). Pintura cromossômica em *C. auritus* com sondas de *Phyllostomus hastatus* revelou 17 segmentos homeólogos e, com sondas de *Carollia brevicauda*, 26 segmentos homeólogos.

### Descrição cariotípica e FISH para *Macrophyllum macrophyllum* (MMA)

Para *M. macrophyllum* foi observado  $2n=34$  e  $NF=60$ , composto por 14 pares de cromossomos de dois braços (metacêntricos e submetacêntricos) e 2 pares de cromossomos acrocêntricos (pares 15 e 16). O cromossomo X é submetacêntrico de tamanho médio. O

cromossomo Y é um acrocêntrico pequeno (Figura 02). Hibridizações com sondas de *Phyllostomus hastatus* em *M. macrophyllum* revelaram 16 segmentos homeólogos e, com sondas de *Carollia brevicauda*, 24 segmentos homeólogos.

#### Descrição cariotípica e FISH para *Trachops cirrhosus* (TCI)

O cariótipo de *T. cirrhosus* apresentou  $2n=30$  e  $NF=56$ , compreendendo cromossomos metacêntricos (pares 1, 4, 6, 8, 10, 12 e 14), submetacêntricos (2, 3 e 5) e subtelocêntricos (7, 9, 11 e 13). Os cromossomos X e Y apresentaram morfologia acrocêntrica. O bandejamento G permitiu a identificação precisa dos cromossomos homólogos (Figura 03). Pinturas cromossômicas com sondas de *Phyllostomus hastatus* revelaram 16 segmentos homeólogos em TCI; com sondas de *Carollia brevicauda*, 25 segmentos homeólogos.

#### Descrição cariotípica e FISH para *Vampyrum spectrum* (VSP)

Foi observado para *V. spectrum*  $2n=30$  e  $NF=56$ , compreendendo cromossomos metacêntricos (pares 2, 3, 4, 6, 7, 10, 12, 13), submetacêntricos (1, 5) e subtelocêntricos (8, 9, 11). Os cromossomos X apresentou-se submetacêntrico de tamanho médio (Figura 04). O padrão de bandejamento G na espécie é observado na figura 04. Pinturas cromossômicas utilizando sondas de *Phyllostomus hastatus* revelaram 18 segmentos homeólogos; com sondas de *Carollia brevicauda*, 26 segmentos homeólogos.

#### Análise Filogenética

Em nossa análise de máxima parcimônia, uma única árvore de 119 passos foi recuperada utilizando a opção busca exaustiva no programa PAUP. Com índice de consistência (CI) = 0.7563 e índice de retenção (RI) = 0.6081, índice de homoplasia (HI) = 0.2437. A topologia consenso obtida consiste em uma politomia não resolvida entre os membros das



três tribos (figura 05); contudo a relação entre as espécies *L. brasiliensis* e *L. carrikeri* foram recuperadas (Bootstrap de BP=96), as espécies *L. schulzi* e *T. saurophila* agruparam como uma linhagem basal para todos os gêneros as espécies de Phyllostominae aqui investigadas.

## Discussão

Este trabalho apresenta os mapas comparativos para as espécies *C. auritus*, *V. spectrum*, *T. cirrhosus* e *M. macrophyllum* e, juntamente com os mapas cromossômicos de espécies da subfamília Phyllostominae publicados anteriormente (Pieczarka et al., 2005, Ribas et al., 2015, Sotero-Caio et al., 2015; Silva et al., *(no prelo)*), realizamos a comparação genômica entre elas, permitindo identificar os rearranjos ocorridos ao longo da evolução desse grupo e estabelecer uma filogenia cromossômica para 11 espécies da subfamília.

Em geral, a maioria das sondas de dois braços de *P. hastatus* mostraram um único sinal, com poucas exceções, demonstrando o conservadorismo de braços cromossômicos entre as espécies aqui analisadas. A diferenciação de 2n observada foi resultado de processos de rearranjos do tipo fusão em tandem ou fissões.

Para os membros da tribo Vampyrini, *V. spectrum* e *C. auritus*, o cariótipo de VSP difere de PHA pela fusão de PHA13 e PHA14 correspondendo ao par VSP 8, fissão do PHA3 que é observamos nos pares VSP12=PHA3q (um metacêntrico pequeno), com possível envolvimento de inversões e como produto de fusão em VSP3= PHA3p+PHA15; a amplificação ou adição de heterocromatina também contribuiu para as diferenças cariotípicas observadas em VSP e as demais espécies analisadas. Duas fusões em tandem levaram a diferença de número diploide observada entre os cariótipos de CAU e PHA, correspondente aos pares CAU1=PHA6+14 e CAU7=PHA15/12. A condição do

cromossomo PHA7 não invertida também foi observada nas duas espécies da tribo, VSP=8 e CAU=8, sendo esta condição invertida uma sinapomorfia para as espécies do gênero *Phyllostomus*, em Patton & Baker (1978).

Para os membros da tribo Macrophyllini, *T. cirrhosus* e *M. macrophyllum*, foi observada extensa conservação braço-cromossomo total pela pintura cromossômica e confirmada pelo conservadorismo do padrão de bandas. O cariótipo de TCI difere de PHA pelo par TCI 12 correspondendo a uma fusão PHA12/15 e também pelo par portado da NOR em *T. cirrhosus* TCI 11. Os cariótipos de MMA e PHA exibem padrão similar de bandas e diferem por um par a mais em MMA, correspondente ao par MMA16=PHA13p.

Os pares PHA11 e PHA14 definidos pela pintura cromossômica e que mostram sintenia conservada para membros de várias subfamílias de Phyllostomidae (Pieczarka et al., 2005, 2013, Sotero- Caio et al., 2011, Ribas et al., 2013, 2015), sugeridos como caracteres plesiomórficos para a família, também foram encontrados como segmentos conservados nas quatro espécies. Para os pares sugeridos como sinapomorfia para a tribo Phyllostomini, correspondentes a PHA1, PHA2 e PHA4, todos foram observados conservados nos membros constituintes das outras duas tribos da subfamília, consideramos esses pares como sinapomorfia para Phyllostominae.

Nenhuma das associações observadas aparece unindo os membros das tribos analisadas. As associações PHA13/14= VSP 8, observada em *V. spectrum* e PHA12/15= TCI 12, identificada em *T. cirrhosus*, também foram encontradas em membros da subfamília Desmodontinae (Sotero-Caio et al. 2011). Essas associações não devem ser consideradas como sinapomorfias e sim eventos homoplásicos na evolução cromossômica desses dois grupos. O cuidado na utilização de alguns tipos de rearranjos, como translocações Robertsonianas na construção de filogenias cromossômicas para morcegos, já foi reportado (Ao et al., 2006; Mao et al. 2008; Kulemzina et al.,2011).

Um número muito baixo de associações cromossômicas compartilhadas entre os membros de cada uma das tribos foi encontrado, provavelmente porque eles divergiram do ancestral comum mais ou menos ao mesmo tempo (Lee et al., 2002), depois da divergência cada linhagem acumulou rearranjos independentes, observados pela grande quantidade de apomorfias encontradas. Isso justifica a politomia não resolvida entre os gêneros representantes das três tribos observado na nossa filogenia.

De acordo com nossa análise, os gêneros pertencentes as tribos Macrophyllini e Vampyrini, juntamente com o gênero *Phyllostomus*, são os parentes mais próximos e *L. silviculum* é o taxa irmão para eles. Dados cromossômicos indicam uma relação entre as espécies *L. schulzi* e *T. saurophila*, baseados em pelo menos duas associações (PHA12+PHA2p =TSU1 =LSC1 e PHA3p+1PHA1p= TSU4= LSC2) compartilhadas entre elas. Esta relação contradiz vários estudos moleculares que colocam o gênero *Tonatia* como basal para a tribo Phyllostomini (Lee et al., 2002; Porter et al., 2003, Hoffmann et al., 2008); apesar do extenso processo de remodelação do cariótipo encontrado para essas espécies, elas também conservam formas basais, colocando-as na base da tribo Phyllostomini.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao grupo de Quiroptera do Laboratório de Citogenética da UFPa pela ajuda no trabalho de campo e preparações cromossômicas; à Sapopema, Conservação Internacional do Brasil, Rio e Aotus Consultoria Ambiental pelo apoio logístico para a coleta das amostras.; Dr. Anderson José Baia Gomes por sugestões a ajuda com a análise filogenética; à Maria da Conceição e Shirley Nascimento por ajuda com o trabalho no laboratório; ao CNPq, FAPESPA, CAPES e BNDES pelo apoio financeiro. A coleta das amostras foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).

## Referências Bibliográficas

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.

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).

Baker RJ and Lopez G (1970) Chromosomal variation in bats of the genus *Uroderma* (Phyllostomidae). *J Mammal* 51:786- 789.

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

Baker, Robert J.; Genoways, Hugh H.; and Seyfarth, Paisley A., "Results of the Alcoa Foundation-Suriname Expeditions. VI. Additional Chromosomal Data for Bats (Mammalia: Chiroptera) from Suriname" *Mammalogy Papers: University of Nebraska State Museum*. Paper 230. " (1981).

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*. *Stecial Publications Series - Pymatuning Laboratory of Ecology, Pittsburg*, p.303-327. (1982).

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

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 Pappers of Museum Texas Tech University* 230: 1–32. (2003a).

- Baker RJ, Hamilton M, Parish DA: Preparations of Mammalian karyotypes under field conditions. *Occasional Papers of Museum Texas Tech University* 228: 1–7. (2003b)
- Baker, R.J., Fonseca, R.M., Parish, D.A., Phillips, C.J. & Hoffmann, F.G. (2004) New bat of the genus *Lophostoma* (Phyllostomidae: Phyllostominae) from Northwestern Ecuador. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University*, 232, 1–16.
- 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).
- Calixto M. S., Andrade I. S., Cabral-de-Mello D. C., Santos N., Martins C., Loreto V., Souza M. J. Patterns of rDNA and telomeric sequences diversification: contribution to repetitive DNA organization in Phyllostomidae bats *Genetica*. (2013)
- Datzmann T, von Helversen O, Mayer F Evolution of nectarivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia). *BMC Evol Biol* 10:165(2010).
- Faria KC, Marchesin SRC, Moreira PRL, Beguelini MR, Morielle- Versute E New insights into telomeric DNA sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> location in bat chromosomes. *Genet Mol Res* 8(3):1079–1084(2009).
- Fagundes, V, Scalzi-Martin JM, Hozier K., 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. montesisi*. *Cytogenet Cell Genet* 78:224-228.
- Ferguson-Smith MA, Yang F and O'Brien PCM (1998) Comparative mapping using chromosome sorting and painting. *ILAR J* 39: 68-76.
- Genoways, H.H. & Williams, S.L. (1980) Results of the Alcoa Foundation-Suriname Expeditions. I. A new species of bat of the genus *Tonatia* (Mammalia: Phyllostomatidae). *Annals of Carnegie Museum*, 49, 203–211.
- Giannini NP e Kalko EKV (2004). Trophic structure in a large assemblage of phyllostomid bats in Panama. *Oikos*. v. 105. Lund: p.209-220.
- Gomes AJB, Rodrigues LRR, Rissino JD, Nagamachi CY, Pieczarka JC Biogeographical karyotypic variation of *Rhinophylla fischeriae* (Chiroptera, Phyllostomidae) suggests the occurrence of cryptic species. *Comparative Cytogenetics* 4: 79–85. (2010).
- Gomes AJB, Nagamachi CY, Rodrigues LRR, Farias SG, Rissino JD, Pieczarka JC Karyotypic variation in *Rhinophylla pumilio* Peters, 1865 and comparative analysis with representatives of two subfamilies of Phyllostomidae (Chiroptera). *Comp Cytogenet* 6(2):213–225(2012).
- Hatanaka, T., Galetti, P.M.Jr Mapping of 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239 – 244 ( 2004).

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).

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).

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.

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).

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)*n* telomeric sequences in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99:3–10.

Rojas D, Vale A, Ferrero V. e Navarro L. When did plants become important to leaf-nosed bats? Diversification of feeding habits in the family Phyllostomidae *Molecular Ecology* (2011) 20, 2217–2228 (2011).

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).

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

Velazco, P. M., and R. Cadenillas R. 2011. On the identity of *Lophostoma silvicolu*m *occidentalis* (Davis & Carter, 1978) (Chiroptera: Phyllostomidae). *Zootaxa* 2962:1–20.

Williams, S.L. & Genoways, H.H. (2008) Subfamily Phyllostominae Gray, 1825. *In*: Gardner, A.L. (Ed), *Mammals of South America. Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. The University of Chicago Press, Chicago and London, pp. 255–300.

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.

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

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

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.

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).

Pieczarka JC, Gomes AJB, Nagamachi CY, Rocha DCC, Rissino JD, O'Brien PC, et al. A phylogenetic analysis using multidirectional chromosome painting of three species (*Uroderma magnirostrum*, *U. bilobatum* and *Artibeus obscurus*) of subfamily Stenodermatinae (Chiroptera-Phyllostomidae). *Chromosome Res*; 21: 383–92. (2013).

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).

Ribas TFA, Rodrigues LRR, Nagamachi CY, Gomes AJB, Benathar TCM, O'Brien PCM, et al. Two new cytotypes reinforce that *Micronycteris hirsuta* Peters, 1869 does not represent a monotypic taxon. *BMC Genet.*; 14: 119. (2013).

