

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Izaquiel Santos de Andrade

**Caracterização citogenética molecular e estudo da
variabilidade genética por marcadores ISSR e COI na
espécie *Lonchorhina aurita* (Chiroptera: Phyllostomidae).**

Recife

2014

Izaquiel Santos de Andrade

**Caracterização citogenética molecular e estudo da
variabilidade genética por marcadores ISSR e COI na
espécie *Lonchorhina aurita* (Chiroptera: Phyllostomidae).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Profa. Dra. Neide Santos

Coorientador: Prof. Dr. Martin Alejandro Montes

Recife

2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Andrade, Izaquiel Santos de
Caracterização citogenética molecular e estudo da variabilidade genética por marcadores ISSR e COI na espécie *Lonchima aurita* (Chiroptera: Phyllostomidae)/ Recife: O Autor, 2014.

51 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Neide Santos

Coorientador: Martin Alejandro Montes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2014.

Inclui bibliografia

1. Morcego 2. Citogenética I. Santos, Neide (orientadora) II. Montes, Martin Alejandro (coorientador) III. Título

599.4 CDD (22.ed.) UFPE/CCB- 2014- 222

Izaquiel Santos de Andrade

Caracterização citogenética molecular e estudo da variabilidade genética por marcadores ISSR e COI na espécie *Lonchorhina aurita* (Chiroptera: Phyllostomidae).

Aprovado em 14 / 03 / 2014

Banca Examinadora:

Dra. Neide Santos

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Katharine Raquel Pereira dos Santos

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Vilma Loreto da Silva

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Rita de Cássia de Moura

Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2014

Aos meus pais e ao meu irmão dedico.

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus, que me acompanhou em todo esse momento, me dando força e proporcionado mais esse momento de progresso na minha vida.

Ao meu pai José Pereira, minha mãe Maria Lúcia e meu irmão Samuel por todo apoio e incentivo.

A minha querida orientadora Dra. Neide Santos pela oportunidade em realizar esse trabalho, pela sua orientação e dedicação para a concretização desse trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Martin Montes por contribuir de forma eficaz no desenvolvimento deste trabalho, agradeço pela paciência, compreensão e toda ajuda nos momentos de dificuldade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A Plataforma Tecnológica de Genômica e Expressão Gênica do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFPE.

A minha grande amiga Merilane Calixto, por todo esse tempo de convívio, por toda ajuda dada, não apenas no trabalho em laboratório como em coletas, mas também, e principalmente, nos momentos mais difíceis que passei durante esse trabalho e na minha vida, onde o desânimo estava presente. Esteve sempre disposta a me ajudar e incentivar a seguir em frente. Muito obrigado por tudo Meri!

A técnica Cirlene Silva pela ajuda, amizade, conselhos e incentivo durante esses dois anos e principalmente pela agradável companhia nas coletas.

Ao Sr. Mário pela ajuda com as coletas e por ter proporcionado tantos momentos de descontração em campo.

A todos do Laboratório de Genética e Citogenética Animal: Profa. Maria José, Profa. Vilma Loreto, Adriana, Andrezza, Arnaldo, Ayda, Elizabeth, Helen, Izabela, Juliana Vieira, Luana, Lucas, Luiz, Marcos, Rafael, Rafaella, Ronaldo, Walter e aos colegas Santelmo e Tyago. E aos colegas do Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento, Arthur, Ana Leite, Carina, Lidianne, Jéssica, José Carlos, Neto e Théo, pela companhia e ajuda.

A ciência humana de maneira alguma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável". (Galileu Galilei).

Resumo

Para investigar a organização cromossômica de sequências de DNA repetitivo e estimar a variabilidade em duas populações de *Lonchorhina aurita* do Estado de Pernambuco foi realizado o mapeamento físico das sequências de DNA repetitivo (5S e telomérico) e a análise da variabilidade genética através de marcadores ISSR e COI. A técnica de FISH com sonda de DNAr 5S revelou sítios na região pericentromérica do par 14 da espécie e com sonda da sequência (TTTAGGG)_n revelou sítios na região terminal dos cromossomos. A presença de apenas um par de sítios de DNAr 5S representa o padrão mais comum em mamíferos e é consistente com resultados descritos em outros representantes da família Phyllostomidae, indicando uma conservação quanto ao número de sítios de DNAr 5S para a família. Os sinais de hibridização com a sequência (TTAGGG)_n na região terminal dos cromossomos de *L. aurita* suportam a ideia da presença de características plesiomórficas quando comparados com outras espécies de Phyllostomidae uma vez que a presença de ITS pode estar relacionada à evolução cariotípica das espécies. Os resultados dos marcadores moleculares mostraram através da filogenia que a população de Triunfo é monofilética e a de Toritama é parafilética e que as duas populações de *L. aurita* apresentaram alta estruturação genética, com maior diferença entre as sequências das duas populações.

Palavras-chave: DNAr; FISH; ITS; Marcadores moleculares; Morcego.

Abstract

The chromosomal organization of repetitive DNA sequences and estimate of the variability in two populations of *Lonchorhina aurita* of Pernambuco were investigated by the physical mapping of repetitive DNA sequences (5S and telomeric) and the analysis of genetic variability was performed by ISSR and COI. The FISH with 5S rDNA probe revealed sites in the pericentromeric region of pair 14 and with (TTTAGGG)_n probe revealed sites in the terminal region of the chromosomes. The presence of only a couple of sites of 5S rDNA is the most common pattern in mammals and it is consistent with results reported by other representatives of the family Phyllostomidae, indicating a conservation of the number of sites of 5S rDNA on family. The hybridization signals with the sequence (TTAGGG)_n in the terminal region of the chromosomes of *L. aurita* support the idea of plesiomorphy characteristics compared to other kinds of phyllostomid since the presence of ITS maybe related to karyotypic evolution of species. The molecular markers results showed that Triunfos' population is monophyletic and Toritama's population is paraphyletic and that the two populations of *L. aurita* showed high genetic structure, with greater difference between the sequences of the two populations.

Key words: DNAr; FISH; ITS; COI; ISSR; Bat.

Lista de Ilustrações

Figura1.	Exemplar da espécie <i>Lonchorhina aurita</i> (Fonte:www.cienciaguayana.com).	06
Figura 2.	Municípios do Estado de Pernambuco onde foram coletados os espécimes de <i>Lonchorhina aurita</i> analisados. (Modificado de Wikipédia).	19
Figura 3.	Cariótipo e metáfases mitóticas de <i>Lonchorhina aurita</i> . a) Cariótipo com bandeamento C; b) Hibridização <i>in situ</i> fluorescente com sonda de DNAr 5S e c) da sequência telomérica (TTAGGG) _n . Barra 10µm.	25
Figura 4.	Árvore filogenética de neighbor-joining (NJ): Citocromo Oxidase I, calculado por Kimura-2-Parâmetros (a). ISSR, calculado pelo número de distância.	28

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Lista de número de gêneros e espécies de morcegos descritos no Brasil.	03
Tabela 2.	Sequência dos <i>primers</i> de ISSR testados.	21
Tabela 3.	Dados cromossômicos mostrando o número de espécimes, número diploide fundamental, sistema de determinação do sexo e FISH com DNAr e repetição telomérica (TTAGGG) _n em <i>Lonchorhina aurita</i> .	24
Tabela 4.	Tipos e posições das transições e transversões nucleotídicas para o gene COI em <i>Lonchorhina aurita</i> .	27
Tabela 5.	Resultados da análise de variância molecular dos marcadores moleculares COI e ISSR, para duas populações de <i>Lonchorhina aurita</i> , com destaque para a proporção entre as fontes de variação genética e os percentuais de variação. gl = graus de liberdade.	30

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

2n	Número diploide
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AMOVA	Análise de variância molecular
C	Citosina
COI	Citocromo Oxidase I
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	DNA ribossomal
FISH	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
FST	Fixação intraespecífica da variação genética
G	Guanina
HC	Heterocromatina Constitutiva
ISSR	<i>Inter Single Sequence Repeats</i>
ISH	Hibridização <i>in situ</i>
ITS	Espaçadores Internos Transcritos (Internal transcribed spacer)
K2P	Kimura 2 parâmetros
NF	Número fundamental
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	Neighbor-Joining
Pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polietilenoglicol
RONs	Regiões Organizadoras de Nucléolos

Sumário

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Ilustrações	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	xi
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	2
2.1 Ordem Chiroptera	2
2.2 Família Phyllostomidae: aspectos gerais e caracterização cariotípica	4
2.2.1. Subfamília Phyllostominae e a espécie <i>Lonchorhina aurita</i>	5
2.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH): ênfase para DNA ribossomal e sequência telomérica (TTAGGG) _n	6
2.3.1 FISH dos genes ribossomais em mamíferos	6
2.3.2 FISH com DNAr 45S e 5S em Chiroptera	8
2.3.3 FISH com sonda telomérica (TTAGGG) _n em Chiroptera	10
2.4 Estudos populacionais e marcadores moleculares	13
2.4.1 Estudos populacionais	13
2.4.2 Marcador ISSR (<i>Inter Single Sequence Repeats</i>)	14
2.4.3 Citocromo oxidase c I (CO I)	15
3. Objetivos	18
4. Material e Métodos	19
4.1 Área de Estudo	19
4.2 Análise Citogenética	19
4.3 Análise Molecular	20
4.3.1 Amostra	20
4.3.2 Extração, amplificação e sequenciamento do DNA	21
4.3.3 Análise dos dados para os marcadores ISSR e COI	22
4.4 Aspectos Éticos	23

5. Resultados	24
6. Discussão	31
7. Conclusões	36
8. Referências Bibliográficas	37
9. Anexos	43
10. Currículo Lattes atualizado	52

1. Introdução

Os morcegos são considerados um dos mais antigos grupos de mamíferos, e apresentam características morfofisiológicas particulares que possibilitam o voo verdadeiro além da capacidade de ecolocalização presente na maioria das espécies, que lhes permite explorar uma variedade de nichos ecológicos. Dessa forma, os morcegos aproveitam de forma mais eficiente os recursos naturais oferecidos pelo meio ambiente, ocupando abrigos menos expostos à predação e à competição. Consequentemente, apresentam ampla distribuição geográfica fazendo deles um grupo bem sucedido, estando representado nas regiões temperadas e tropicais de todos os continentes com uma grande diversidade de espécies e ampla variedade de hábitos alimentares.