Ribas T, Rodrigues L, Nagamachi C, Gomes A, Rissino J, O'Brien P, et al. Phylogenetic reconstruction by cross-species chromosome painting and G-banding in four species of Phyllostomini tribe (Chiroptera, Phyllostomidae) in the Brazilian Amazon: no independent evidence for monophyly. *PLoS ONE*. 2015;10(3), e0122845.

Rodrigues LRR, Barros 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).

Santos N and 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).

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

Silva AM, Marques-Aguiar S, Barros RMS, Nagamachi CY, Pieczarka JC (2005) Comparative cytogenetic analysis in the species *Uroderma magnirostrum* and *U. bilobatum* (cytotype  $2n = 42$ ) (Phyllostomidae, Sternodermatinae) in the Brazilian Amazon. *Genet Mol Biol* 28:248–253

Sotero-Caio CG, Pieczarka JC, Nagamachi CY et al (2011) Chromosomal homologies among vampire bats revealed by chromosome painting (Phyllostomidae, Chiroptera). *Cytogenet Genome Res* 132:156–164

Sotero-Caio CG, Volleth M, Gollahon LS, Fu B, Cheng W, Ng BL, et al. Chromosomal evolution among leaf-nosed nectarivorous bats-evidence from cross-species chromosome painting (Phyllostomidae, Chiroptera). *BMC Evol Biol.* 2013;13(1):276.

Sotero-Caio C. G., Volleth M, Hoffmann F. G., Scott L., Wichman H. A., Yang F e Baker RJ. Integration of molecular cytogenetics, dated molecular phylogeny, and model-based predictions to understand the extreme chromosome reorganization in the Neotropical genus *Tonatia* (Chiroptera: Phyllostomidae) *BMC Evolutionary Biology* 15:220 (2015).

Telenius H, Ponder BAJ, Tunnacliffe A, Pelmeur AH, Carter NP, Ferguson-Smith MA, Behmel A, Nordenskjöld M, Pfragner R Cytogenetic analysis by chromosome painting using dop-pcr amplified flow-sorted chromosomes. (1992)

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

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

Yang et al. (2003) Reciprocal chromosome painting among human, aardvark, and elephant (superorder Afrotheria) reveals the likely eutherian ancestral Karyotype. *PNAS* 4: 1062-1066.

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

Ventura K., Silva M.J.J, Fagundes V., Christoff U.A. e Yonenaga-Yassuda Y. Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGG)<sub>n</sub> arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). *Cytogenetic and Genome Research* 115 (2): 169-175.(2006)

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



**Figuras e tabelas**

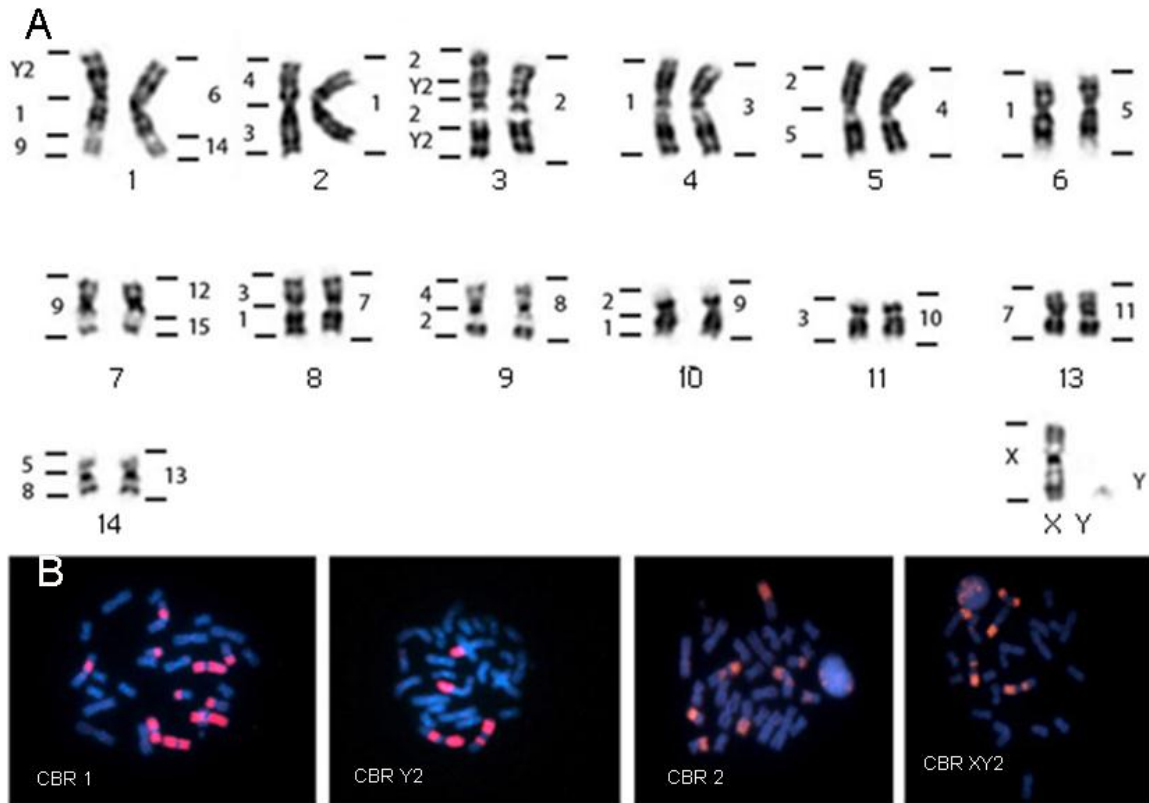


Figura 01: Mapeamento cromossômico de *Chrotopterus auritus* ( $2n=28/NF=52$ ): associações sintênicas com *C. brevicauda* (esquerda) e *P. hastatus* (direita). Abaixo: algumas imagens representativas dos experimentos de pintura cromossômica com sondas de CBR.

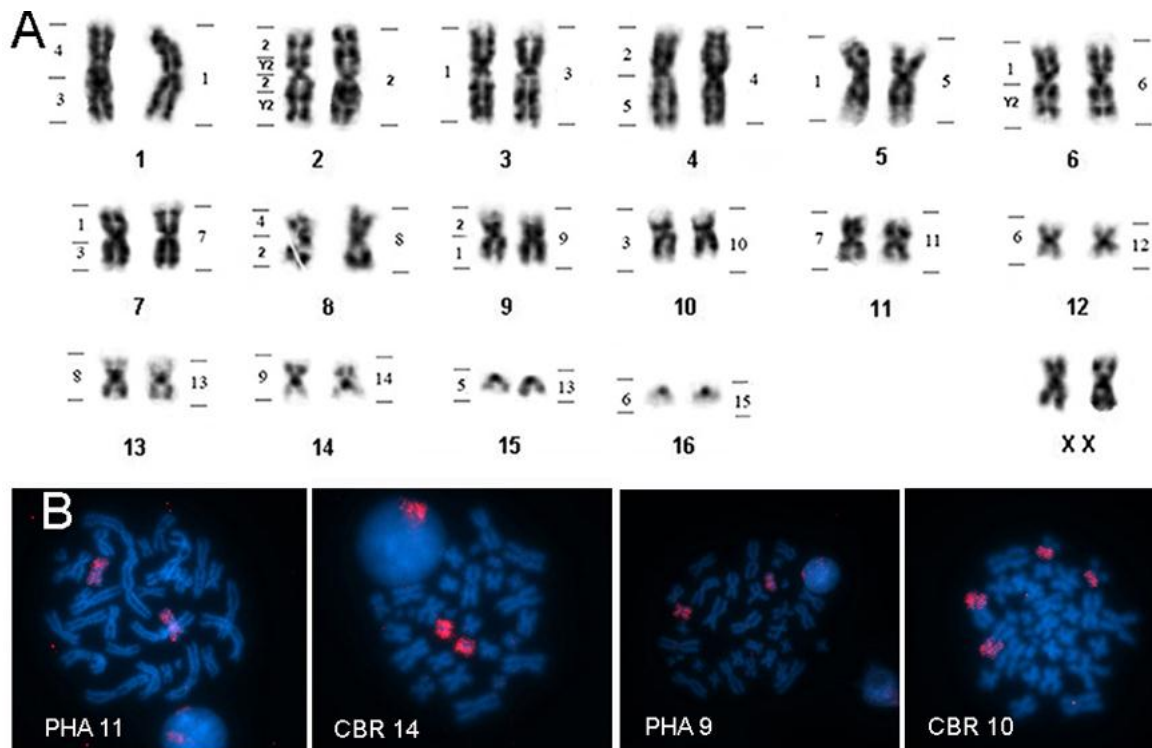


Figura 02: Mapeamento cromossômico de *Macrophyllum macrophyllum* ( $2n=34/NF=60$ ): associações sintênicas com *C. brevicauda* (esquerda) e *P. hastatus* (direita). Abaixo: imagens representativas dos experimentos de pintura cromossômica com sondas de CBR.

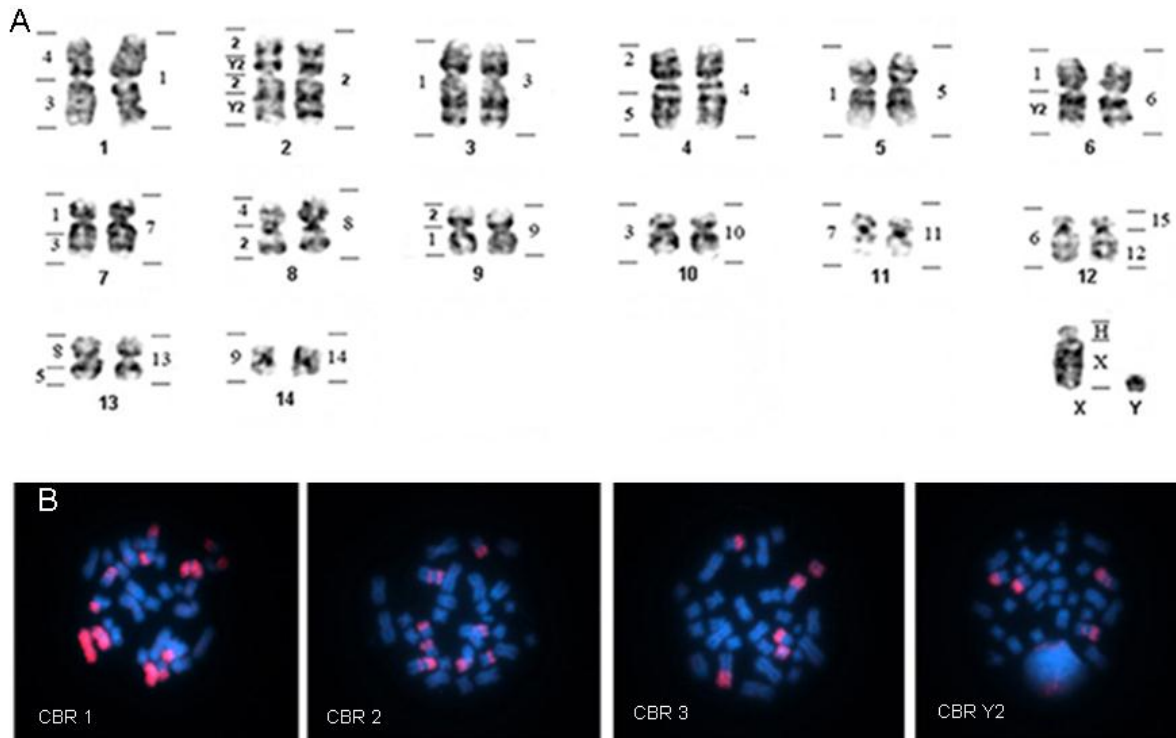


Figura 03: Mapeamento cromossômico de *Trachops cirrhosus* ( $2n=30/NF=56$ ): associações sintênicas com *C. brevicauda* (esquerda) e *P. hastatus* (direita). Abaixo: imagens representativas dos experimentos de pintura cromossômica com sondas de CBR.

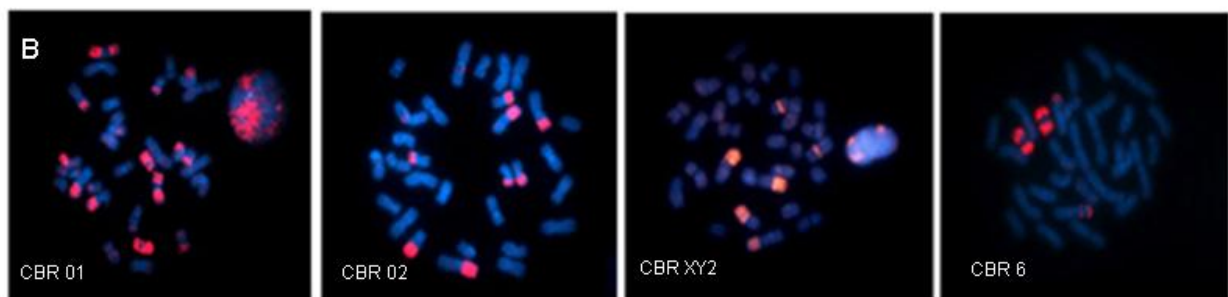
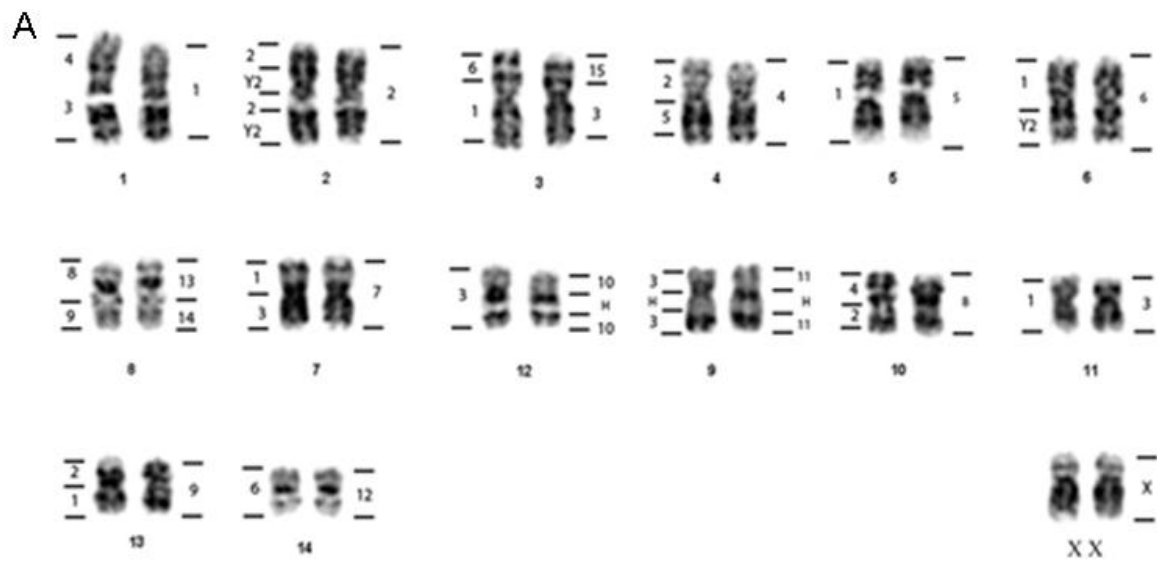


Figura 04: Mapeamento cromossômico de *Vampyrum spectrum* ( $2n=30/NF=56$ ): associações sintênicas com *C. brevicauda* (esquerda) e *P. hastatus* (direita). Abaixo: imagens representativas dos experimentos de pintura cromossômica com sondas de CBR.

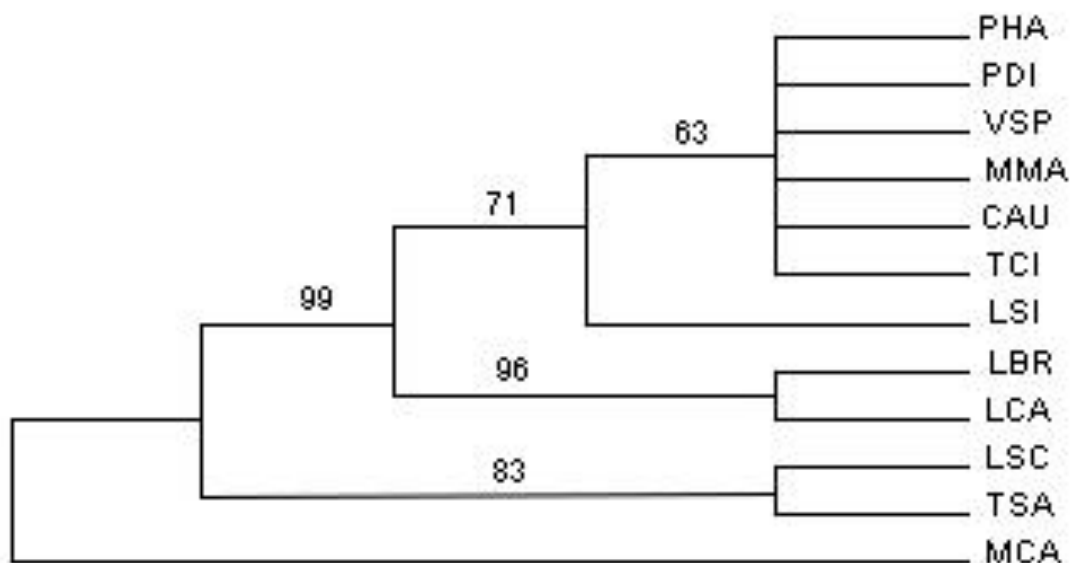


Figura 04. Árvore filogenética para a subfamília Phyllostominae obtida utilizando caracteres cromossômicos a partir da análise de máxima parcimônia no programa PAUP. Os números acima dos ramos representam os valores de bootstraps. PHA= *P. hastatus*, PDI= *P. discolor*, LSI=*L. silviculum*, LBR= *L. brasiliense*, LCA= *L. carrikeri*, LSC= *L. schulzi*, TCA= *T. cirrhosus* VSP= *V. spectrum* MMA= *M. macrophyllum* CAU= *C. auritus* TCI= *T. cirrhosus* MCA= *M. californicus*.

Tabela 01. Espécies analisadas no presente trabalho

ESPÉCIES E ABREVIACÕES	2N	NF	LOCALIDADE E ESTADO	Nº INDIVÍDUOS
<i>CHROTOPTERUS AURITUS</i> , (CAU)	28	52	Itaituba, PA (S4°28'20.5"; W 56°17'03,7")	5
<i>TRACHOPS CIRRHOSUS</i> , (TCI)	30	56	Urucará, AM (S 02°28'6; W 55°59'37,2")	3
<i>VAMPYRUM SPECTRUM</i> , (VSP)	30	56	Juruti, PA (S 02°23'12.1 W 57°38'22,0")	2
<i>MACROPHYLLUM MACROPHYLLUM</i> , (MMA)	34	60	Itaituba, PA (S 4°28'20.5"; W 56°17'03,7")	4

Tabela 02. Matriz de presença/ausência de caracteres correspondendo a presença de sintenia (1) ausência (0) utilizados na análise de máxima parcimônia. PHA= *P. hastatus*, PDI= *P. discolor*, LSI=*L. silviculum*, LBR= *L. brasiliense*, LCA= *L. carrikeri*, LSC= *L. schulzi*, TCA= *T. cirrhosus* VSP= *V. spectrum* MMA= *M. macrophyllum* CAU= *C. auritus* TCI= *T. cirrhosus* MCA= *M. californicus*.

Nº	Caracteres a partir de PHA	PHA	PDI	LSI	LBR	LC A	LSC	TSA	VSP	MMA	CAU	TCI	MCA
01	1 as PHA	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0
02	2 as PHA	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0
03	3 as PHA	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
04	4 as PHA	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0
05	5 as PHA	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
06	6 as PHA	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0
07	7 as PHA	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
08	8 as PHA	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
09	9 as PHA	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
10	10 as PHA	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
11	11 as PHA	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
12	12 as PHA	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
13	13 as PHA	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
14	14 as PHA	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1
15	15 as PHA	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
16	X as PHA	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1
17	X acro	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
18	15 as PDI	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	13 pq as LSI	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
20	13pdist as LSI	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
21	1int+13p	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
22	1 int+6p	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
23	1 diss	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
24	1a diss + 12	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
25	1b diss 11	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
26	1b diss 3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
27	2 diss	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
28	2a diss+ 3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
29	2b diss + 12	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
30	4 diss	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
31	4 diss + 6p	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
32	4 diss + 10p	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
33	5 as LBR	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
34	5 acro	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
35	5 as LCA	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
36	6 diss	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
37	6q inv	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
38	6qinv+ 15	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

39	6q acro	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
40	7 int +12	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
41	7 a +15	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
42	7b+ 9 int	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
43	7 diss	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
44	10 diss	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
45	11int+15	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
46	11 diss	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
47	12+14	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
48	13+14	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
49	1q/10p	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
50	1p/13qd	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
51	2p/12p	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
52	2q/6p	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
53	3p/9q	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
54	3q/4pq	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
55	3p/7p	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
56	4p/12p	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
57	4p/13p	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
58	5/14	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
59	6p+7p	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
60	6q/7q	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
61	6p/13p	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
62	6q/11	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
63	7q/8p	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
64	8q/9p	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
65	9p/13q	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
66	10p/13qd	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
67	10q/12q	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
68	10q/6p	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
69	11/15	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
70	13q prox/15	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
71	7 n/inv	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
72	10+het	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
73	11+het	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
74	3 diss	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
75	3 q livre	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
76	3p +15	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
77	13 +14	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
78	6 + 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
79	12 + 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
80	15 + 12 acro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
81	Par NOR lbr lca	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
82	6q+3q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
83	6p+4q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
84	5p+2q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
85	15+1q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
86	1plivre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

<b>87</b>	3plivre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>88</b>	5qlivre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>89</b>	4plivre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>90</b>	2plivre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>91</b>	par NOR vsp cau	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0

Tabela 3: Correspondência cromossômica a partir dos grupos sintênicos de cromossomos de *P. hastatus* em espécies da subfamília Phyllostominae. Abreviaturas: dist (distal); prox (proximal); int (inteiro); q (braço longo); p (braço curto).

<b>PHA</b>	<b>PDI</b>	<b>LSI</b>	<b>LBR</b>	<b>LCA</b>	<b>LSC</b>	<b>TSA</b>	<b>VSP</b>	<b>MMA</b>	<b>TCI</b>	<b>CAU</b>	<b>MMA</b>
<b>1</b>	1	1	1	1	1p+2q	4 dist+7 dist	1	1	1	2	5q+10
<b>2</b>	2	2	5	4	1q dist+3q prox	1 dist+ 2 dist	2	2	2	3	3q+13
<b>3</b>	3	3	3	3	2q dist+3q dist	4q prox+1p	3q	3	3	4	1q+14
<b>4</b>	4	4	4	5	6q+7q	1q prox+4prox	4	4	4	5	2q+12
<b>5</b>	5	5	2	6	5	6	5	5	5	6	3p+11
<b>6</b>	6	6	1 dist+9q	1q dist+10	6p+10	2q prox+2p+5 prox	6	6	6	1	1p+2p
<b>7</b>	7	7	11	2q	8q dist+ 4 dist	1p prox+3q prox	8	7	7	8	4
<b>8</b>	8	8	6	7	9	3q dist+5 dist	11	8	8	9	6
<b>9</b>	9	9	7	8	8	1p prox+9 dist	13	9	9	10	9
<b>10</b>	10	10	12	12	7p+12	2p prox+7	9	10	10	11	10
<b>11</b>	11	11	13	11	2 dist+11	5 prox	10	11	11	13	8
<b>12</b>	12	12	10	2q dist	1q prox	1q prox+2p dist	14	12	12q	7 pq prox	17+18
<b>13</b>	13	13+15	8+1p dist	9+1p dist	4 prox	1q prox+5+7	7p+q prox	13+15	13	14	15+14
<b>14</b>	14	14	14	2q dist	4 prox	6 dist	7q dist	14	14	1 q dist	16
<b>15</b>	15	16	9p	11q dist	4	5	3p	16	12p	7q dist	5p
<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>



#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

- Neste estudo, foram utilizadas técnicas de bandeamentos cromossômicos e pintura cromossômica comparativa para investigar a evolução cariotípica em espécies de morcegos da subfamília Phyllostominae.
- Através da construção dos mapas cromossômicos obtidos aqui por pintura cromossômica, assim como utilizando padrões de bandeamento, foi possível elucidar os tipos de rearranjos intra-específicos e interespecíficos envolvidos no processo de diferenciação cromossômica que ocorreu ao longo da evolução deste grupo e realizar inferências filogenéticas.
- Um novo citótipo para *Lophostoma schulzi* para indivíduos coletados no Brasil foi descrito. Sondas de DNA repetitivos foram utilizadas para o mapeamento de sequências teloméricas e genes ribossomais, auxiliando na compreensão da evolução cromossômica das espécies do gênero *Lophostoma*. Encontramos marcações teloméricas intersticiais (ITS) em duas espécies *L. brasiliense* e *L. carrikeri* onde identificamos fortes sinais co-localizados a blocos heterocromáticos, marcados pelo padrão de banda C positivo. Sugerimos que essas sequências estão presentes como componentes do DNA satélite na região centromérica e não como resultado de processos de fusões.
- Através do mapeamento cromossômico comparativo utilizando sondas cromossomos totais de *P. hastatus* e *C. brevicauda* estabelecemos mapas comparativos para sete espécies da subfamília, representativas das três tribos, sendo três espécies do gênero *Lophostoma* e para quatro gêneros monotípicos: *Chrotopterus*, *Macrophyllum*, *Trachops* e *Vampyrum*.
- Com relação ao gênero *Lophostoma* encontramos um maior número de cromossomos compartilhados entre *P. hastatus* e *L. brasiliense* do que em relação as outras duas espécies analisadas. Integrando nossos dados com de espécies já mapeadas pelo mesmo conjunto de sondas, reconstruímos o caminho evolutivo dos rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a evolução desse gênero.
- A maioria das sondas de dois braços de *P. hastatus* mostraram um único sinal para as espécies *C. auritus*, *V. spectrum*, *T. cirrhosus* e *M. macrophyllum* aqui analisadas, com poucas exceções, demonstrando o conservadorismo de braços cromossômicos.
- A filogenia cromossômica obtida por análise cladística para as cinco espécies do gênero *Lophostoma*, das quais três analisadas aqui, e com a integração de dados previamente publicados (Pieczarka et al. 2005, Ribas et al., 2015) divergiu das filogenias obtidas a partir de dados de substituição de nucleotídeos.
- Nos integramos nossos mapas cromossômicos com mapas obtidos por Pieczarka et al. (2005), Ribas et al. (2015) e Sotero-Caio et al. (2015) para realizar uma

reconstrução filogenética da evolução cariotípica deste grupo através de uma filogenia cromossômica.