Considerando a ampla distribuição geográfica apresentada pelos morcegos, é natural a presença de espécies em ambientes cavernícolas levando estes grupos isolados a terem uma relação específica com seu nicho ecológico, podendo estas espécies apresentar fortes padrões de estruturação filogeográfica. Baseado no habitat preferencial da espécie *Lonchorhina aurita* Tomes, 1863, este trabalho se propôs investigar a estrutura genética da espécie utilizando marcadores moleculares (COI e ISSRs), sendo o emprego de marcadores ISSRs inéditos para a espécie, aplicados com a intenção de comprovar ou não a existência de diversidade genética entre duas populações de Pernambuco. Além de demonstrar através do mapeamento cromossômico a localização de gene de DNA ribossomal 5S e sequência telomérica, para um melhor entendimento da organização estrutural cromossômica desta espécie da família Phyllostomidae.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ordem Chiroptera

A ordem Chiroptera, representada pelos morcegos, é um dos grupos mais bem sucedidos e diversificados entre os mamíferos eutérios e os únicos com adaptações morfológicas exclusivas, capazes de realizar o voo verdadeiro (Reis *et al.*, 2007). A habilidade de voar, juntamente com a ecolocalização e hábitos noturnos possibilitam esses animais a explorarem uma grande variedade de nichos ecológicos, levando ao desenvolvimento de muitas especializações morfológicas e hábitos alimentares como resposta às adaptações a estes nichos. A ocupação em diferentes nichos torna estes animais fundamentais para a manutenção das relações tróficas nos ecossistemas (Simmons, 2005).

O nome Chiroptera (cheir=mão, pteron=asa) refere-se ao patágio (membrana alar) formado por uma dupla camada de pele fina que estende-se de cada lado do corpo ligando os membros posteriores e anteriores. Estes últimos apresentam falanges extremamente desenvolvidas com ossos muito alongados, com exceção da primeira falange, que é em geral reduzida, criando uma superfície de suporte para as asas. Outras adaptações podem ser observadas nos membros inferiores que sofreram uma rotação de forma que a patela é dirigida para trás, e na musculatura peitoral, usada durante o voo, está inserida no esterno comumente em forma de quilha (Eisenberg e Redford 1999).

Com aproximadamente 1150 espécies conhecidas, os morcegos representam mais de 20% da diversidade de mamíferos, sendo superada apenas pela ordem Rodentia (Gardner, 2008) e estão agrupados em 20 famílias reunidas em duas subordens: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera, sendo

Yinpterochiroptera representada por seis famílias: Rhinolophidae, Hipposideridae, Hinopomatidae, Craseonycteridae, Megadermatidae e Pteropodidae, enquanto Yangochiroptera compreende 14 famílias, das quais nove (Emballonuridae, Furipteridae, Molossidae, Mormoopidae, Natalidae, Noctilionidae, Phyllostomidae, Thyropteridae e Vespertilionidae) com 64 gêneros e 165 espécies (tabela 1) têm ocorrência nas Américas estando todas representadas no Brasil (Reis *et al.*, 2011).

No Brasil, os morcegos habitam todo o território nacional, ocorrendo na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Pampas e em áreas urbanas (Paglia *et al.*, 2012), representando 15% das espécies de morcegos do mundo, sendo assim o segundo grupo com maior diversidade em espécies, perdendo apenas para a Colômbia, que possui 178 espécies (Alberico *et al.*, 2000).

Tabela 1: Lista de número de gêneros e espécies de morcegos por família descritos no Brasil.

Famílias	Nº de gêneros	Nº de espécies
Emballonuridae	7	15
Furipteridae	1	1
Molossidae	7	24
Mormoopidae	1	4
Natalidae	1	1
Noctilionidae	1	2
Phyllostomidae	40	92
Thyropteridae	1	4
Vespertilionidae	5	22

Fonte: Baseada em Paglia *et al.* (2012); Gardner (2008).

2.2. Família Phyllostomidae: aspectos gerais e caracterização cariotípica

Phyllostomidae é uma família taxonomicamente diversa, possuindo o maior número de gêneros e espécies entre os Chiroptera Neotropicais. Seus representantes são também conhecidos como “leaf-nosed bats” por terem um apêndice nasal (folha nasal) em forma de ponta de lança. Essa folha nasal está presente em todos os representantes, com exceção dos desmodontíneos, que tem apenas a forma de uma ferradura. Caracteriza-se como um grupo que possui hábito alimentar bem variado, podendo explorar frutos, néctar, pólen, folhas, insetos, vertebrados e sangue entre outros (Reis *et al.*, 2007). A família Phyllostomidae é endêmica do continente americano e dentre os Yangochiroptera é a terceira maior família em número de espécies compreendendo 11 subfamílias: Carrollinae, Desmodontinae, Glossophaginae, Glyphonycterinae, Lonchophyllinae, Lonchorhininae, Macrotinae, Micronycterinae, Phyllostominae, Rhinophyllinae e Stenodermatinae (Baker *et al.*, 2006 Gardner, 2008).

A caracterização cariotípica tem permitido avaliar a intensidade e os padrões da evolução cromossômica entre diferentes espécies de morcego (Varella-Garcia e Taddei, 1989) e em representantes de Phyllostomidae tem revelado uma variabilidade nos números diploides ($2n$), que vão desde $2n=14$ em *Vampyressa melissa* (Stenodermatinae) até $2n=46$ em *Macrotus waterhousii* (Macrotinae), assim como do número de braços autossômicos (número fundamental= NF) variando de 20 (*Tonatia bidens*) até 68 (*Micronycteris megalotis*), sendo os números mais frequentes $2n=30$ e NF=56 (Baker, 1970). Patton e Baker (1978) propuseram que o cariótipo ancestral para a família corresponde a $2n=46$ e NF=60, similar ao observado em *M. waterhousii*. Esses autores também propuseram que a evolução

cariotípica entre os filostomídeos pode ter levado à redução dos números diploides através de eventos de fusão cêntrica.

Entre os morcegos o sistema simples de determinação do sexo do tipo XX:XY é o mais frequente, contudo os filostomídeos apresentam dois outros mecanismos distintos de determinação do sexo, o sistema múltiplo XX:XY₁Y₂ e o sistema Neo-XY, ambos originados a partir de eventos de translocação entre autossomos e cromossomos sexuais (X e Y) (Baker, 1979; Tucker, 1986; Varella-Garcia *et al.*, 1989; Souza e Araújo, 1990; Santos e Souza, 1998).

2.2.1. Subfamília Phyllostominae e a espécie *Lonchorhina aurita*

As espécies da subfamília Phyllostominae constituem um grupo de morcegos muito diversificado com adaptações morfológicas e peso que variam de menos de 10 até 200 gramas. Possuem dieta predominantemente insetívora nas espécies de menor porte e de carnívora nas espécies maiores (Giannini e Kalko, 2005). Esta subfamília tem sido considerada como boa indicadora da qualidade do habitat, uma vez que o baixo número de indivíduos numa população está relacionado com a ação antrópica (Wilson *et al.*, 1996).

A subfamília Phyllostominae compreende 16 gêneros e 47 espécies nas Américas, dos quais 15 gêneros e 33 espécies foram registradas no Brasil, onde cinco dessas espécies pertencem ao gênero *Lonchorhina* (*L. aurita*, *L. inusitata*, *L. marinkellei*, *L. fernandezi* e *L. orinocensis*). Por sua vez, *Lonchorhina aurita* representa a única espécie do gênero descrita para o Brasil que apresenta uma ampla distribuição em florestas tropicais das Américas Central e do Sul, sendo encontrada principalmente em cavernas (Paglia *et al.*, 2012; Gardner, 2008).

A espécie *Lonchorhina aurita* caracteriza-se principalmente pela folha nasal exageradamente desenvolvida, tem coloração da pelagem marrom escura a marrom-avermelhada, possui porte médio para os morcegos do gênero com comprimento total entre 106 e 120 mm, cauda entre 47 e 52 mm e peso entre 10 e 16 g (Handley-Jr e Ochoa, 1997) (Figura 1).



Figura 1. Exemplar da espécie *Lonchorhina aurita* (Fonte: www.cienciaguayana.com)

2.3. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH): ênfase para DNA ribossomal e sequência telomérica (TTAGGG)_n

2.3.1 FISH dos genes ribossomais em mamíferos

A hibridização *in situ* (ISH) é uma técnica que permite localizar sequências de ácidos nucleicos (DNA e RNA) no citoplasma, organelas, cromossomos ou núcleo em organismos eucariotas. Ela foi introduzida por Gall e Pardue (1969) para localizar sequências específicas de DNA no anfíbio *Xenopus laevis*, utilizando

sondas de RNA marcadas radioativamente. Contudo, esse tipo de marcação causava algumas desvantagens em seu método, como uma resolução limitada, longos períodos de exposição requeridos para a obtenção das radiografias e os riscos associados à radioatividade (Levsky e Singer, 2003).

A partir da década de 80 métodos não-isotópicos foram desenvolvidos e permitiram o aprimoramento dessa técnica, passando a ser denominada de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Esta técnica tem sido considerada uma importante ferramenta citogenética por permitir análise e mapeamento cromossômico em diferentes organismos, principalmente de sequências teloméricas, centroméricas, genes ribossomais (45S e 5S), DNA altamente repetitivo, além de genes de sequência única (Schwarzacher e Heslop-Harrison, 2000; Levsky e Singer, 2003; Schwarzacher, 2003).

A técnica de FISH tem auxiliado principalmente no entendimento dos casos de variação interindividual no número e na localização destes sítios de DNAr bem como na diferenciação interespecífica (Kasahara, 2009). Os genes ribossomais possuem uma estrutura muito conservada e estão presentes em todos os eucariotas superiores. Os sítios de DNAr estão organizados em duas distintas famílias multigênicas, uma representada pelo DNAr 45S que codifica os RNAs ribossômicos principais (18S, 5.8S e 28S), que correspondem às regiões organizadoras de nucléolos (RONs) sendo responsáveis pela formação de nucléolo e síntese de ribossomos, a outra corresponde ao DNAr 5S, não envolvido na formação das RONs, que codifica o RNAr 5S. Ambas as classes de DNAr estão presentes em cópias múltiplas organizadas em *tandem* (Levsky e Singer, 2003; Sumner, 2003). Nos eucariotas superiores os genes de DNA 5S e 45S frequentemente estão em diferentes áreas dentro do genoma, porém também

podem estar localizados em um mesmo cromossomo ou até mesmo colocalizados (Drouim e Monez de Sá, 1995; Summer, 2003).