- Dados cromossômicos apoiam relações entre os gêneros das três tribos, que divergem das filogenias moleculares, devido à conservação desses cariótipos e confirmam que a evolução cromossômica em morcegos é impulsionada por eventos de translocações Robertsonianas com extensa conservação de braços cromossômicos. Entretanto as espécies *L. schulzi* e *T. saurophila* exibem extensa reorganização cromossômica.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altringham JD (1996). **Bats. Biology and Behaviour**. New York: Oxford University Press. 255p.

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.

Armada JL, Souza CS, Canavez FC (1996) **An improved procedure to obtain chromosome preparations of bats**. *Revista da Universidade Rural, Série Ciência da Vida*. V.18, n.1-2. Seropédica: p.73-75.

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.

Baker RJ, Hamilton M and Parish DA (2003) **Preparations of Mammalian karyotypes under field conditions**. Occasional Pappers of Museum Texas Tech University 228:17.

Baker JB, Fonseca MF, Parish AD, Phillips JC e Hoffmann FG (2004). **New bat of the genus *Lophostoma* (Phyllostomidae: Phyllostominae) from Northwestern Ecuador**. Museum of texas tech university. Occasional Papers. Número 232.

Baker RJ, Olaf RP, Bininda-Emonds, Mantilla-Meluk H, Porter CA e Van Den Bussche R (2012). **Molecular timescale of diversification of feeding strategy and morphology in new world leaf-nosed bats (phyllostomidae): a phylogenetic perspective**. Museum of texas tech university. Occasional Papers

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

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.

D´avalos L M, Cirranello AL, Geisler JH e Simmons NB (2012). **Understanding phylogenetic incongruence: lessons from phyllostomid bats**. Biol. Rev.87, pp. 991–1024.

Datzmann T, Helversen OV e Mayer F. (2010). **Evolution of nectarivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia)**. BMC Evolutionary Biology, 10:165.

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

Dumont ER, Dávalos LM, Goldberg A, Santana SE, Rex K e Voigt CC (2012) **Morphological innovation, diversification and invasion of a new adaptive zone**. Proc. R. Soc. B 279, 1797–1805

Eick GN, Jacobs DS and Matthee CA (2005). **A nuclear DNA phylogenetic perspective on the evolution of echolocation an historical biogeography of extant bats (Chiroptera)**. Molecular Biology evolution 22: 1869-1886.

Esberard CEL, Martins LFS, Costa RC, Nunes MS, Luis EM, Chagas AS. (1997) **Aspectos da biologia de *Lonchorhina aurita* no estado do Rio de Janeiro (Mammalia: Chiroptera: Phyllostomidae)**. Bioikos, v.11, n.1-2. Campinas,p.46-49.

Fagundes, V, Scalzi-Martin JM, Hozier K.,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.

Ferguson-Smith MA, Yang F and O'Brien PCM (1998) **Comparative mapping using chromosome sorting and painting**. *ILAR J* 39: 68-76.

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

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 phylogeny**. Evol. Ecology Res 2: 317- 335

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

Gomes AJB *et al.* (2010) **Biogeographical karyotypic variation of *Rhinophylla fischeriae* (Chiroptera: Phyllostomidae) suggests the occurrence of cryptic species**. Comparative Cytogenetics 4: 79-85.

Gomes AJB, Nagamachi CY, Rodrigues LRR, Farias SG, Rissino JD, Pieczarka JC. (2012) **Karyotypic variation in *Rhinophylla pumilio* Peters, 1865 and comparative analysis with representatives of two subfamilies of Phyllostomidae (Chiroptera)**. Comparative Cytogenetics 6: 213-225.

Gomes AJB (2014) **Evolução cromossômica e filogenia em morcegos pertencentes a família phyllostomidae (mammalia, chiroptera)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pará, Belém-PA.

Guerra M (2004). **FISH - Conceitos e aplicações da citogenética**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.

Handley JR, Ochoa GJ. **New species of mammals from northern South America: a sword-nosed bat, genus *Lonchorhina* Tomes (Chiroptera: Phyllostomidae)**. Memoria de la sociedad de ciencias naturales LaSalle. V.47, Caracas: 1997, p.71-82.

Haiduk MW & Baker RJ (1982). **Cladistical analysis of G-banded chromosomes of nectar-feeding bats (Glossophaginae, Phyllostomidae)**. Systematic Zoology 31: 252-265.

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.

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.

Hsu T, Spirito SE e Pardue ML (1975). **Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes**. Chromosoma 53:25-36.

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.

Ventura K (2009). **Estudos de Citogenética e de Filogênia molecular em roedores da Tribo Akodontini**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo SP.

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.

Lear TL (2001). **Chromosomal distribution of the telomere sequence (TTAGGG)<sub>N</sub> in the Equidae**. Cytogenetic Cell Genet 93:127-130.

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

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 kariotypic evolution of the Asian muntjacs**. Cytogenet Cell Genet 63: 156-159.

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.
- 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 MC, 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.
- 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.
- 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 (1994). **Walker's mammals of the world**. Fifth Edition. Baltimore: The Jhonhs Hopkins Univ. Press.
- Nowak RM (1999). **Walker's mammals of the word**. 6. ed., Baltimore: Johns Hopkins University Press, v.1 p: 253-470.
- O'brien SJ, Menotti-Raymond M., Murphy WJ, Nash WG Wienberg J, Stanyon R, Copeland NG, Jenkins NA, Womack JE e Graves JMA. **The Promise of Comparative Genomics in Mammals**. Science, New Series, 286: 248-462 + 479-481, 1999.
- Patton JC e Baker RJ (1978). **Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoids 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.
- Pieczarka JC, Nagamachi CY, O'Brien PCM, Yang F, Ren W, Barros RMS, Noronha RCR, Rissino J, Oliveira EHC and Ferguson-Smith MA (2005) **Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera)**. Chromosome Research 13: 349 –347.
- Pieczarka JC, Gomes AJB, Nagamachi CY, Rocha DCC, Rissino JD, O'Brien PCM, Yang F and Ferguson-Smith MA (2013). **A phylogenetic analysis using multidirectional**

**chromosome painting of three species (*Uroderma magnirostrum*, *U. bilobatum* and *Artibeus obscurus*) of subfamily Stenodermatinae (Chiroptera-Phyllostomidae).** Chromosome Research 21: 383–392.

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 boliviense*, *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.

Ribas TFA, Rodrigues LRR, Nagamachi CY, Gomes AJB, Benathar TCM, O'Brien, PCM, Yang F, Ferguson-Smith MA, Pieczarka JC (2013) **Two new cytotypes reinforce that *Micronycteris hirsuta* Peters, 1866 does not represent a monotypic taxon.** BMC Genetics 14: 119.

Rojas D, Vale A, Ferrero V. e Navarro L. (2011). **When did plants become important to leaf-nosed bats? Diversification of feeding habits in the family Phyllostomidae** Molecular Ecology (2011) 20, 2217–2228

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.

Rex K, Czaczkas BI, Michener R, Kunz TH, Voigt CC (2010) **Specialization and omnivory in diverse mammalian assemblages.** *Ecoscience*, 17, 37–46.

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

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

Sotero-Caio CG, Volleth M, Gollahon LS, Fu B, Cheng W, Ng BL, Yang F e Baker RJ (2013) **Chromosomal evolution among leaf-nosed nectarivorous bats – evidence from cross-species chromosome painting (Phyllostomidae, Chiroptera).** *BMC Evolutionary Biology*, 13:276.

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, Nagamach 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.

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 e Geisler (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.

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.

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

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

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.

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.

Teeling EC, Dool S e Springer M (2012). **Phylogenies, fossils and functional genes: the evolution of echolocation in bats** em Gunnell GF, Simmons NB (eds): Evolutionary History of Bats: Fossils, Molecules and Morphology (Cambridge University Press, Cambridge).

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

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.

Velazco PM e Cadenillas R (2011). **On the identity of *Lophostoma silvicolum occidentale* (Davis & Carter, 1978) (Chiroptera: Phyllostomidae)** Zootaxa 2962: 1–20.

Velasco PM e Gardner AL (2012) **A new species of *Lophostoma* d'Orbigny, 1836 (Chiroptera: Phyllostomidae) from Panama.** Journal of Mammalogy, 93(2):605–614.

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

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.

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.

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.

Yang et al. (2003) **Reciprocal chromosome painting among human, aardvark, and elephant (superorder Afrotheria) reveals the likely eutherian ancestral Karyotype**. *PNAS* 4: 1062-1066.

## 6. ANEXO 1: METODOLOGIA DETALHADA

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída de espécimes pertencentes a seis gêneros da subfamília Phyllostominae, espécies: *Lophostoma brasiliense*, *L. carrikeri*, *L. schulzi*, *Phylloderma stenops*, *Chrotopterus auritus*, *Vampyrum spectrum*, *Trachops cirrhosus*, *Macrophyllum macrophyllum*.

### 6.2 COLETAS

Os exemplares são capturados a partir de populações naturais com o auxílio de rede de neblina “mist nets” de 12m X 3m, armadas até 3 metros acima do solo, preferencialmente, nos pontos onde há sinais de provável trajetória de vôo de morcegos. As visitas aos sítios de coleta devem ser realizadas em intervalos de meia hora, durante a primeira metade da noite (18:00 às 24:00H). Os animais capturados são devidamente acomodados em gaiolas e sacos de pano, em sua maioria processados em campo, onde são obtidas as preparações cromossômicas a partir da extração de medula óssea.

### 6.3 OBTENÇÃO DOS CROMOSSOMOS METAFÁSICOS

#### Técnica de Medula Óssea

Técnica de obtenção de suspensão celular através de extração direta da medula óssea, realizada segundo o protocolo descrito por Armada et al. (1996) e Baker et al. (2003), com modificações. Consiste nas seguintes etapas:

- Extração da medula óssea

Os animais coletados são sacrificados com anestesia local (vetanarcol ou xilocaína) e logo em seguida, com auxílio de material cirúrgico, um dos úmeros deve ser removido e retirado todo o tecido muscular. A parte óssea é quebrada, em uma placa de Petri contendo

meio nutritivo, com o auxílio de uma seringa toda a medula óssea deve ser retirada, sendo a parte óssea descartada.

➤ Colchicinização

Para obtenção das células em metáfase, é necessária a inibição do ciclo celular. Para isso, deve-se injetar intraperitonealmente um solução de colchicina a 0,025% na mesma proporção de 0,01mL para cada grama do animal, por um período de 40 minutos (colchicinização *in vivo*). Para o método de colchicinização *in vitro* deve ser utilizado cerca de 0,1ml de colchicina a 0,0016% juntamente com a solução de meio de cultura RPMI 1640 juntamente com soro bovino fetal (10% de SBF) por um período de 30-40 minutos.

➤ Hipotonização

A hipotonização consiste em adicionar 10mL de solução hipotônica de KCl 0,075 M com o intuito de aumentar o volume celular. A suspensão deve ser homogeneizada e mantida em estufa a 37°C durante 30 à 40 minutos. Após esse tempo acrescenta-se 2mL de fixador Carnoy (3mL de metanol: 1mL de ácido acético) em seguida o material é centrifugado a 1000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante é desprezado para posteriormente ser acrescentados 6ml de fixador no tubo e novamente ser centrifugado. O fixador deve ser trocado por duas vezes. O material obtido é deixado no tubo de centrifuga com fixador, mantido sempre gelado para preparo das lâminas.

#### 6.4 PREPARO DAS LÂMINAS

As lâminas utilizadas para microscopia devem ser previamente limpas e armazenadas em solução de etanol e éter etílico na proporção de 1:1. Para uso, são lavadas com água destilada e secadas em papel toalha. Em seguida sopra-se na lâmina, gerando uma película quente e úmida, e com o auxílio de um pipetador a suspensão celular gelada é

pingada na lâmina e transferida para um banho-maria a 50°C acondicionada sobre uma placa de alumínio. O choque térmico gerado faz com que as metáfases espalhem-se.

## 6.5 TÉCNICA DE COLORAÇÃO E BANDEAMENTOS CROMOSSÔMICOS

### 6.5.1 Técnica de Bandeamento G

O bandeamento G é obtido pelo método de tripsinização segundo Scheres (1972) com modificações. As metáfases, previamente envelhecidas em estufa a 60°C devem ser mergulhadas em solução de tripsina a 0,05%, parada a ação com tampão fosfato mais soro bovino fetal e em seguida coradas com Wright.

### 6.5.2 Técnica de Bandeamento C

O bandeamento C, para determinação da localização da heterocromatina constitutiva, é obtido de acordo com o protocolo de Sumner (1972), com modificações. As lâminas devem ser previamente envelhecidas por sete dias, em estufa a 37°C, em seguida colocadas em solução de Hidróxido de Bário ( $\text{BaOH}_2$ ) a 2% a 60°C por 2 minutos e passados rapidamente em solução de Ácido Clorídrico (HCl) a 0,1 N, posteriormente são incubadas em solução de 2XSSC a 60°C por 15 minutos, sendo os cromossomos corados com Wright na proporção de 3:1 de tampão fosfato.

### 6.5.3 Técnica de Coloração Ag-NOR

A coloração Ag-NOR para localização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) é realizada de acordo com Howell & Black (1980), com modificações, onde devem ser adicionadas sobre o material, duas gotas de solução reveladora de gelatina e uma gota de solução aquosa de Nitrato de Prata a 50%. Cobriu-se o material com uma lamínula, incuba-se em câmara úmida protegida da luz. A câmara úmida deve ser

colocada dentro de um banho-maria a 60°C por cerca de 5 minutos, até a solução de prata atingir uma coloração castanho-dourada. As lâminas de ser lavadas e secas e, em seguida, coradas com solução de Giemsa a 5%.

## 6.6 CAPTURA DAS IMAGENS E MONTAGENS DOS CARIÓTIPOS

As melhores metáfases com bandeamentos e coloração Ag-NOR são fotografadas em microscópio BX 41 Olympus, em campo claro e com objetiva de imersão (aumento de 100x) e montadas em ordem decrescente de tamanho com o sistema de captura de imagem e montagem de cariótipos SpectraView® (Applied Spectral Imaging - ASI). Posteriormente as metáfases devem ser montadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop Csn 2.

## 6.7 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE

### 6.7.1 FISH utilizando sondas teloméricas humanas

A sonda utilizada no procedimento de hibridização para determinação dos sítios de DNA telomérico é a *All Human Telomere – Oncor*, que consiste de seqüências teloméricas de DNA de cromossomos humanos marcadas com digoxigenina. O procedimento de hibridização *in situ* fluorescente é realizado de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

### 6.7.2 FISH utilizando sondas de DNAr

A sonda utilizada no procedimento de hibridização para determinação dos sítios de DNA ribossomal 18S e 28S provém de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galletti, 2004). As lâminas utilizadas neste experimento devem ser inicialmente encubadas em solução de 0,004% de RNase a 37°C por 30 minutos. Segue-se o protocolo utilizado no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Cambridge com modificações.

### **6.7.3 ZOO-FISH utilizando sondas cromossômicas totais de *Carollia brevicauda* e *Phyllosmus hastatus***

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente segue o protocolo utilizado no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Cambridge com modificações (Yang et al.,1995) que consiste basicamente nas seguintes etapas:

#### **6.7.3.1 Hibridização:**

As lâminas com pontos previamente marcados no microscópio em contraste de fase são incubadas em solução de pepsina 1% diluída em solução de HCl a 4,8 N durante 5 minutos para retirada de resto de citoplasma e impurezas que podem prejudicar a hibridização. Em seguida as lâminas devem ser lavadas em solução salina (2XSSC) por três vezes, durante 1 minuto cada.

As lâminas são desidratadas em bateria de álcool (70%, 70%, 90%, 90% e 100%) por 2 minutos cada, exceto no último álcool da série, onde permaneceram por 20 minutos. Em seguida devem secar ao ar e posteriormente incubadas em estufa a 60°C durante 1 hora.

Após esse período, as lâminas são desnaturadas em solução de formamida 70% a 64°C durante 40 segundos. Imediatamente após, as lâminas são colocadas em solução de álcool 70% previamente gelado durante 4 minutos para bloquear a ação da formamida. Em seguida as lâminas devem ficar imersas novamente em bateria de álcool.

As sondas são desnaturadas em banho-maria a 70°C durante 15 minutos. Após a desnaturação pinga-se a solução contendo as sondas sobre a lâmina, é colocado uma lamínula sobre ela sendo vedada com cola PVC. Posteriormente a lâmina é posta em câmara úmida e incubada em estufa a 37°C durante três dias.



### **6.7.3.2 Lavagem Pós- hibridização:**

Para a retirada de marcações inespecíficas, resultados de pareamentos com poucos pares de bases, as lâminas são incubadas em solução de formamida 50% a 42°C durante 5 minutos (duas vezes); em solução 2X SSC a 42°C por 5 minutos (duas vezes); em solução 4X SSC / Tween (0,2%) a 42°C por 4 minutos; e solução 4X SSC / Tween por 4 minutos à temperatura ambiente por três vezes.

### **6.7.3.3 Detecção e Contra coloração:**

#### **➤ Marcação direta:**

Quando as lâminas são hibridizadas com sondas diretamente marcadas com fluorocromo, deve-se pingar ser uma gota de Anti-fading Vectashield com DAPI (70 mg/mL). Posteriormente é colocado uma lamínula sobre a lâmina e retirado o excesso de Anti-fading com papel absorvente. Em seguida, as lamínulas são seladas com esmalte e espera-se o DAPI corar o material para em seguida ser levado para observação em microscópio de fluorescência.

#### **➤ Marcação indireta**

Caso a sonda seja marcada com moléculas repórteres ou haptenos, a lâmina terá que exposta a uma solução de detecção (0,4µ de CY3 + 200µL de Tween/4XSSC) e incubada a 37°C durante 30 minutos. Após esta etapa ela é deve passar três vezes por uma bateria de solução de Tween/4XSSC, durante 4 minutos cada. Repetem-se então as etapas correspondentes à marcação direta.

#### **6.7.4 Obtenção das Imagens**

As lâminas previamente hibridizadas devem ser analisadas em microscópio Zeiss Axiophot II, com objetivas de aumento de 100 vezes, ligados a um sistema de fluorescência com lâmpada de mercúrio HBO 100 W/2. Os sinais de hibridização e contracorante são detectados a partir de diferentes filtros (Chroma Technology) correspondentes ao comprimento de onda, no espectro da luz visível, que cada um possui. As imagens são capturadas em objetiva de imersão (aumento de 100x) com auxílio de câmera CCD Zeiss AxioCam controlada pelo software Axio Vision 3.1, acoplada ao microscópio. A edição das imagens (brilho e contraste, sobreposição de camadas, etc) é realizada com auxílio do programa Adobe Photoshop Cns 6.

## **7. ANEXO 2: Artigo oriundo dos dados obtidos no Mestrado**

**Título:** Evolução e diversidade cromossômica em cinco espécies de morcegos da subfamília Phyllostominae (Chiroptera, Phyllostomidae) revelados por análise comparativa de bandas e mapeamento cromossômico de sequências repetitivas do DNA.

**Autores:** Natalia Karina Nascimento da Silva<sup>1</sup>; Cleusa Yoshiko Nagamachi<sup>1</sup>; Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues<sup>2</sup>; Julio Cesar Pieczarka<sup>1</sup>

**Instituições:** <sup>1</sup>Laboratório de Citogenética, ICB, Universidade Federal do Pará, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Genética e Biodiversidade, ICED, Universidade Federal do Oeste do Pará, Brasil.

**Palavras chave:** Phyllostominae, citogenética, bandeamento cromossômico, DNA repetitivo, evolução cariotípica

**Título curto:** Evolução cromossômica em Phyllostominae (Chiroptera, Phyllostomidae)

## Resumo

A subfamília Phyllostominae consiste de 9 gêneros e 20 espécies divididas em três tribos, distribuídas na região Neotropical, essa subfamília exhibe notável variação cariotípica entre seus membros. No presente estudo realizamos uma análise comparativa e o mapeamento das sequências repetitivas nos cariótipos entre cinco espécies representativas da subfamília: *Phylloderma stenops* (2n=32 NF=58) (Tribo Phyllostomini), *Trachops cirrhosus* (2n=30 NF=56) e *Macrophyllum macrophyllum* (2n=34 NF=62) (tribo Macrophyllini) e *Chrotopterus auritus* (2n=28 NF=52) e *Vampyrum spectrum* (2n=30 NF=56) (tribo Vampyrini), utilizando técnicas de bandeamento cromossômico e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNA ribossomal 18S e 45S. Descrevemos um novo citótipo para *M. macrophyllum* (2n=34 NF=62). O bandeamento C detectou a heterocromatina na região pericentromérica da maioria das espécies analisadas, contudo, *V. spectrum* apresentou adições de heterocromatina em regiões paracentroméricas, observadas nos cromossomos 3, 8, 10 e 13. A maioria das espécies abriga um único par cromossômico portador do sítio de rDNA, entretanto *M. macrophyllum* abriga dois pares de sítios de rDNA. O mapeamento das sequências teloméricas em *M. macrophyllum* revelou a presença de sítios teloméricos intersticiais (ITS) presente nos braços longos de quatro pares metacêntricos. A análise comparativa entre as cinco espécies representativas das três tribos e com relação ao cariótipo basal, sugerem uma extensa diferenciação cromossômica onde translocação recíprocas de braços (WART) tiveram um papel importante na divergência dos cariótipos da subfamília Phyllostominae.

## Introdução

A família Phyllostomidae constitui a terceira maior família dentro da Ordem Chiroptera em número de espécies (Simmons, 2005). O sucesso da radiação adaptativa conquistada por essa família diz respeito à diversidade de nichos ecológicos e a ampla variedade de hábitos alimentares a que eles podem estar associados como: insetívoros, nectarívoros, polinívoros, frugívoros, carnívoros, piscívoros, onívoros ou hematófagos (Wetterer et al. 2000; Baker et al, 2003a, Baker et al, 2012).

Os morcegos filostomíneos são exclusivos do Novo Mundo, formam um clado monofilético, apoiado por várias classes de dados (Koopman, 1993; Wetterer et al. 2000; Jones et al., 2002; Simmons et al 2005; Baker et al, 2003a). As filogenias geradas por dados de sequência de DNA nuclear ou mitocondrial apoiam a divisão em três linhagens bem definidas, organizadas em três tribos: Phyllostomini (gêneros *Phyllostomus*, *Tonatia*, *Mimon*, *Phylloderma* e *Lophostoma*); Macrophyllini (gêneros *Trachops* e *Macrophyllum*, ambos monotípicos) e Vampyrini (gêneros *Chrotopterus* e *Vampyrum*, ambos monotípicos). Todavia fornecem pouca resolução para as relações filogenéticas entre elas, sendo observadas diferenças topológicas com relação ao posicionamento destas tribos (Baker et al. 2003a; Lee et al., 2002; Porter et al., 2003; Hoffmann et al. 2008; Datzmann et al., 2010; Rojas et al., 2011).

Análises comparativas anteriores, demonstram que Phyllostominae apresenta diferentes taxas de evolução cromossômica entre os gêneros, onde a maioria das espécies do grupo apresenta grande similaridade de cromossomos inteiros e braços cromossômicos, onde a provável tendência evolutiva seria a redução do número diploide por eventos de fusão cêntrica, com a retenção do grupo de ligação. Sendo possível a comparação por meio de bandeamentos cromossômicos, inclusive com membros de outras subfamílias de

Phyllostomidae, como por exemplo, Phyllostominae (Patton e Baker, 1978; Rodrigues et al., 2000; Barros et al., 2009; Gomes et al., 2012), Glossophaginae (Haiduk & Baker, 1982; Ribeiro et al., 2003) e Stenodermatinae (Souza e Araújo, 1990; Silva et al., 2005; Pieczarka et al., 2013).

Entretanto, gêneros como *Tonatia* e algumas espécies do gênero *Lophostoma* que são caracterizados por sua alta taxa de evolução cariotípica, com cariótipos derivados por extensos rearranjos cromossômicos, tornando praticamente impossível o reconhecimento dos eventos que levaram a diferenciação cariotípica entre eles por bandeamento clássico (Patton e Baker, 1978; Baker, 1979; Baker e Bass, 1979, Baker e Bickham, 1980; Arnold et al. 1983; Santos e Sousa, 1998, Rodrigues et al., 2000, Ribas et al., 2015).

A organização dos genomas eucariotos incluem diferentes classes de DNA repetitivos que desempenham um papel importante nas variações genéticas dentro e entre espécies (Biémont, 2008), podendo estar envolvidos nos processos de rearranjos cromossômicos e diversificação cariotípica (Ruiz-Herrera et al., 2008). O mapeamento de diferentes classes de DNA repetitivos tem auxiliado na compreensão da evolução cromossômica dentro de várias subfamílias de Phyllostomidae (Gomes et al., 2010, 2012; Santos et al., 2002; Faria et al. 2009; Ribas et al., 2013; Calixto et al. 2013) podendo representar marcadores cromossômicos para detectar eventos evolutivos (Elder e Turner, 1995; Raskina et al., 2008).

A análise comparativa por bandeamento e mapeamento de sequências repetitivas mostrou ser uma importante ferramenta independente na compreensão da diversificação dos cariótipos dos morcegos da família Phyllostomidae e relações filogenéticas do grupo (Baker and Bickham 1980; Baker et al. 1987, 1989; Rodrigues et al., 2000, Barros et al., 2009; Gomes et al., 2012; Calixto et al., 2013).

O objetivo deste estudo foi contribuir para um maior entendimento da diferenciação cromossômica dos morcegos da subfamília Phyllostominae, através da análise de cinco espécies, representantes das três tribos: *Phylloderma stenops* (Tribo Phyllostomini), *Trachops cirrhosus* e *Macrophyllum macrophyllum* (tribo Macrophyllini) e *Chrotopterus auritus*, *Vampyrum spectrum* (tribo Vampyrini), por meio de bandeamentos G, C, Ag-NOR e hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Estas informações foram utilizadas em uma análise comparativa entre os gêneros representantes das três tribos permitindo identificar rearranjos cromossômicos que ocorreram na diversificação cariotípica dessas espécies e comparamos ao cariótipo ancestral proposto para a subfamília já publicado anteriormente (Pieczarka et al., 2013), buscando ainda gerar novos dados que podem ser utilizados como caracteres filogeneticamente informativos para reconstrução de filogenias cromossômicas para a família Phyllostomidae.