Ao contrário dos genes de DNAr 45S, os quais em mamíferos geralmente são encontrados em mais de um par de cromossomos, os genes de DNAr 5S tendem a ocorrer em apenas um par de cromossomos, organizados em cópias múltiplas que se repete de centenas a milhares de vezes no genoma. Cada repetição contém uma região conservada de 120 pares de base (pb), que codifica o RNAr 5S e um segmento de DNA espaçador não transcrito (NTS) altamente variável, que exibe um amplo comprimento e variação na sequência entre espécies (Suzuki *et al.*, 1994).

2.3.2 FISH com DNAr 45S e 5S em Chiroptera

Em morcegos o DNAr 45S, pode ter localização em um único par cromossômico, presentes em regiões terminais ou intersticiais, ou em vários pares, sendo frequentemente encontradas em autossomos (Varella-Garcia e Taddei, 1989; Souza e Araújo, 1990). Contudo, a presença de RONS unicamente em cromossomos sexuais tem sido descrita apenas no cariótipo de *Carollia perspicillata* (cromossomos X) e *C. castanea* (cromossomos X e Y) (Hsu *et al.*, 1975; Morielle e Varella-Garcia, 1988).

A técnica de FISH utilizando sondas de DNA ribossomal tem permitido o estudo mais preciso das RONS uma vez que a impregnação com nitrato de prata (AgNO₃) identifica a localização das RONS, na intérfase ou em cromossomos mitóticos e meióticos, apenas das que estiveram previamente ativas na transcrição do RNAr (Summer, 2003). Dessa forma, alguns trabalhos em mamíferos com o uso da técnica de FISH têm confirmado o número e a localização das RONS reveladas

pelo AgNO₃ (Stitou *et al.*, 2000; Svartman e Vianna-Morgante, 2003; Fagundes *et al.*, 2004), bem como a ocorrência de RONS silenciosas (Pienkowska e Switonski, 1998) e na distinção entre espécies e subespécies em estudos citogenéticos comparativos entre mamíferos (Kim *et al.*, 2004; Kasahara, 2009).

Embora o padrão modal de RONS em morcegos seja de um par cromossômico, a ocorrência de RONS múltiplas tem sido observada na família Phyllostomidae, particularmente no gênero *Choeroniscus* (Baker *et al.*, 1992) e na espécie *Lonchophylla thomasi* (Ribeiro *et al.*, 2003), pertencentes à subfamília Glossophaginae, bem como nos gêneros *Artibeus* (Morielle e Varella-Garcia, 1988; Souza e Araújo, 1990) e *Uroderma* (Silva *et al.*, 2005) e na espécie *Chiroderma doriae* (Morielle e Varella-Garcia, 1988), ambas pertencentes à subfamília Stenodermatinae.

A técnica de FISH tem sido usada para a localização do DNA ribossomal em várias espécies de morcegos (Baker *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 2001; 2002; Leite-Silva *et al.*, 2003) e tem evidenciado sítios gênicos coincidentes com a AgNO₃. Contudo, Santos *et al.* (2002) ao analisarem 13 espécies de filostomídeos, pertencentes aos gêneros *Artibeus*, *Glossophaga*, *Phyllostomus*, *Phyllosderma*, *Platyrrhinus*, *Tonatia* e *Trachops*, descreveram que a espécie *A. cinereus* apresentou sinais de hibridização em um par cromossômico adicional, indicando a ocorrência de RON silenciosa nessa espécie.

O uso da FISH com sonda de DNAr 18S em três espécies da família Molossidae, revelou genes ribossomais presentes no par 5 de *Molossus ater*, *M. molossus* e *Molossops planirostris*, e nos cromossomos 9 e 10 de *M. planirostris*. Os resultados obtidos com essa técnica, em comparação com os de impregnação com AgNO₃, indicaram que todas as RONS dessas espécies são

transcricionalmente ativas (Leite-Silva *et al.*, 2003). Gomes *et al.* (2010) analisaram uma população de *Rhinophylla fischeriae* (Rhinophyllidae) da Amazônia brasileira com sonda de genes ribossomais 28S e 18S, comparando com dados previamente descritos na literatura. A FISH revelou sítios na região proximal dos braços longos dos cromossomos 16 e 18 concordando com os dados da impregnação com AgNO₃.

Por outro lado, o mapeamento cromossômico de genes de DNAr 5S em morcegos ainda é bastante escasso, tendo sido realizado em apenas 13 espécies da família Phyllostomidae (Calixto *et al.*, 2013) onde foi descrita a presença de um único par portador de sítios de DNAr 5S. Contudo, na espécie *Rhinolophus hipposideros* da família Rhinolophidae foi observada a presença de nove pares de cromossomos acrocêntricos portadores desses sítios (Puerma *et al.*, 2008).

Estudos citogenéticos em diferentes grupos de vertebrados têm mostrado que o número e a localização dos genes de DNAr 5S nos cromossomos podem ser variados ou conservados em diferentes populações de uma mesma espécie, em espécies distintas do mesmo gênero ou pertencentes a gêneros relacionados. Dessa forma, a técnica de FISH com sonda de DNAr 5S tem sido importante em estudos citogenéticos comparativos (Kasahara, 2009).

2.3.3. FISH com sonda telomérica (TTAGGG)_n em Chiroptera

Os telômeros são estruturas compostas por proteínas e DNA nas regiões terminais dos cromossomos. Possuem uma função básica na manutenção da integridade e estabilidade dos cromossomos, importante por impedir possíveis fusões e degradações. A técnica de FISH com sonda telomérica tem permitido analisar a distribuição da sequência de DNA repetido (TTAGGG)_n nos

cromossomos. Esta sequência geralmente está localizada nas extremidades dos cromossomos (telômeros), mas também pode ser detectada em regiões cromossômicas pericentroméricas e intersticiais, denominadas como sítios teloméricos intersticiais (ITS) (Meyne *et al.*, 1990).

Sequência de DNA telomérico (TTAGGG)_n presente em sítios não-teloméricos podem está relacionada a resquícios de telômeros verdadeiros resultantes de rearranjos cromossômicos, tais como inversões e fusões cêntricas ocorridos durante os processos evolutivos. Deste modo, análise da localização de ITS corresponde a um modelo elucidativo da evolução cariotípica dos vertebrados (Meyne *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1993). Também tem sido reportada a ocorrência dessa sequência como um componente do DNA satélite, coincidindo com regiões de heterocromatina constitutiva, em diferentes espécies de vertebrados (Multani *et al.*, 2001).

A técnica de FISH em diferentes grupos de vertebrados, incluindo a ordem Chiroptera, permitiu detectar um padrão unicamente telomérico nas espécies *Macrotus waterhousii*, *M. californicus*, *Monophyllus redmani*, *Molossus molossus* e *Pteronotus macleayii*. Outro padrão observado foi o de ITS em regiões centroméricas em *Artibeus jamaicensis*, *Carollia perspicillata*, *Eumops glaucinus*, *E. perotis* e em algumas espécies do gênero *Chiroderma* (Meyne *et al.*, 1990; Finato *et al.*, 2000).

Ono e Yoshida (1997) analisaram diferenças na distribuição cromossômica de sequências teloméricas (TTAGGG)_n em *Eptesicus parvus nilssonii* e *Vespertilio superans* representantes da família Vespertilionidae. Marcações nas extremidades dos cromossomos em ambas as espécies e ITS em regiões centroméricas foram

observadas em todos os sete cromossomos acrocêntricos de *V. superans*. Por outro lado, *E. parvus nilssonii* não apresentou nenhum sinal intersticial.

As espécies *Eumops glaucinus*, *Carollia perspicillata* e *Platyrrhinus lineatus* foram analisadas por Faria e Morielle-Versute (2002) para verificar a habilidade da enzima Alu I de clivar ou remover sequências de DNA satélite de regiões heterocromáticas, e identificar a ocorrência de modificações no padrão de FISH com sonda (TTAGGG)_n, depois da digestão enzimática. Sequências teloméricas foram detectadas nas extremidades dos cromossomos das três espécies, embora em *C. perspicillata* os sinais tenham sido fracos ou ausentes nessa região em muitos cromossomos, provavelmente, devido a um número reduzido de cópias da repetição telomérica. Marcações adicionais foram observadas nas regiões centroméricas e pericentroméricas de vários cromossomos com dois braços de *E. glaucinus* e *C. perspicillata*. Em *E. glaucinus* e *P. lineatus*, alguns sinais (TTAGGG)_n intersticiais e terminais foram observados estando em associação com regiões de heterocromatina e RONS. Os cromossomos das três espécies tratados com Alu I e subsequentemente hibridizados com sonda (TTAGGG)_n mostraram uma diminuição significativa na intensidade do sinal, indicando que esta enzima foi capaz de clivar o DNA satélite presente nas regiões teloméricas diferentemente, removendo parte dele. Esses resultados sugerem que a sequência telomérica se apresentou como um componente da heterocromatina assim como do DNA ribossomal, e que as regiões de bandas C positivas (intersticial, terminal e centromérica) apresentaram uma diferente composição, reforçando a heterogeneidade do DNA satélite.

2.4. Estudos populacionais e marcadores moleculares

2.4.1 Estudos populacionais

Filogeografia é o estudo da distribuição de linhagens gênicas de uma espécie em um determinado contexto geográfico e temporal, com base na análise de haplótipos, principalmente por ácidos nucleicos. Tal estudo baseia-se na quantidade de divergência genética e subdivisão geográfica em grupos monofiléticos (clados). Há exemplos de espécies que exibem padrões bem estruturados de subdivisão de populações, outras que possuem pouca ou nenhuma estruturação filogeográfica com baixa divergência genética, e algumas ainda que apresentam pouca ou nenhuma estruturação filogeográfica com altos níveis de divergência genética, sendo essa última mais rara (Avice, 2000). Estudos filogenéticos têm mostrado que em alguns casos as relações entre os táxons são complexas, principalmente por se observar incongruências ao serem contrastados dados morfológicos e genéticos (Pacheco e Patterson, 1991).