## **Material e Métodos**

### **Espécimes analisados**

As análises citogenéticas foram realizadas em amostras coletadas no Brasil, sendo cinco espécimes (3M, 2F) de *Chrotopterus auritus* Peters, 1856 provenientes de Itaituba (S 4°28'20.5"; W 56°17'03,7") estado Pará, quatro (2M/2F) *Macrophyllum macrophyllum* Gray, 1838 provenientes de Itaituba (S 4°28'20.5"; W 56°17'03,7"), estado do Pará, dois (1M/1F) *Trachops cirrhosus* Spix, 1823 provenientes de Urucará (S 02°28'6,3"; W 55°59'37,2" estado do Amazonas e Juruti estado do Pará, dois (2F) *Vampyrum spectrum* Linnaeus, 1815 oriundos de Urucará (S 02°23'12.1"; W 57°38'22,0") e Itacoatiara, estado

do Amazonas e um espécime macho de *Phylloderma stenops* Urucurá (S 02°23'12.1"; W 57°38'22,0"), estado do Amazonas.

Os morcegos foram capturados a partir de populações naturais com o auxílio de redes de neblina. As preparações cromossômicas e biópsias de tecido foram enviadas para o Laboratório de Citogenética da Universidade Federal do Pará, em Belém. Os espécimes foram fixados em formol a 10%, conservados em etanol 70% e depositados na coleção de mamíferos do Museu Paraense Emílio Goeldi.

#### Preparações cromossômicas e bandeamentos

As preparações cromossômicas foram obtidas pelo método de extração direta da medula óssea segundo o protocolo descrito por Baker *et al.* (2003b). Os padrões de bandas G foram obtidos utilizando solução de tripsina de acordo com Seabright (1971), com posterior incubação em solução salina (0,5XSSC) a 60° C e coloração com solução de Wright segundo Verma e Babu (1995). O bandeamento C foi realizado segundo Sumner (1972) e a marcação das Regiões Organizadoras de Nucléolos seguiu Howell & Black (1980). Os cariótipos foram organizados em ordem decrescente de tamanho dos cromossomos.

#### Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH)

A Hibridização *In Situ* Fluorescente utilizando sondas teloméricas marcadas com digoxigenina (*All Human Telomere* – Oncor) foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para confirmação da posição da NOR, sondas de rDNA 18S e 45S foram amplificadas por BAC (Bacterial Artificial Chromosome), marcadas com dUTP-biotina por nick translation e posteriormente detectadas com avidina-Cy3 ou FITC,



de acordo com Hatanaka e Galetti Jr (2004). As imagens foram capturadas com o auxílio da câmera CCD Zeiss Axiocam controlada pelo software Axiovision 3.0, acoplada a um microscópio Zeiss Axioplan 2. Os cromossomos foram identificados de acordo com sua morfologia e padrões de bandas invertidas usando DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

## Resultados

O cariótipo de *P. stenops* apresenta  $2n=32$  e  $NF=58$ , composto por 14 pares de cromossomos de dois braços (metacêntricos, submetacêntricos) e 1 par de cromossomos acrocêntricos. O cromossomo X é submetacêntrico de tamanho médio (Figura 1). A heterocromatina constitutiva (HC) ocorre na região pericentromérica de todos os cromossomos. A hibridização *in situ* com sondas teloméricas ocorreu nas extremidades de todos os cromossomos (Figura 2). A hibridização *in situ* com sondas de DNA ribossomal 18S confirmou a localização da NORs somente no par acrocêntrico (Figura 3).

*C. auritus* apresenta  $2n=28$  e  $NF=52$ , sendo o complemento autossômico constituído por 13 pares de cromossomos de dois braços (metacêntricos e submetacêntricos). O X é submetacêntrico de tamanho médio e o Y acrocêntrico pequeno (Figura 1). A técnica de bandeamento C demonstra que a HC está localizada na região pericentromérica de todos os cromossomos autossômicos e no cromossomo X, enquanto que o Y apresenta-se como um cromossomo puntiforme com pouca heterocromatina. As sequências teloméricas foram observadas nas extremidades de todos os cromossomos (Figura 2). As sondas de rDNA confirmaram a presença de NORs na região proximal do braço longo do cromossomo 2 (Figura 3).

Nos espécimes de *V. spectrum* foi observado  $2n=30$  e  $NF=56$ , compreendendo 14 pares de cromossomos de dois braços (metacêntricos e submetacêntricos). O cromossomo

X é submetacêntrico de tamanho médio (Figura 1). A HC ocorre na região pericentromérica de todos os cromossomos. Adições de HC foram observadas para os pares (3, 8, 10 e 13). A hibridização *in situ* com sondas teloméricas ocorreu somente nas extremidades de todos os cromossomos (Figura 2). A hibridização *in situ* com sondas de DNA ribossomal revelou somente um sítio de NOR localizado na região proximal do braço longo do par 1 (figura 3).

*M. macrophyllum* apresenta  $2n=34$  e  $NF=62$ , composto por 14 pares de cromossomos de dois braços (metacêntricos e submetacêntricos) e 2 pares de cromossomos acrocêntricos. O cromossomo X é submetacêntrico de tamanho médio. O cromossomo Y é um acrocêntrico pequeno (Figura 1). A HC ocorre na região pericentromérica de todos os cromossomos. As sequências teloméricas foram observadas nas extremidades de todos os cromossomos, adicionalmente foi observado sinais de sequências em sítios não-teloméricos espalhados em braços cromossômicos (Figura 2). A hibridização *in situ* com sondas de DNA ribossomal 18S confirmou a localização da NORs nos dois pares acrocêntricos, par 15 e 16 (Figura 3).

*T. cirrhosus* apresenta  $2n=30$  e  $NF=56$ , composto por cromossomos de dois braços (metacêntricos, submetacêntricos e subtlocêntricos). O cromossomo X é subtlocêntrico e o Y acrocêntrico (Figura 1). A HC ocorre nas regiões pericentroméricas de todos os autossomos e no braço curto do cromossomo X. O cromossomo Y apresenta-se quase que totalmente heterocromático. A hibridização *in situ* com sondas teloméricas ocorreu somente nas extremidades dos cromossomos (figura 2). A hibridização *in situ* com sondas de DNA ribossomal 18S confirmou a localização da NORs somente no par 11 (Figura 3).

A análise comparativa por bandeamento permitiu identificar cinco pares de cromossomos compartilhados entre as cinco espécies. Os cariótipos das espécies *T. cirrhosus*, *M. macrophyllum* e *P. stenops* possuem quase todos os pares cromossômicos

compartilhados entre si quando comparados ao das espécies *C. auritus* e *V. spectrum* que apresentaram as formas cariotípicas mais derivadas quando comparadas ao cariótipo ancestral para subfamília.

## **Discussão**

### Variação cariotípica

O cariótipo de *Chrotopterus auritus*  $2n=28$  e  $NF=52$  analisado neste trabalho está de acordo com os estudos realizados por Yonenaga *et al.* (1969) e Morielle-Versute *et al.* (1992). *Trachops cirrhosus*  $2n=30$  e  $NF=56$  apresentou cariótipo semelhante aos exemplares coletados no México, Guiana e Trinidad e Tobago (Baker, 1967; 1979; Baker e Hsu, 1970), mas diferindo dos espécimes coletados no estado de Pernambuco, Brasil (Barros *et al.*, 2009), cujo X é acrocêntrico. Tal diferença pode ser explicada pela presença de um bloco heterocromático no braço curto do X em nossos exemplares.

Para três das cinco espécies analisadas (*P. stenops*, *V. spectrum* e *M. macrophyllum*), pela primeira vez, foram realizadas técnicas de bandeamentos cromossômicos, uma vez que, apenas dados de coloração convencional haviam sido previamente publicados (Baker e Hsu, 1970; Baker, 1973; Baker, 1979; Baker *et al.*, 1982; Santos *et al.*, 2002). Os espécimes de *Phylloderma stenops* estudados nesse trabalho apresentaram  $2n=32$  e  $NF=58$  estando de acordo com os dados já publicados (Baker e Hsu, 1970; Baker, 1979; Santos *et al.*, 2002). Os espécimes de *Vampyrum spectrum*  $2n=30$  e  $NF=56$  apresentaram cariótipo semelhante ao publicado por Baker e Hsu (1970) e Baker (1979) para animais coletados em Trinidad (atual Trinidad e Tobago).

Espécimes de *M. macrophyllum* analisados neste trabalho, apresentaram  $2n=34$ ,  $NF=62$ . No entanto Baker *et al.* (1982), apresentaram  $2n=32$ ,  $NF=56$  para espécimes coletados no Suriname. Além disso, o cariótipo sugerido para o gênero *Macrophyllum* (in

Baker et al. 1982), foi mostrado pelos autores apenas em uma tabela. De todo modo assumimos que essa diferença de número diploide seria produto de rearranjo cromossômico do tipo fusão/fissão.

A ocorrência de diferenças de número diplóide entre populações de morcegos já foram documentadas para outras espécies, gerando pelo menos duas explicações possíveis para essa variação, tratar-se de um complexo de espécies, como reconhecido para os morcegos da espécie *Rhogeessa tunida*, atualmente dividida em oito diferentes espécies (Baird et al., 2012) ou ser interpretado como espécies que apresentam raças cromossômicas, como exemplo *Uroderma bilobatum* (Baker , 1967; Baker et al. 1972; Baker et al . 1979; Silva et al . 2005, Pieczarka et al. 2013), *Rhinophylla pumilio* (Baker e Bickham 1980, Honeycutt et al., 1980, Baker et al., 1981, Gomes et al., 2012) e *Micronycteris hirsuta* (Baker et al., 1973; Baker, 1979; Fonseca et al., 2007, Ribas et al., 2013). Uma análise com amostras de cariótipos de indivíduos ao longo da área de distribuição de *M. macrophyllum* como também utilizando outras metodologias é necessário para supor se esta variação seria uma variação intraespecífica ou espécies biologicamente distintas.

Um padrão pericentromérico de distribuição da heterocromatina constitutiva foi observado em *C. auritus*, *T. cirrhosus*, *M. macrophyllum* e *P. stenops* essa distribuição é comumente encontrado em morcegos filostomídeos já descritos na literatura (Varella-Garcia et al., 1989; Santos e Sousa, 1998; Rodrigues et al., 2000; Santos et al., 2002). O cromossomo Y de *T. cirrhosus* é quase inteiramente heterocromático, como observado por Barros et al. (2009). Por outro lado, o cromossomo Y de *C. auritus* e *M. macrophyllum* apresentaram heterocromatina pouco evidente, sendo puntiforme. Confirmamos a provável tendência observada em genomas de morcegos, que seria a redução do tamanho dos genomas com redução ou ausência de elementos repetitivos de DNA (Van den Bussche et al., 1995),

morcegos apresentam os menores conteúdo C-DNA quando comparados a outros mamíferos (Hughes e Hughes, 1995; Gregory. 2000; Redi et al., 2005; Redi e Capanna, 2012).

Encontramos para *V. spectrum* além da distribuição pericentromérica da HC, adições de heterocromatina em regiões paracentroméricas, observadas nos cromossomos 3, 8, 10 e 13, diferindo do padrão comumente encontrado para a família, que seria pequenos blocos localizados na região do centrômero (Morielle-Versute *et al.*, 1992; Rodrigues et al., 2000; Barros et al., 2009). Essa distribuição pode representar uma condição derivada somente para esse gênero monotípico. Análises incluindo indivíduos de outras populações ao longo de sua distribuição poderá sugerir uma implicação intraespecífica dessa distribuição paracentromérica da heterocromatina constitutiva. Distribuição incomum da HC para além da região pericentromérica também foram observadas no gênero *Glauconycteris beatrix*, da família Vespertilionidae (Volleth e Heller, 2007).

#### Sequências de DNA repetitivos

Identificação dos sítios de DNA ribossomal tem sido bem estudados em morcegos, sendo observado como condição mais frequente a ocorrência em apenas um único sítio de rDNA na maioria das espécies analisadas, sendo múltiplos sítios de rDNA considerados incomuns (Morielle e Varella-Garcia, 1988; Rodrigues *et al.*, 2000; Neves et al., 2001; Ribeiro et al., 2003; Santos et al., 2002; Barros et al., 2009, Calixto et al., 2013).

Nas espécies *V. spectrum* e *C. auritus* um único sítio de rDNA foi observado na região proximal do braço longo dos cromossomos 1 e 2, respectivamente. Em *T. cirrhosus* o sítio de rDNA localiza-se na região distal do braço longo de um pequeno metacêntrico (par 11) e para *P. stenops* o sítio de rDNA ocorre na região proximal do braço curto do par 15, para *M. macrophyllum* observamos dois sítios de rDNA (pares 15 e 16). As localizações de distribuição dos sítios de rDNA não apresentam sintonia conservada entre as espécies

analisadas neste trabalho, é provável que as diferenças em número e posição desses genes podem ser resultado da reorganização cromossômica que ocorreu durante a divergência desses gêneros como observado para outros morcegos filostomídeos (Morielle e Varella-Garcia, 1988; Rodrigues *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002; Barro *et al.*, 2009, Calixto *et al.*, 2013).

A distribuição das sequências teloméricas (TTAGG)<sub>n</sub> nos cromossomos tem sido observada principalmente nos telômeros, sendo a presença das sequências em sítios não-teloméricos (ITS) relacionada a diferentes origens (Multani *et al.*, 2001, Faria *et al.* 2000, Rovatsos *et al.*, 2011, Ventura *et al.*, 2004). Marcações teloméricas foram observadas na extremidade de todos os cromossomos dos gêneros analisados, para *M. macrophyllum* além das sequências teloméricas distais, encontramos ITS presentes nos braços dos cromossomos 1, 2, 3 e 4. Não foi observada nenhuma correspondência entre esses sinais de ITS com regiões heterocromáticas pericentroméricas identificada no bandeamento C para essa espécie e o padrão de bandeamento G para esses braços cromossômicos demonstra que estes pares estão conservados nas demais espécies da subfamília, sugerindo que essas marcações teriam surgido de expansões de sequências repetitivas (TTAGG)<sub>n</sub> não-teloméricas intercalando as regiões eucromáticas (Multani *et al.*, 2001) e que não estão relacionadas com pontos de rearranjos cromossômicos.

#### Análise Comparativa

Embora não tenha sido possível apenas por bandeamento G estabelecer a homeologia completa dos genomas das espécies aqui estudadas, cinco pares cromossômicos (pares 3, 4, 5, 8 e 10 de *T. cirrhosus*; 4, 3, 5, 10 e 12 de *V. spectrum*; 3, 5, 6, 9 e 12 de *C. auritus*, 3, 4, 5, 8 e 10 de *M. macrophyllum* e 3, 4, 5, 8 e 10 de *P. stenops*)

se mantiveram conservados após a divergência das cinco linhagens, sugerindo que estavam presentes no ancestral comum sendo caracteres simplesiomórficos.

Pieczarka et al. (2013), propõem um cariótipo ancestral para Phyllostomidae, com  $2n=42$  e  $NF=60$ , semelhante ao cariótipo do gênero *Phyllostomus* (Phyllostomini, Phyllostominae). Dos cinco pares de cromossomos encontrados conservados nos gêneros analisados aqui, três encontram-se inalterados no cariótipo ancestral proposto para a família, correspondentes aos metacêntricos pares 3, 8 e 10 de *Phyllostomus*. Portanto os dois outros cromossomos conservados exclusivos de Phyllostominae devem ser marcadores da subfamília.

Foi possível a identificação quase completa por bandeamento G das homeologias cromossômicas entre as espécies da tribo Macrophyllini analisados aqui (*T. cirrhosus*  $2n=30$  e  $NF=56$  e *M. macrophyllum*,  $2n=34$ ,  $NF=62$ ) diferindo por apenas três pares de cromossomos (12, 15 e 16 em *M. macrophyllum*). Os pares 11 e 14 de *P. hastatus*, são preservados e referidos como parte do cariótipo ancestral para a família, esses dois pares apresentam sintenia conservada em várias subfamílias (Pieczarka et al., 2005; Gomes et al., 2012; Pieczarka et al., 2013). Os gêneros, *Trachops* e *Macrophyllum* também compartilham esses pares cromossômicos para os pares com mesma numeração, 11 e 14 respectivamente. No entanto, pelo padrão de comparação por bandas a identificação desses pares não foi possível para os gêneros *Vampyrum* e *Chrotopterus* estando reorganizados.

Pieczarka et al. (2013) sugerem quatro sinapormofias cromossômicas (pares 1, 2, 4 e 7) para a subfamília Phyllostominae identificadas a partir de *P. hastatus* (tribo Phyllostomini). A forma conservada desses quatro cromossomos foi observada por bandeamentos e FISH em outros gêneros para a tribo, como *Mimon* e *Lophostoma* (Gomes et al., 2010; Ribas et al., 2015) sendo sugerido como caracteres sinapomorficos para a tribo

Tribo Phyllostomini (Ribas et al., 2015). Nossa análise das espécies da tribo Macrophyllini permitiu identificar essas quatro formas conservadas correspondentes aos cromossomos 1, 2, 4 e 7 em *T. cirrhosus* e *M. macrophyllum* respectivamente.

Esses caracteres provavelmente representam sinapomorfias que sustentam o relacionamento entre essas duas tribos, já que esses pares cromossômicos não apresentam forma conservada nas espécies representantes da tribo Vampyrini.

Em *Phylloderma stenops* encontramos cariótipo bastante semelhante aos cariótipos dos gêneros *T. cirrhosus* e *M. macrophyllum*. *P. stenops* difere do cariótipo de *T. cirrhosus* por três pares de cromossomos pares 11, 12 e 15 em *P. stenops*. A diferença entre os cariótipos de *M. macrophyllum* e *P. stenops* é referente aos pares 12 e 16 em *M. macrophyllum*. O cariótipo de *P. stenops* é muito semelhante ao gênero *Phyllostomus*, onde todas as espécies, apresentam  $2n=32$  diferindo pelos  $NF=58$  ou  $NF=60$  (Baker, 1973,1979; Honeycutt et al.,1980; Rodrigues et al. 2000; Santos et al. 2002; Gomes et al. 2012, Pieczarka et al., 2013).

A principal diferença encontrada entre o cariótipo deste grupo diz respeito a forma do par 15 (metacêntrica ou acrocêntrica). A condição basal ou derivada da forma metacêntrica encontrada entre os membros deste grupo vem sendo amplamente discutida na literatura, onde sugerem pelo menos três hipóteses para condição metacêntrica deste par, para Rodrigues et al. (2000), seria produto de uma fusão a partir de dois pares de cromossomos acrocêntricos de *Macrotus waterhousii* considerada uma condição primitiva encontrada em *P. discolor* e compartilhada com *Mimon crenulatum* (Patton e Baker, 1978), para os demais membros do grupo *P. hastatus*, *P. elongatus*, *P. latifolius* e *P. stenops* esses compartilhariam a forma acrocêntrica derivada. Dados de Gomes et al. (2012) identificam a forma metacêntrica deste par para espécies de outra subfamília de Phyllostomidae, sugerindo que a forma de dois braços não seria produto de rearranjos e sim resultado de amplificação de sítios de DNA ribossomal,



expansão de heterocromatina constitutiva, mesmo reposicionamento centromérico, dessa forma entendida como um caracter autopomórfico. Recentemente Ribas et al. (2015), em uma análise por pintura cromossômica para três gêneros da tribo Phyllostomini, sugerem que a forma metacêntrica seria apomórfica em *P. discolor* e a forma acrocêntrica uma sinapomorfia para *P. hastatus* e *L. silvicola*.

Em nossa análise comparativa a condição acrocêntrica do par 15 seria basal para a subfamília, compartilhada por *P. stenops* assim como por *M. macrophyllum* membro da tribo Macrophyllini. Seguimos Pieczarka et al. (2013), onde sugerem a condição acrocêntrica do par 15 como pertencente ao cariótipo basal para subfamília Phyllostominae. Para os demais gêneros analisados aqui não foi possível identificar correspondência para este par possivelmente envolvido em outros rearranjos cromossômicos.

A tribo Vampyrini (*V. spectrum* e *C. auritus*) possui duas homeologias exclusivas, o braço longo do cromossomo portador da NOR nas duas espécies e os cromossomos correspondentes ao par 7 em *C. auritus* e ao par 11 em *V. spectrum*, que não foram observados em nenhuma outra espécie de morcegos da subfamília Phyllostominae. Foram observados mais dois pares de cromossomos inteiros compartilhados entre *V. spectrum* (pares 9 e 14) e *C. auritus* (pares 8 e 13), mas diferente em *T. cirrhosus* e *M. macrophyllum* (pares 7 e 9). Essa diferença pode ser explicada por um rearranjo tipo inversão pericêntrica ocorrido nas espécies da tribo Macrophyllini. Para os demais cromossomos de *V. spectrum* não foi possível encontrar homeologias entre as outras espécies, a distinção do cariótipo de *V. spectrum* também é suportada por um diferente padrão de distribuição da heterocromatina, para quatro pares de cromossomos, este padrão não é encontrado nas demais espécies estudadas aqui.

As cinco espécies analisadas aqui compartilham vários braços cromossômicos conservados, porém constituindo diferentes cromossomos metacêntricos em cada cariótipo. Isso demonstra que eventos como translocações Robertsonianas ocorreram em várias combinações que levaram a diferenciação dos cariótipos destas espécies. Nossos dados corroboram estudos anteriores que sugerem que a evolução cromossômica em morcegos é amplamente impulsionada por eventos de translocações Robertsonianas (Ao *et al.* 2006, 2007, Mao *et al.* 2007, 2008, 2010).

Segundo modelo proposto por Baker e Bickham (1986), a presença de cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos com homologia monobraquial são resultado de independentes fusões de cromossomos acrocêntricos homólogos para diferentes acrocêntricos não homólogos, ou ainda a troca de braços entre dois cromossomos metacêntricos e um acrocêntrico, conhecida com translocação recíproca de braços (WART). Como resultado cromossomos metacêntricos tem apenas um braço que são homólogos, o que é suficiente para resultar em isolamento reprodutivo instantâneo. Esse tipo raro de especiação havia sido relatado em alguns mamíferos (Baverstock *et al.*, 1986; Hirai *et al.*, 2005; Veyrunes *et al.* 2007) incluindo morcegos dos gêneros *Rhogeessa* (Baker e Bickham, 1986; Baird *et al.*, 2009) e *Rhinolophus* (Volleth *et al.* 2015). Identificamos a presença das translocações recíprocas entre braços cromossomos (WART) para os pares 1, 2 e 3 de *V. spectrum*. Além disso, baseados no cariótipo ancestral proposto (Pieczarka *et al.*, 2013) observamos que independentes translocações foram responsáveis pela diversificação cariotípica observada entre as linhagens desta subfamília. Assim, nossos resultados sugerem especiação cromossômica por fusões cêntricas monobraquial (Baker e Bickham, 1986), as quais tiveram um papel importante na divergência dos cariótipos da subfamília Phyllostominae, e em particular para a tribo Vampyrini. Acreditamos que estudos

citogenéticos adicionais, como análises utilizando pintura cromossômica, são necessários para investigar em detalhes a evolução cromossômica dos membros desta subfamília.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao grupo de Quiroptera do Laboratório de Citogenética da UFPa pela ajuda no trabalho de campo e preparações cromossômicas; à Sapopema, Conservação Internacional do Brasil, Rio e Aotus Consultoria Ambiental pelo apoio logístico para a coleta das amostras.; Dr. Anderson José Baia Gomes por sugestões a ajuda com a análise filogenética; à Maria da Conceição e Shirley Nascimento por ajuda com o trabalho no laboratório; ao CNPq, FAPESPA, CAPES e BNDES pelo apoio financeiro. A coleta das amostras foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).

### **Referências Bibliográficas**

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.

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).

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, Atchley WR and McDaniel VR Karyology and morphometrics of Peter's tent-making bat, *Uroderma bilobatum* (Chiroptera, Phyllostomatidae). *Syst Zool* 21:414-429. (1972).

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. Stecial 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 Pappers of Museum Texas Tech University* 230: 1–32. (2003a).

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

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).

Baird AB, Marchán-Rivadeneira MR, Pérez SG, Baker RJ: Morphological analysis and description of two new species of *Rhogeessa* (Chiroptera: Vespertilionidae) from the Neotropics. *Occ Pap Mus Tex Tech Univ* 307: 1–25 (2012).

Biémont C: Within-species variation in genome size. *Heredity* 101:297-298. (2008).

Calixto M. S., Andrade I. S., Cabral-de-Mello D. C., Santos N., Martins C., Loreto V., Souza M. J. Patterns of rDNA and telomeric sequences diversification: contribution to repetitive DNA organization in Phyllostomidae bats *Genetica*. (2013)

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

Datzmann T, von Helversen O, Mayer F Evolution of nectarivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia). *BMC Evol Biol* 10:165(2010).

Faria KC, Marchesin SRC, Moreira PRL, Beguelini MR, Morielle- Versute E New insights into telomeric DNA sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> location in bat chromosomes. *Genet Mol Res* 8(3):1079–1084 (2009).

Fonseca RM, Hooper SR, Porter CA, Cline CA, Parish DA, Hoofman FG, Baker RJ: Morphological and molecular variation within little big-eared bats of genus *Micronycteris* (Phyllostomidae: Micronycterinae) from San Lorenzo, Ecuador. *Univ of California Publicat Zool*, 134:1–981. (2007).

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).

Gomes AJB, Rodrigues LRR, Rissino JD, Nagamachi CY, Pieczarka JC Biogeographical karyotypic variation of *Rhinophylla fischeriae* (Chiroptera, Phyllostomidae) suggests the occurrence of cryptic species. *Comparative Cytogenetics* 4: 79–85. (2010).

Gomes AJB, Nagamachi CY, Rodrigues LRR, Farias SG, Rissino JD, Pieczarka JC Karyotypic variation in *Rhinophylla pumilio* Peters, 1865 and comparative analysis with representatives of two subfamilies of Phyllostomidae (Chiroptera). *Comp Cytogenet* 6(2):213–225 (2012).

Gregory TR: Nucleotypic effects without nuclei: genome size and erythrocyte size in mammals. *Genome* 43: 895–901 (2000).

Hatanaka, T., Galetti, P.M.Jr Mapping of 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239 - 244.( 2004).

Haiduk MW, Baker RJ Cladistical analysis of G-banded chromosomes of nectarfeeding bats (Glossophaginae, Phyllostomidae). *Systematic Zoology* 31: 252–265. (1982).

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).

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).

Koopman KF 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 (1993).

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).

Ribas TF, Rodrigues LR, Nagamachi CY, Gomes AJ, Benathar TC, Yang F, et al. Two new cytotypes reinforce that *Micronycteris hirsuta* Peters, 1869 does not represent a monotypic taxon. *BMC Genet*;14(1):119 (2013).