Estudos populacionais com marcadores moleculares em morcegos ainda são poucos, e geralmente são focados com a utilização do DNA mitocondrial. Lopes e Ditchfield (2009) utilizando análises de polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (RFLP) do gene mitocondrial citocromo b, revelaram quatro haplótipos, para *L. aurita*, onde dois deles são compartilhados por indivíduos da região sul da Mata Atlântica e dois por indivíduos da região norte. Este resultado levou a ideia de que *L. aurita* também poderia ter estruturação populacional. Segundo Ditchfield (2000), para morcegos é esperado um padrão filogeográfico semelhante ao das aves e diferente dos pequenos mamíferos não voadores, apresentando baixa estruturação e baixa divergência de sequências. Contudo,

outros autores revelaram estruturação populacional para algumas espécies de morcego (Hoffmann e Baker, 2003; Larsen *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2007).

2.4.2 Marcador ISSR (*Inter Single Sequence Repeats*)

A técnica de ISSR é um método baseado em PCR que envolve amplificação de um segmento de DNA presente entre duas regiões de microsatélites idênticas orientadas em direções opostas. As sequências de microsatélites usadas como *primers* são constituídas de 2, 3 ou 4 nucleotídeos. Essa técnica combina a maioria dos benefícios do AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e a análise dos microsatélites com a universalidade do RAPD (Reddy *et al.*, 2002). ISSRs segregam como marcadores dominantes seguindo o princípio de herança Mendeliana (Wu *et al.*, 1994).

Entre os diversos marcadores moleculares o ISSR se destaca pela sua alta reprodutibilidade e a não necessidade de conhecimento das sequências flangeadoras necessárias a construção de *primers* específicos (Li e Ge, 2001), tendo sido útil na análise da diversidade genética, estudos filogenéticos, mapeamento genômico e biologia evolutiva. Outra vantagem do marcador ISSR está no fato de que a taxa evolutiva de mudanças é consideravelmente mais alta do que em qualquer outro tipo de DNA, aumentando a probabilidade de polimorfismo nessas sequências (Reddy *et al.*, 2002).

O marcador ISSR tem sido pouco utilizado em estudos com mamíferos, sendo estes trabalhos voltados para estudo populacional. Koyama *et al.*, (2008) analisaram a diversidade genética de espécies de leão marinho e não observaram diferenciação genética significativa quando comparado com trabalhos que utilizaram marcadores mitocondriais (Bickham *et al.*, 1998). No trabalho de Oliveira

et al. (2011), com uma espécie de roedor de três populações, foi observada uma elevada divergência genética entre os indivíduos destas populações, indicando uma forte estruturação genética. Estudo populacional realizados em búfalos mostraram uma baixa diversidade genética entre os indivíduos de três espécies estudadas por Aytekin *et al.*, (2011). Além disso, os marcadores ISSR também foram utilizados para determinar o tempo de divergência e a posição filogenética de diferentes grupos de animais, como por exemplo búfalo aquático, ovelha, porco, cabras e gado (Mattapalli e Ali, 1999).

2.4.3 O gene Citocromo c oxidase I (COI)

O DNA mitocondrial é particularmente favorável a estudos filogeográficos por geralmente apresentar transmissão exclusivamente materna, ausência de recombinação, altas taxas evolutivas quando comparado ao genoma nuclear e variação intra-específica extensa, a maior parte da qual ocorrendo inter e não intraindividualmente (Avice, 2000).

O gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) tem sido mais comumente utilizado em análises filogenéticas, tendo ganho destaque neste tipo de estudo a partir da publicação de Hebert *et al.*, (2004). O gene COI codifica uma proteína responsável pela catálise envolvida com o transporte de elétrons e com a translocação de prótons através da membrana (Saraste, 1990), e seu uso como marcador molecular deve-se à junção de regiões nucleotídicas altamente conservadas com outras mais variáveis (Saraste, 1990; Gennis, 1992), que é útil para análises de relações filogenéticas de grupos com tempos de divergência tanto antigos quanto recentes.

Além disso, muitas espécies têm problemas de identificação devido a sua grande semelhança com outras espécies ou ao fato de apresentar grande diversidade morfológica dentro da espécie. Muitas vezes é necessária identificar espécies com os problemas anteriores ou ainda, a partir de uma amostra que não permite a utilização da taxonomia tradicional. Devido a necessidade de um marcador padrão que sejam comparáveis dentro e entre espécies para o desenvolvimento de um sistema unificado de identificação molecular (Ward, 2009) surgiram os estudos moleculares. O gene *COI* está entre os diversos genes ou regiões do DNA que têm sido empregados como marcadores moleculares para a identificação de espécies com base em suas divergências genéticas (Hajibabael *et al.*, 2007).

Dessa forma, foi proposto um sistema universal de identificação adequado para a maioria das espécies animais com uso de um segmento de aproximadamente 650 pb da extremidade 5' do gene mitocondrial *COI* (Hebert *et al.* 2003), que consiste na sequência de bases entre as posições 58 e 705 da extremidade 5' do gene *COI* (Waugh, 2007). Uma vez que as espécies são, em geral, representadas por uma sequência particular ou por um grupo de sequências muito similares deste fragmento gênico, conhecido como “DNA *barcode*” da espécie, o acúmulo de mutações entre as sequências *barcode* de duas espécies fornece a distância genética entre elas (Hebert *et al.* 2003).

Para que o caráter universal de identificação de animais seja suportado, é necessário que a padronização contemple às variáveis técnicas e aos métodos de análise, que devem ser o mais constante possível, com pouca variação ao se analisar diferentes grupos. Desta forma, mesmo em situações em que o desenho de *primers* específicos para um determinado grupo seja necessário, é importante

lembrar que a ideia do DNA *barcode* indica que *primers* que se aplicam à amplificação do gene *COI* em uma vasta gama de espécies são preferidos aos específicos, devendo ser testados primeiro. Também por uma questão de padronização, as análises de dados de *barcode* usam o algoritmo de *Neighbor-Joining* (NJ) para a representação gráfica das distâncias entre os grupos e o Kimura 2 parâmetros (K2P) como modelo de substituição de nucleotídeos (Casiraghi *et al.*, 2010).

O gene mitocondrial *COI* tem sido utilizado há bastante tempo para estudar a evolução dos animais (Kocher *et al.*, 1989) e vem sendo comumente utilizado na identificação de espécies de diferentes grupos bem como em estudos filogeográficos (Palumbi *et al.*, 1998; Verma e Singher, 2003; Hebert *et al.*, 2003, 2004; Russello e Amato, 2004; Holmes, 2004; Nesi *et al.*, 2011; Hernández-Dávila *et al.*, 2012). O gene *COI* representa um gene que possui o maior número de sequências disponíveis no *GenBank* (mais de 25 mil) de uma gama significativa de espécies animais que tem auxiliado estudos de filogenia e diversidade molecular. Contudo, para o gênero *Lonchorhina* existem apenas 18 sequências depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), sendo apenas três destas pertencentes à espécie *Lonchorhina aurita*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a organização cromossômica de sequências de DNA repetitivo e estimar a variabilidade genética em duas populações de *Lonchorhina aurita* do Estado de Pernambuco.

3.2 Objetivos Específicos

1. Realizar o mapeamento físico cromossômico das sequências de DNA repetitivo (DNAr 5S e telomérico) em *Lonchorhina aurita*;
2. Verificar a presença de ITS e associação com a HC;
3. Analisar a variabilidade genética através de marcadores ISSR e sequenciamento do gene *COI* em duas populações;
4. Correlacionar os dados moleculares obtidos para avaliar possíveis diferenças entre as duas populações.

4. Materiais e Métodos

4.1 Material e Área de Estudo

Os indivíduos machos e fêmeas de *Lonchorhina aurita* foram coletados nos municípios de Toritama (Fazenda Pedra dos Pontais - 07°59'56"S; 36°03'08"W) e Triunfo (Fazenda Canaã - 07°52'04"S; 38°05'24"W), ambos localizados no Estado de Pernambuco (Figura 2). Os espécimes foram depositados na Coleção de Mamíferos no Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.



Figura 2. Municípios do Estado de Pernambuco onde foram coletados os espécimes de *Lonchorhina aurita* analisados. (Modificado de Wikipédia).

4.2 Análise Citogenética

A análise Citogenética foi realizada em dois indivíduos coletados no Município de Toritama no Estado de Pernambuco. Os cromossomos mitóticos foram obtidos através de preparação direta de medula óssea de acordo com procedimentos padrões. A heterocromatina constitutiva foi identificada pelo bandeamento C (Anexo 1) de acordo com o método de Sumner (1972).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (Anexo 2) foi realizada com sonda de DNAr 5S obtida pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando primers específicos - Sca5SF (5'AAC GAC CAT ACC ACG CTG AA-3') e Sca5SR (5'AAG CGG TCC CCC ATC TAA GT-3') designados para o DNAr 5S de acordo com a metodologia de Cabral-de-Mello *et al* (2011). A sonda foi marcada com digoxigenina-11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) por PCR e detectada pela anti-digoxigenina-rodamina (Roche, Mannheim, Germany). A sonda de DNA telomérico foi obtida por PCR usando hexâmeros de TTAGGG e uma sequência complementar CCCTAA como primers, na ausência de DNA genômico de acordo com Ijdo *et al.* (1991), com incorporação randômica de digoxigenina-11-dUTP.

Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma, St Louis, MO, USA) e as lâminas montadas com Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA). As imagens foram capturadas usando microscópio Olympus BX61 equipado com filtros adequados e acoplado a uma câmera digital Olympus DP71. O contraste e o brilho das imagens foram melhorados através do Adobe Photoshop CS6.

4.3 Análise Molecular

4.3.1 Amostra

Inicialmente 4 *primers* para o marcador ISSR foram testados. Destes, os *primers* ISSR1 (CA)₆AT e ISSR3 (CA)₆AG foram amplicados nas amostras (Tabela 2). O DNA genômico de 35 indivíduos de *L. Aurita* foi usado, sendo 17 e 18 indivíduos provenientes do Município de Toritama e Triunfo, respectivamente.

As sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (*COI*) foram obtidas de 10 indivíduos de *Lonchorhina aurita* provenientes das duas localidades do Estado de Pernambuco, Toritama e Triunfo, sendo cinco de cada população.

Tabela 2. Sequência dos *primers* de ISSR testados

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Amplificação
ISSR1	(CA) ₆ AT	50	Sim
ISSR2	(CA) ₆ GC	50	Não
ISSR3	(CA) ₆ AG	50	Sim
ISSR4	(AGC) ₄ T	50	Não

4.3.2 Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

As extrações de DNA foram realizadas a partir de amostras de tecidos (coração e/ou fragmento do patágio) mantidos em álcool absoluto a -20°C. O protocolo de extração de DNA total (SDS/NaCl/Proteinase K) seguiu a técnica descrita por Medrano *et al.* (1990).