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

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).

Pieczarka JC, Gomes AJB, Nagamachi CY, Rocha DCC, Rissino JD, O'Brien PC, et al. A phylogenetic analysis using multidirectional chromosome painting of three species

(*Uroderma magnirostrum*, *U. bilobatum* and *Artibeus obscurus*) of subfamily Stenodermatinae (Chiroptera-Phyllostomidae). *Chromosome Res*; 21: 383–92. (2013)

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

Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: Speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res.*;120:351–7 (2008).

Redi CA, Zacharias H, Merani S, Oliveira Miranda M, Aguilera M, et al: Genome sizes in Afrotheria, Xenarthra, Euarchontoglires, and Laurasiatheria. *J Hered* 96: 485–493 (2005).

Redi C.A. e Capanna E. (2012) Genome Size Evolution: Sizing Mammalian. *Cytogenet Genome Res*;137:97–112

Ribeiro NAB, Nagamachi CY, Pieczarka JC et al Cytogenetic analysis in species of the subfamily Glossophaginae (Phyllostomidae-Chiroptera) supports a polyphyletic origin. *Caryologia (Firenze)* 56:85–95 (2003).

Rojas D, Vale A, Ferrero V. e Navarro L. When did plants become important to leaf-nosed bats? Diversification of feeding habits in the family Phyllostomidae *Molecular Ecology* (2011) 20, 2217–2228 (2011).

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).

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).

Ribas TFA, Rodrigues LRR, Nagamachi CY, Gomes AJB, Benathar TCM, O'Brien PCM, et al. Two new cytotypes reinforce that *Micronycteris hirsuta* Peters, 1869 does not represent a monotypic taxon. *BMC Genet.*; 14: 119. (2013).

Ruiz-Herrera A., Nergadze S.G., Santagostino M. e E. Giulotto. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution *Cytogenet Genome Res* 122:219–228 (2008).

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).

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

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

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

Silva AM, Marques-Aguiar S, Barros RMS, Nagamachi CY, Pieczarka JC Comparative cytogenetic analysis in the species *Uroderma magnirostrum* and *U. bilobatum* (cytotype  $2n = 42$ ) (Phyllostomidae, Sternodermatinae) in the Brazilian Amazon. *Genet Mol Biol* 28:248–253 (2005).

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).

Van den Bussche RA, Longmire JL, Baker RJ: How bats achieve a small C-value: frequency of repetitive DNA in *Macrotus*. *Mam Gen* 6: 521–525 (1995).

Volleth M. e Heller K.G. Chromosome number reduction accompanied by extensive heterochromatin addition in the bat *Glauconycteris beatrix* (Mammalia; Chiroptera, Vespertilionidae). *Cytogenet Genome Res* 119:245–247 (2007).

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).



## Figuras

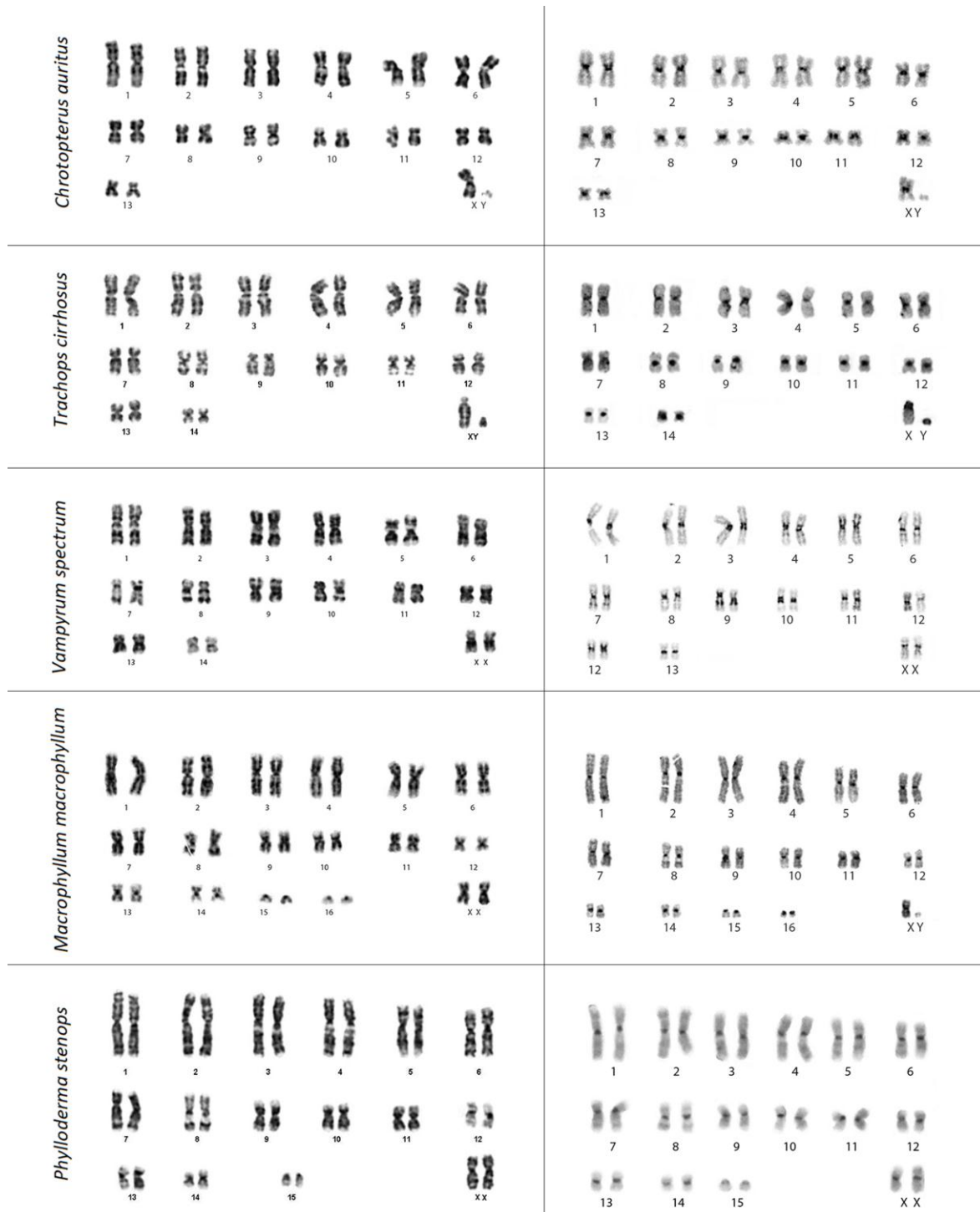


Figura 01: Cariótipo das espécies analisadas por Bandamento G a direita e Bandamento C a esquerda.

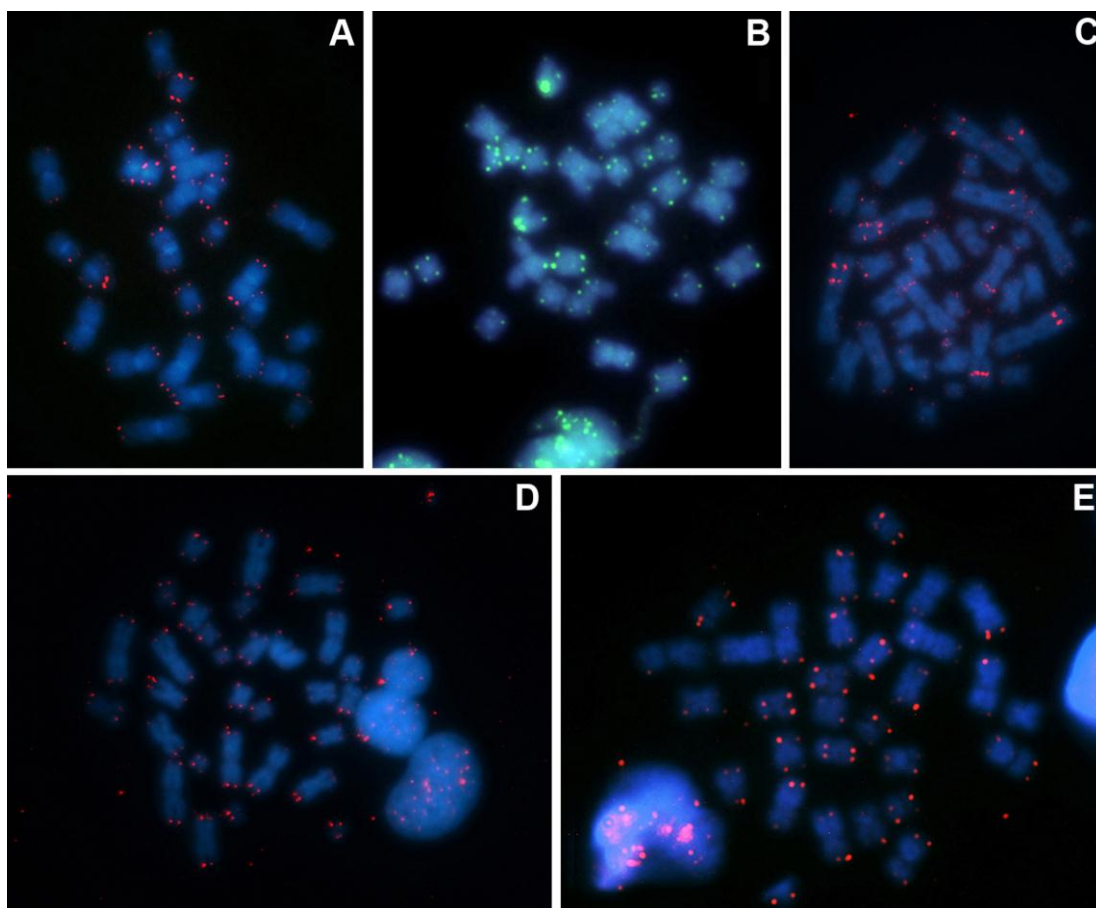


Figura 02: Hibridização in situ fluorescente com sondas de sequências teloméricas (TTAGGG) em metáfases mitóticas de (A) *Chrotopterus auritus*, (B) *Trachops cirrhosus*, (C) *Macrophyllum macrophyllum*, (D) *Phylloderma stenops*, (E) *Vampyrum spectrum*.

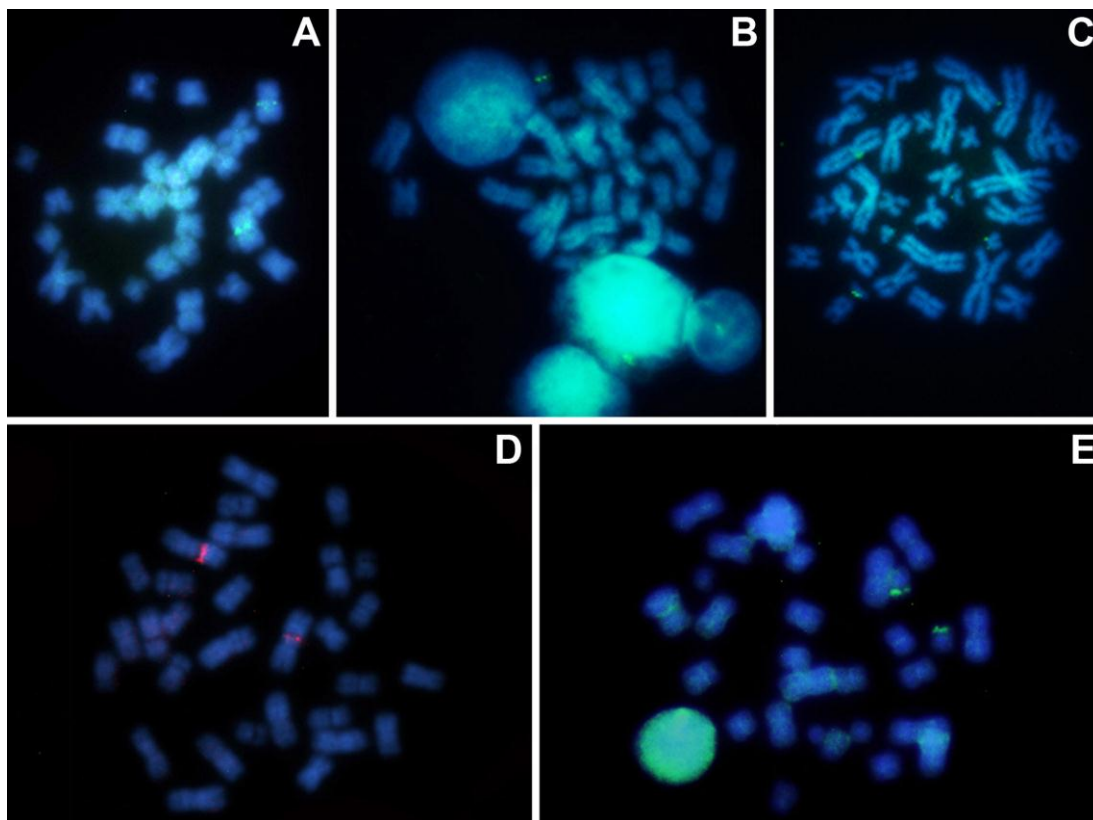


Figura 03: Hibridização in situ fluorescente utilizando sondas de rDNA 45S em metáfases mitóticas de (A) *Chrotopterus auritus*, (B) *Phylloderma stenops*, (C) *Macrophyllum macrophyllum*, (D) *Vampyrum spectrum*, (E) *Trachops cirrhosus*.