A amplificação do DNA foi realizada a partir da técnica de PCR seguindo padrões específicos para os marcadores ISSR 1, ISSR3 (Anexo 4) e gene *COI* (Anexo 5) e seu produto foi submetido a eletroforese para separação dos fragmentos de DNA amplificados em gel de agarose 1,5%. O corante fluorescente GelRed® (Life Technologies, Inc.) foi aplicado no gel juntamente com o produto da PCR para que associando-se ao DNA permitisse a visualização dos fragmentos amplificados sob a luz Ultra Violeta do transiluminador.

O sequenciamento foi realizado para as sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (*COI*). Para isto, após amplificação, os produtos de PCR foram purificados com PEG (Polietilenoglicol) (Anexo 5). Na reação de sequenciamento foram utilizados os amplicons e os primers LCO1490: 5'-

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' e HC02198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3', (Folmer *et al.*, 1994), para gerar fragmentos de 621 pares de bases (pb) do gene COI. Os perfis adotados são apresentados no anexo 5. O sequenciamento foi realizado na Plataforma Tecnológica de Genômica e Expressão Gênica do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFPE.

4.3.3 Análises dos dados para os marcadores ISSR e o gene COI

O cálculo para estimativa da composição média das sequências nucleotídicas foi realizado a partir do programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2007). Uma matriz binária de presença e ausência das bandas foi construída baseando-se nas imagens obtidas a partir da eletroforese. O cálculo dos algoritmos de Neighbor-joining foram estimados com o programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2007) gerando árvores filogenéticas, sendo para o gene COI baseada no modelo K2P e para ISSR no modelo de números de diferenças. A estruturação da diversidade genética foi calculada utilizando o Arlequin 3.5 (Excoffier L e Lischer, 2010) mediante o procedimento de AMOVA. Os testes de neutralidade Fu (Fu, 1997) e Tajima (Tajima, 1989) também foram realizados. O número de imigrantes foi calculado baseado na formula: $N_{me} = (1-F_{st})/4(F_{st})$ para machos e fêmeas e $(1-F_{st})/2(F_{st})$ para fêmeas.

4.4 Aspectos Éticos

Os procedimentos propostos para a coleta, sacrifício e acondicionamento dos espécimes foram de acordo com os princípios éticos, determinados pelo COBEA (artigos VI e X) e com o artigo III § da 3º da Lei nº 1.153, de 1995 que remete para a utilização de animais silvestres em experimentos nos quais seja indispensável o seu uso. As coletas foram realizadas com o consentimento do administrador das áreas de estudo, bem como com a autorização do IBAMA (Coordenadora do projeto cadastrada no SISBIO, licença de número 16278-1).

5. Resultados

5.1 Citogenética

Lonchorhina aurita apresentou número diploide $2n=32,XX;XY$ e número fundamental igual a 60 ($NF=60$), com cromossomos metacêntricos (1, 4, 6, 8, 9, 11, 13 e 15) submetacêntricos (2, 3, 5, 7 e X), subtelocêntricos (10, 12 e 14) e um pequeno acrocêntrico (Y). O bandejamento C revelou heterocromatina constitutiva (HC) na região pericentromérica dos cromossomos e no cromossomo Y que foi quase inteiramente heterocromático (Figura 3a, Tabela 3). Os sítios de DNAr 5S foram localizados na região pericentromérica do par 14 (Figura 3b, Tabela 3).

A hibridização com a sonda da sequência telomérica $(TTAGGG)_n$ revelou sinais fluorescentes na região terminal de todos os cromossomos e ausência de sítios teloméricos intersticiais (ITS) (Figura 3c, Tabela 3).

Tabela 3. Dados cromossômicos mostrando o número diploide e fundamental, sistema de determinação do sexo e FISH com DNAr 5S e repetição telomérica $(TTAGGG)_n$ em *Lonchorhina aurita*.

Espécie	2n	NF	Banda C	Sítios com hibridização		
				5S	Sítios Terminais	ITS
<i>Lonchorhina aurita</i>	32	60	pericentromérico e Y*	Par 14	Todos os cromossomos	Ausente

2n = Número diploide; NF = número fundamental; * quase totalmente heterocromático

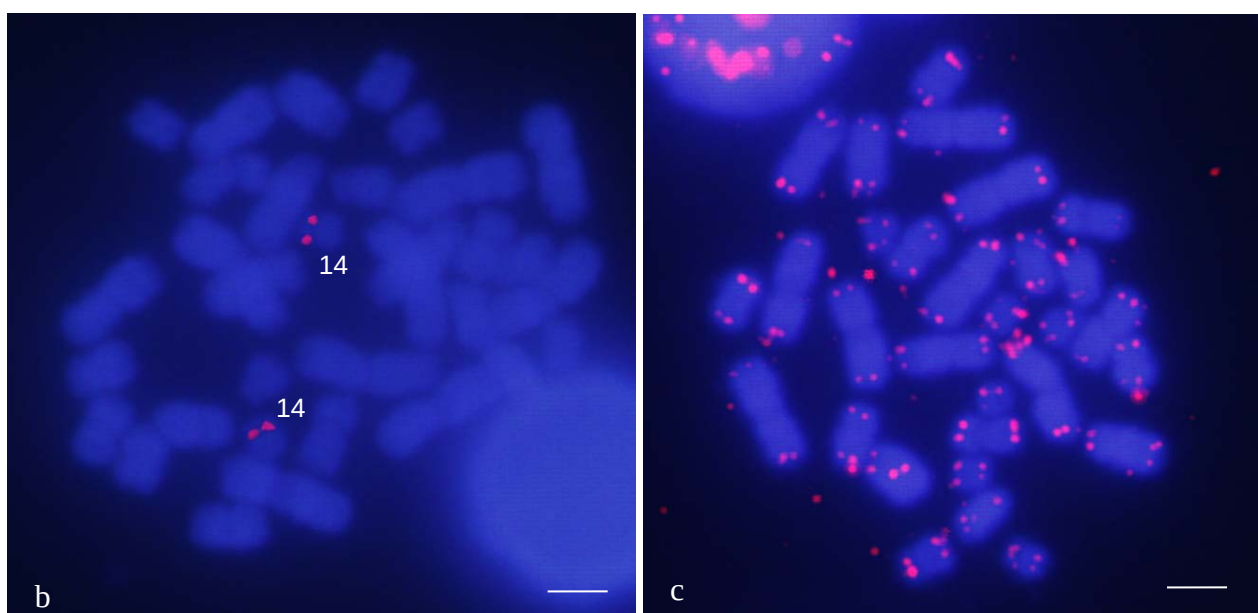
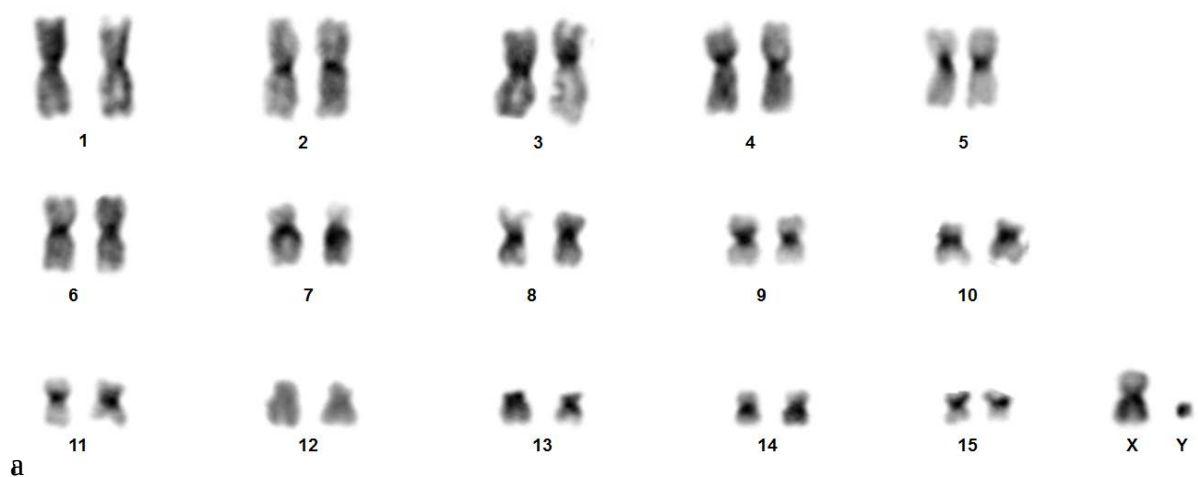


Figura 3. Cariótipo e metáfases mitóticas de *Lonchorhina aurita*. a) Cariótipo com bandeamento C; b) Hibridização *in situ* fluorescente com sonda de DNA r 5S e c) da sequência telomérica (TTAGGG)*n*. Barra 10µm.

5.2 Marcadores Moleculares

O perfil molecular dos marcadores ISSR 1 e ISSR 3 foi obtido de 35 indivíduos de *L. aurita* das duas populações do bioma Caatinga no Estado de Pernambuco.

Do marcador COI foram amplificados e analisados 655 pares de bases, tendo a seguinte composição média das sequências 31,3% de T, 25,7% de C, 27,0% de A e 16% de G. Nas populações estudadas este gene apresentou 7 sítios polimórficos, dos quais 6 foram transições e 1 foi transversão (Tabela 4). Os marcadores ISSR 1 e ISSR 3 geraram 21 e 19 fragmentos de amplificação, respectivamente. No total foram observados 33 fragmentos polimórficos para os dois marcadores de ISSR, para as duas populações.

A figura 4a mostra a árvore filogenética de neighbor-joining (NJ) calculada por Kimura 2 parâmetros para os haplótipos encontrados para o gene *COI*. Pode-se observar que a população de Triunfo formou um clado monofilético com um único haplótipo, enquanto Toritama apresentou-se parafilético com dois clados, sendo um deles formado por dois haplótipos e apresentando a população de Triunfo como clado irmão e o outro formado por um haplótipo compartilhado por três indivíduos.

A figura 4b apresenta a árvore filogenética de neighbor-joining (NJ) calculado pelo número de distância para ISSR. É possível notar que existem três clados monofiléticos representados, dois em Toritama e um em Triunfo, sendo que a população de Triunfo formou um clado monofilético, enquanto a de Toritama apresentou-se monofilética com dois clados. Pode-se observar que a população de Triunfo formou um clado monofilético com 11 haplótipos, enquanto Toritama apresentou-se parafilético com dois clados, sendo um deles formado por sete

haplótipos e apresentando a população de Triunfo como clado irmão e o outro formado por 10 haplótipos compartilhados por 10 indivíduos.

Tabela 4. Tipos e posições das transições e transversões nucleotídicas para o gene COI em *Lonchorhina aurita*.

	Transição		Transversão
	GA	CT	CA
Triunfo	76, 197, 472 e 527	-	130
Toritama	-	199 e 539	-

Para a análise do gene *COI* observamos que a população de Triunfo apresentou somente um haplótipo, sendo assim sua variabilidade genética foi de 0, enquanto a população de Toritama apresentou três haplótipos com 0,6 de diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica de 0,004885.

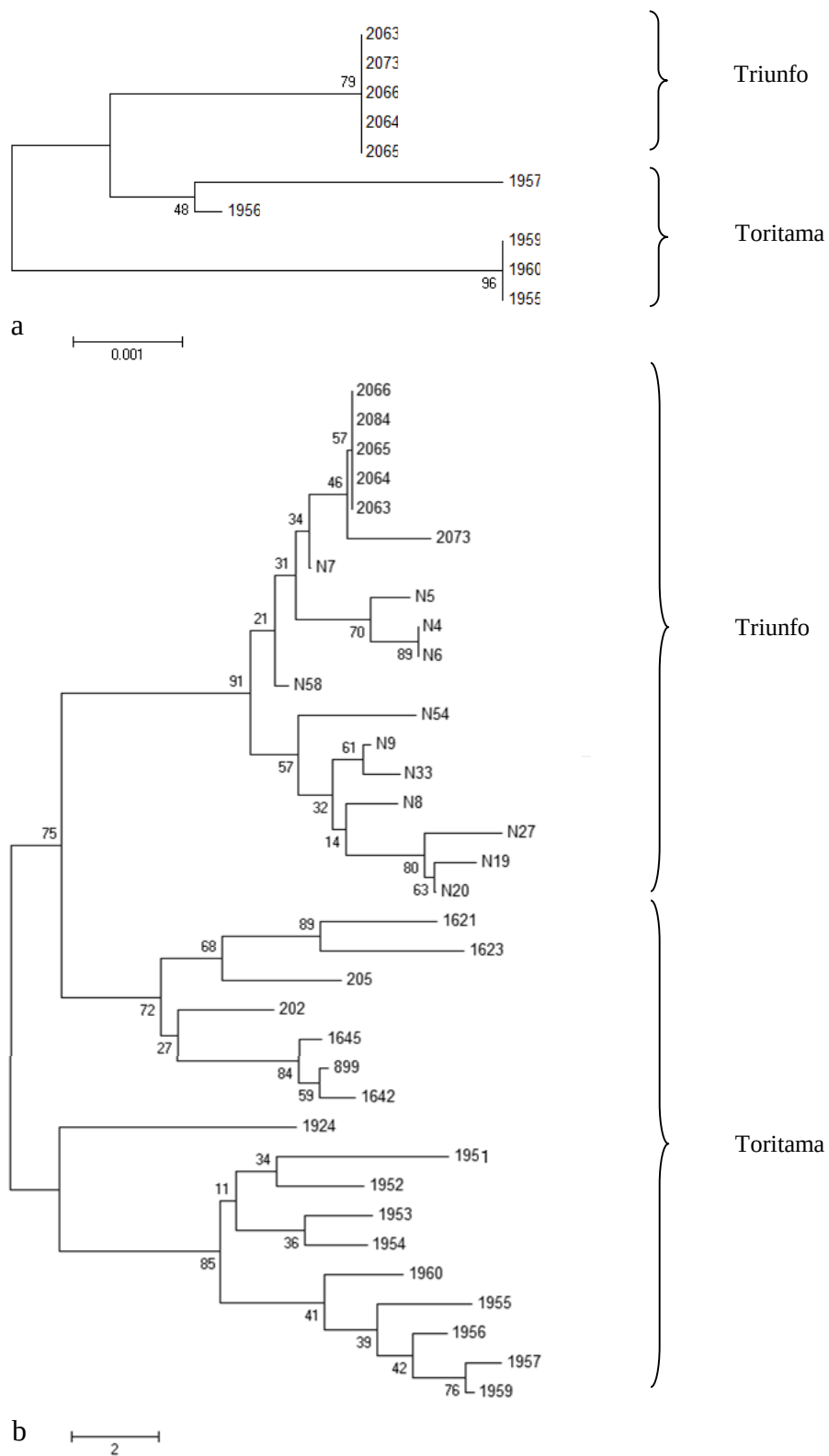


Figura 4. Árvore filogenética de neighbor-joning (NJ): Citocromo Oxidase I, calculado por Kimura-2-Parâmetros (a). ISSR, calculado pelo número de distância (b).

Teste de Neutralidade

Tajima

Nas análises para o gene *COI* o valor do teste de neutralidade de Tajima para a população de Triunfo foi (0, $p=1$) e para a população de Toritama foi de (0,76369 e $p= 0.775$), apresentando uma média de 0,97578. Para o marcador nuclear ISSR os valores do teste de neutralidade de Tajima para as populações Toritama e Triunfo foram respectivamente (1,14293, $p= 0,882$) e (0,16243, $p= 0,611$), com média de 1,28504.

Fu

Na análise para o gene *COI* o valor do teste de neutralidade de Fu para a população de Triunfo não foi calculado e para a população Toritama foi de (1,45828 e $p= 0,768$), apresentando uma média de 1,58557. Para o marcador nuclear ISSR os valores para as populações Toritama e Triunfo foram respectivamente, (-7,90401, $p= 0,001$) e (-4,76105, $p= 0,014$), com uma média de -13,44912.

AMOVA

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) do gene *COI* indicou que a diferença genética entre as populações foi maior do que dentro de cada população (Tabela 4). A AMOVA para o ISSR indicou maior variância genética total dentro das populações. A presente análise ainda revelou que o índice de fixação intraespecífica da variação genética (F_{ST}) foi maior para o gene *COI* que para ISSR (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados da análise de variância molecular dos marcadores moleculares *COI* e *ISSR*, para duas populações de *Lonchorhina aurita*, com destaque para a proporção entre as fontes de variação genética e os percentuais de variação. gl = graus de liberdade.

Fonte de variação	Marcador	Gl	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Percentual variação
Entre populações	COI	1	7,300	1,30000 Va	61,90
	ISSR	1	72,095	3,87856 Va	47,56
Dentro das populações	COI	8	6,400	0,80000 Vb	38,10
	ISSR	33	141,105	4,27590 Vb	52,44
Total	COI	9	13,700	2,10000	
	ISSR	34	213,200	8,15446	
Índice de fixação	COI			F _{ST} : 0,61905	
	ISSR			F _{ST} : 0,47564	

O cálculo do número de imigrantes para o marcador mitocondrial apresentou um valor de 1,24 enquanto o do marcador nuclear e mitocondrial foi de 0,28.

6. Discussão

6.1 Citogenética

Os dados do número diploide, morfologia cromossômica e padrão de heterocromatina estão de acordo com dados anteriormente descritos por Barros *et al.* (2009) para outros espécimes de *L. aurita* do Estado de Pernambuco.

Este trabalho reforça que a localização pericentromérica dos blocos de HC presente nos cromossomos de *L. aurita* é a mais comum em mamíferos, particularmente em morcegos. Além disso, o padrão quase inteiramente heterocromático observado no cromossomo Y de *L. aurita* é frequente em representantes da família Phyllostomidae (Varella-Garcia e Taddei. 1989; Barros *et al.*, 2009).

A presença de sítios de RNAr 5S em apenas um par cromossômico observado em *L. aurita* representa o padrão mais comum em mamíferos, e mostra que é um padrão cariotípico similar ao de outras espécies de Phyllostomidae, recentemente descritas, quanto ao número de sítios desse gene (Calixto *et al.*, 2013). Contudo, diverge significativamente quanto ao número de sítios observados, em *Rhinolophus hipposideros*, espécie de morcego da família Rhinolophidae, que possui nove pares de cromossomos acrocêntricos portadores desses sítios (Puerma *et al.*, 2008). Esses dados mostram uma possível não conservação desse gene na ordem Chiroptera, uma vez que o número de sítios de RNAr em representantes da família Phyllostomidae divergiu significativamente em relação ao espécime da família Rhinolophidae. É importante destacar que a ocorrência de múltiplos sítios de RNAr 5S é uma condição rara entre os mamíferos (Lomholt *et al.*, 2002; Puerma *et al.*, 2008).

Os sinais de hibridização apresentados nas extremidades de todos os cromossomos em *L. aurita* através da FISH com a sonda de repetição telomérica eram esperados, uma vez que os telômeros são constituídos pelo DNA telomérico, tipo de DNA que consiste principalmente das sequências repetidas em *tandem* (TTAGGG)_n (Moyzis *et al.*, 1988; Calixto *et al.*, 2013). Contudo, a ausência de sítios teloméricos intersticiais, assim como a não associação da localização da HC e dos sítios teloméricos, indicam que *L. aurita* apresenta características plesiomórficas quando comparada com outras espécies da família Phyllostomidae, tendo portanto ocorrido poucos rearranjos cromossômicos (Meyne *et al.*, 1990; Finato *et al.*, 2000; Faria e Morielle-Versute, 2002; Faria *et al.*, 2009). De acordo com Meyne *et al.*, (1990), a presença de ITS pode estar relacionada à evolução cariotípica das espécies, onde espécies com características mais plesiomórficas apresentariam apenas sítios terminais, enquanto que as espécies com características apomórficas e altamente diferenciadas teriam sítios terminais e ITS devido a rearranjos cromossômicos.

6.2 Marcadores Moleculares

Neste trabalho foram analisados 655 pares de bases do gene *COI*, onde foi observado na sua composição uma baixa quantidade de guanina e o padrão de substituição que ocorreu, apresentando mais transições da forma GA seguido por CT, que as transversões. Esses dados estão de acordo com os valores encontrados para genes mitocondriais em animais (Tavares *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2007). Para os marcadores ISSR de modo geral, a razão do quantitativo de fragmentos polimórficos pelo número de fragmentos amplificados foi alta, similar ao trabalho de

Nagaraja *et al.*, (2004), que em uma análise de um total de 245 fragmentos, 238 foram polimórficos em espécies de *Drosophila*

Em relação as inferências filogeográficas foi observado o mesmo padrão para os dados mitocondriais e nucleares, onde um agrupamento monofilético foi gerado apenas na população de Triunfo. Enquanto a população de Toritama gerou dois clados, que pode estar relacionado à influência genética possivelmente pela migração de indivíduos entre populações próximas.

Os testes de neutralidade de Tajima aplicados às duas populações, pelos marcadores do gene *COI* e ISSR, não foram significativos apresentando neutralidade. Além disso, os valores negativos encontrados para o teste de Fu no presente trabalho foram não-significativos para o gene *COI*, apresentando neutralidade, e para o ISSR os valores foram significativos e negativos. O valor da média do teste de Fu foi negativo e apresentou uma forte estruturação de *L. aurita* nas populações de Toritama e Triunfo. Estes valores levam a supor a estruturação de cada população (Tajima, 1989; Fu, 1997). Ao comparar estes resultados analisados em conjunto com os resultados do *Fst* da AMOVA observou-se uma estruturação para os dados nucleares. Resultados similares de estruturação geográfica da diversidade genética também foram descritos através do marcador mitocondrial *Cytb* nas espécies de morcegos *Desmodus rotundus* (Martins *et al.*, 2007) e *Lonchorhina aurita* (Lopes e Ditchfield, 2009).

A análise de AMOVA mostrou que o marcador nuclear ISSR apresentou um valor superior de diversidade genética dentro de cada população quando comparado entre as duas populações, devido provavelmente a um pequeno número de indivíduos migrando entre as populações (Martins *et al.*, 2007; Aytekin *et al.*, 2011). O cálculo do número de imigrantes para o marcador mitocondrial

apresentou um valor de 1,24 enquanto o do marcador nuclear e mitocondrial foi de 0,28, indicando que as fêmeas migram com uma frequência maior em relação aos machos. Isto também foi observado em fêmeas de *Desmodus rotundus*, que de acordo com Martins *et al.*, (2007), usando marcador mitocondrial, mudam de colônias com certa frequência, não apresentando filopatria. Por outro lado, Koyama *et al.*, (2008) observaram um comportamento inverso em relação aos machos e fêmeas de leões-marinho, com o marcador ISSR. Neste caso as fêmeas apresentaram filopatria e os machos apresentaram uma maior dispersão.

A estruturação genética observada na espécie *L. aurita* pode ser devido ao seu hábito cavernícola e comportamento restrito ao nicho em que ocorre, uma vez que ao comparar com espécies de morcegos generalistas quanto ao habitat observa-se pouca estruturação geográfica, como visto em *Artibeus lituratus* e *Carollia perspicillata* que apresentam padrões de distribuição continental com baixos níveis de divergência intraespecífica com pouca estruturação geográfica. Isso pode ser explicado pela alta capacidade de dispersão dos indivíduos, facilitando a manutenção de alto fluxo gênico, mesmo entre populações distantes (Patterson *et al.*, 1992; Sinclair *et al.*, 1996; Ditchfield, 2000; Clare, 2011). Oliveira *et al.*, (2011) também observaram uma divergência genética significativa com o uso de marcadores moleculares ISSR no roedor *Chaetomys subspinosus* quando analisaram indivíduos de três populações desta espécie, indicando uma forte estruturação genética dentro de cada população.

As diferenças observadas entre os marcadores utilizados neste trabalho podem estar associadas às taxas de evolução específicas de cada um deles, uma vez que o gene *COI* é o que normalmente apresenta taxa de evolução mais lenta em relação ao ISSR, que leva a ideia de apresentar uma maior estruturação entre

populações distantes. Nossos dados mostram uma estruturação das populações, isto poderia estar de acordo com o fato de *L. aurita* apresentar uma capacidade de dispersão reduzida devido à restrição alimentar e hábito cavernícola com forte associação a áreas de mata conservada.

7. Conclusões

1. A presença de apenas um par de sítios de DNAr 5S em *Lonchorina aurita* reforça que esta represente a condição ancestral da família Phyllostomidae;
2. A presença de sinais de hibridização apenas na região terminal dos cromossomos de *L. aurita*, com ausência de ITS, suportam a ideia da presença de características plesiomórficas quando comparados com outras espécies de Phyllostomidae;
3. Os valores de *Fst* para os marcadores nucleares e mitocondriais indicam que as fêmeas de *L. aurita* migram com uma maior frequência em relação aos machos;
4. Os resultados dos marcadores moleculares mostraram através da nossa árvore filogenética, que a população de Triunfo é monofilética e a de Toritama é parafilética;
5. As duas populações de *L. aurita* apresentaram estruturação genética, o que seria esperado pela biologia desta espécie.

8. Referências Bibliográficas

- Alberico M, Cadena A, Hernández-Camacho J, Muñoz-Saba Y (2000) Mamíferos (Synapsida: Theria) de Colombia. *Biota Colomb.* (1):43-75.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.
- Aytekin I, Ozdil F, Zulkadir U, Boztepe S, Sariyel V (2011) Evaluation of ISSR markers for genetic diversity analysis in Anatolian Water Buffaloes. *J Sci Food Agric.* 91: 1957-1962.
- Baker RJ (1970) Karyotypic trends in Bats. In: Wimsatt, W.A. (Ed). *Biology of Bats*. Academic Press, NY (1): 65-96.
- Baker RJ, Bass RA (1979) Evolutionary relationship of the Brachyphyllinae to glossophaginae genera *Glossophaga* and *Monophyllus*. *Journal of Mammalogy* 60:364-372.
- Baker RJ, Maltbie M, Owen JG, Hamilton MJ, Bradley RD (1992) Reduced number of ribosomal sites in bats: evidenced for mechanism to contain genome size. *J Mammal* 73:847-858.
- Baker RJ, Hoofer SR, Porter CA, Van Den Bussche RA (2003) Diversification among New World leaf-nosed bats: An evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. *Occ Papers* 230:1-32.
- Barros HMDR, Sotero-Caio CG, Santos N, Souza MJ (2009) Comparative cytogenetic analysis between *Lonchorhina aurita* and *Trachops cirrhosus* (Chiroptera, Phyllostomidae). *Genet Mol Biol* 32(4):748-752.
- Bickham JW, TR Loughlin, JK Wickliffe, VN Burkanov (1998) Geographic variation in the mitochondrial DNA of Steller sea lions: Haplotype diversity and endemism in the Kuril Islands. *Biosphere Conserv.* 1:107-117.
- Cabral-de-Mello DC, Martins C, Souza MJ, Moura RC (2011) Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient Proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. *Cytogenet Genome Res* 132:89-93.
- Calixto MS, Andrade IS, Cabral-de-Mello, DC, Santos N, Martins C, Loreto V, Souza MJ (2013) Patterns of rDNA and telomeric sequences diversification: contribution to repetitive DNA organization in Phyllostomidae bats. *Genetica* (in press).
- Casiraghi M, Labra M, Ferri E, Galimberti A, De Mattia F (2010) DNA barcoding: theoretical aspects and practical applications. *Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems*-pp. 269-273.
- Clare EL, Lim BK, Frenton MB, Hebert PDN (2011) Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. *Plos One* 6 (7): 22648.
- Drouin G, Moniz de Sá MM (1995) The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol Biol Evol* 12:481-493
- Ditchfield AD (2000) The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraespecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. *Molecular Ecology* 9:1307-1318.
- Eisenberg JF, Redford KH (1999) *Mammals of the Neotropics, The Central Neotropics*. Chicago, The University of Chicago Press, v.3, p. 609
- Excoffier L, Lischer, HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

- Fagundes v, Camacho JPM, Yonenaga-Yassuda Y (2004) Are the dot-like chromosomes in *Trinomys iheringi* (Rodentia, Echimyidae) B chromosomes? *Cytogen. Gen. Res.* (106):159-164.
- Faria KC and Morielle-Versute E (2002) In situ hybridization of bat chromosomes with human (TTAGGG)_n probe, after previous digestion with Alu I. *Genetics and Molecular Biology*, (25):365-371.
- Faria KC, Marchesin SRC, Moreira PRL, Beguelini MR, Morielle-Versute E (2009) New insights into telomeric DNA sequence (TTAGGG)_n location in bat chromosomes. *Gen Mol Res* 8(3):1079-1084.
- Finato AO, Varella-Garcia M, Tajara EH, Taddei VA, Morielle-Versute E (2000) Intrachromosomal distribution of telomeric repeats in *Eumops glaucinus* and *Eumops perotis* (Molossidae, Chiroptera). *Chromosome Research* 8:563-569.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.
- Fu YX (1997) Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*, 147, 915-925.
- Gardner, AL (2008). *Mammals of South America. Marsupials, xenarthrans, shrews and bats.* The University of Chicago Press, Chicago, London, vol.1.
- Gall JG, Pardue ML (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Genetics*.63:379-383.
- Gennis RB (1992) Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa3-type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*: a brief review of progress to date. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, (1101):184-187.
- Girman DJ, Vila C, Geffen E, Creel, Mills MGL, McNutt JW, Ginsberg J, Kat PW, Mimiya H, Wayne RK (2001) Patterns of population subdivision, gene flow and genetic variability in the African wild dog (*Lycaon pictus*). *Molecular Ecology*. 10: 1703-1723.
- Gomes AJB, Rodrigues LRR, Rissino JD, Nagamachi CY, Pieczarka JC (2010) Biogeographical karyotypic variation of *Rhinophylla fischerae* (Chiroptera: Phyllostomidae) suggests the occurrence of cryptic species. *Comparative Cytogenetics*. 4(1):79-85.
- Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics* 23(4):177-172.
- Handley-Jr, e Ochoa J (1997) New species of mammals from northern South America: a sword-nosed bat, genus *Lonchorhina* Tomes (Chiroptera: Phyllostomidae). *Mem. Soc. Cien. Nat. La Salle* 57:71-82.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR (2003) Biological identification through DNA barcode. *Proceedings of the Royal Society of London Serie B, Biological sciences*, 279, 313-322.
- Hebert PD, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM (2004) Identification of Birds through DNA Barcodes. *PloS Biology* 2 (10): 312.
- Hernández-Dávila A, Vargas JA, Martínez-Méndez N, Lim BK, Engstrom MD, Ortega J (2012) DNA barcoding and genetic diversity of phyllostomid bats from the Yucatan Peninsula with comparisons to Central America. *Mol Ecol Resour.* 12(4):590-597.

- Hoffmann FG, Baker, RJ (2003) Comparative phyllogeography of short tailed bats (*Carollia*:Phyllostomidae). *Molecular Ecology*, 12: 3403-3414.
- Holmes B (2004) Barcode me. *New Scientist*. 32-35.
- Hsu T, Spirito SE, Pardue ML (1975) Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* 53:25-36.
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)(n) generated by PCR. *Nucleic Acids Res* 19(17):4780.
- Kasahara S (2009) Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto - S.P., 160p.
- Kim KS, Tanaka K, Ismail DB, Maruyama S, Matsubayshi H, Endo H, Futuka K, Kimura J (2004) Cytogenetic comparison of the lesser mouse deer (*Tragulus javanicus*) and the greater mouse deer (*T. napu*). *Caryologia* 57:229–243.
- Larsen PA, Hooper SR, Bozeman MC, Pedersen SC, Genoways HH, Phillips CJ, Pumo DE, Baker RJ (2007) Phylogenetics and Phylogeography of the *Artibeus jamaicensis* Complex Based on Cytochrome-*b* DNA Sequences. *Journal of Mammalogy*, 88(3):712-727.
- Lee C, Sasi R, 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.
- Leite-Silva C, Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y, Souza MJ (2003) Karyotypic characterization of the bat species *Molossus ater*, *M. molossus* and *Molossops planirostris* (Chiroptera, Molossidae) using FISH and banding techniques. *Hereditas* 138: 94-100.
- Koyama S, Fujita S, Hirota T, Satoh T, Obara Y, Hoshino H, Wada A, Burkanov VN and Wada K (2008) Genetic Structure of Steller Sea Lion (*Eumetopias jubatus*) Rookeries in the Sea of Okhotsk. *Zoological Studies* 47(6): 781-787
- Levsky JM and Singer RH (2003) Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Science* 116: 2833-2838.
- Li A, Ge S (2001) Genetic Variation and Clonal Diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) Detected by ISSR Markers, *Annals of Botany* 87: 585--590.
- Lomholt B, Christensen K and Frederiksen S (2002) Guinea pig (*Caio cambayo*) 5S rRNA genes map to 7q2, 20q2 and 30q2 shown by an R-banded karyotype with PNA-FISH. *Hereditas* 136:104–107.
- Lopes SR, Ditchfield AD (2009) Phylogeography of *Lonchorhina aurita* (Phyllostomidae) from coastal Brazilian Atlantic Forest. *Chiroptera Neotropical*. 15(1).
- Martins FM, Ditchfield AD, Meyer D, Morgante JS (2007) Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45: 372-378.
- Mattapalli MJ, Ali S (1999) Analysis of conserved microsatellite sequences suggests closer relationship between water buffalo *Bubalus bubalis* and sheep *Ovis aries*. *DNA Cell Biol* 18:513–519.
- Medrano JF, Aasen E, Sharrow L (1990) DNA extraction nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8:43.
- 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 sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99:3–10.
- Morielle E, Varella-Garcia M (1988) Variability of nucleolus organizer regions in Phyllostomid bats. *Rev. Brasil. Genet* 11:853–871.
- Moyzis RK, JM Buckingham, LS Cram, M Dani, LL Deaven, MD Jones, J Meyne, RL Ratliff, and JR Wu. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6622–6626.
- Multani AS, Ozen M, Furlong CL, Zhao YJ, Hsu TC, Pathak S (2001) Heterochromatin and interstitial telomeric DNA homology. *Chromosoma* 110: 214–220.
- Nagaraja, Nagaraju J and Ranganath HA (2004) Molecular phylogeny of the *Nasuta* subgroup of *Drosophila* based on 12S rRNA, 16S rRNA and Col mitochondrial genes, RAPD and ISSR polymorphisms. *Genes Genet. Syst* 79, p. 293–299
- Nesi N, Nakouné E, Cruaud C, Hassanin A (2011) DNA barcoding of African fruit bats (Mammalia, Pteropodidae). The mitochondrial genome does not provide a reliable discrimination between *Epomophorus gambianus* and *Micropteropus pusillus*. *C R Biol.* 334(7):544-554.
- Oliveira CG, Martinez RA, Giné GAF, Faria DM, Gaiotto FA (2011) Genetic assessment of the Atlantic Forest bristle porcupine, *Chaetomys subspinosus* (Rodentia: Erethizontidae), an endemic species threatened with extinction. *Genetics and Molecular Research* 10 (2): 923-931.
- Ono T, Yoshida MC (1997) Differences in the chromosomal distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in two species of the vespertilionid bats. *Chrom Res* 5:203–205.
- Pacheco, V. Patterson, B. D. (1991) Phylogenetic relationships of the New World bat genus *Sturnira* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 206: 101- 121.
- Paglia Ap, Fonseca Gabda, Rylands Ab, Herrmann G, Aguiar Lms, Chiarello A G, Leite Ylr, Costa Lp, Siciliano S, Kierulff Mcm, Mendes Sl, Tavares Vdac, *Annotated Checklist of Brazilian Mammals*. 2ª Edição / 2nd Edition. *Occasional Papers in Conservation Biology*, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. 76p.
- Mittermeier Ra And Patton JI (2012). *Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil* /
- Palumbi SR, Cipriano F (1998) Species identification using genetic tool: the value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. *Journal of Heredity*, 89: 459-464.
- Patterson, B. D; Pacheco V.; Asheley, M. V. 1992. On the origins of Western Slope endemism: systematic of fig-eating bats, genus *Artibeus*. *Memorias Del Museu de Historia Natural* 21: 189-2005.
- Patton JC, Baker RJ (1978) Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoid bats. *Syst Zool* 27:449-462.
- Peracchi AL, Lima IP, Reis NR, Nogueira MR, Ortêncio-Filho H (2006) Ordem Chiroptera. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. *Mamíferos do Brasil*, Londrina, p.155-200.
- Pieńkowska A, Switonski M (1998) Chromosomal localization and activity of nucleolar organizer regions in the dog (*Canis familiaris*). *Genetics Selection Evolution* 30: 79-84.
- Puerma E, Acosta MJ, Barragán MJ, Martínez S, Marchal JA, Bullejos M, Sánchez A (2008) The karyotype and 5S rRNA genes from Spanish individuals of the bat

- species *Rhinolophus hipposideros* (Rhinolophidae, Chiroptera). *Genetica* 134:287-295.
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128:9-17.
- Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP (2007) *Morcegos do Brasil*, 1ª edição, 37-127.
- Reis, NR, Peracchi, AL, Pedro, WA, Lima, OP (2011) *Morcegos do Brasil*. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 17-253.
- Ribeiro NAB, Nagamachi CY, Pieczarka JC, Rissino JD, Neves ACB, Gonçalves ACO, Marques-Aguiar S, Assis MFL, Barros RMS (2003) Cytogenetic analysis in species of the subfamilie Glossophaginae (Phyllostomidae, Chiroptera) supports a polyphyletic origin. *Caryologia* 56(1):85.
- Russelo MA, Amato G (2003) A molecular phylogeny of Amazona: implications for Neotropical parrot biogeography, taxonomy, and conservation. *Mol. Phylogen. Evol.* 30(2):421-437.
- Santos N, Souza MJ (1998) Use of fluorochromes chromomycin A3 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, Souza MJ (2001) Comparative karyology of brazilian vampire bats *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata* (Phyllostomidae, Chiroptera): banding patterns, base-specific fluorochromes and FISH of ribossomal genes. *Hereditas* 134: 189-194.
- Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y, Souza MJ (2002) Localization of rRNA genes in Phyllostomidae bats reveals silent NORs in *Artibeus cinereus*. *Hereditas*, 136: 137-143.
- Saraste M (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Quarterly Reviews of Biophysics* 23: 331–366.
- Schug MD, Hutter CM, Wetterstrand KA, Gaudette MS, Mackay TFC, Aquadro CF (1998) The mutation rates of di-, tri- and tetranucleotide repeats in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology Evolution*. 15: 1751–1760.
- Silva AM, Marques-Aguiar SA, 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. *Gen Mol Biol* 28(2):248–253.
- Simmons NB (2005) *Mammal species of the world: A Taxonomic and geographic reference*. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 3ªed, v1, Souza e Araújo, 1990.
- Sinclair EA, Webb NJ, Marchant AD, Tidemann CR (1996). Genetic variation in the little red flying-fox, *Pteropus scapulatus* (Chiroptera:Pteropodidae): implications for management. *Conservation Biology* 76:45–50
- Stitou S, Díaz de la Guardia R, Jiménez R, Burgos M (2000) Inactive ribosomal cistrons are spread throughout the B chromosomes of *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae). Implications for their origin and evolution. *Chromosome Res* 8:305-311.
- Souza MJ, Araújo MCP (1990) Conservative pattern of the G-bands and diversity of C-banding patterns and NORs in Stenodermatinae (Chiroptera-Phyllostomatidae). *Rev Brasil Genet* 13:255–268.
- Sumner AT (1972) A sample technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* 75:304-306.
- Sumner AT (2003) *Chromosomes: Organization and Function*. Blackwell Science Ltd., UK. 1-287.

- Svartman M, Vianna-Morgante AM (2003) Conservation of chromosomal location of nucleolus organizer in American marsupials (Didelphidae). *Genetica* 118:11-16.
- Tajima F (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599.
- Tavares ES, Baker AJ, Pereira SL, Miyaki CY (2006) Phylogenetic relationships and historical biogeography of Neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Syst Biol.* 55: 454–470.
- Tucker PK (1986) Sex chromosome-autosome translocations in the leaf-nosed bats family Phyllostomidae. I. Mitotic analyses of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae. *Cytogenet Cell Genet.* 43:19–27.
- Varella-Garcia M, Morielle-Versute E, Taddei VA (1989) A survey of cytogenetic data on Brazilian bats. *Rev Brasil Genet* (12):761-793.
- Verma SK, Singh L (2003) Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application. *Molecular Ecology Notes*.3:28-31.
- Ward RD, Ard RD, Holmes BH, Zemlak TS, Smith PJ (2007) DNA barcoding discriminates spurdogs of the genus *Squalus*. In: Last PR, White WT e Pogonoski JJ (Eds.) Descriptions of new dogfishes of the genus *Squalus* (Squaloidea: Squalidae). Australia: CSIRO, Marine and Atmospheric Research, 117–130p.
- Ward RD (2009) DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Mol. Ecol. Res.* 9(4): 1077–1085.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics* 28: 139-156.
- Wu KS, Jones R, Dannaberger L, Scolnik PA (1994) Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res* 22: 3257–3258.

9. Anexos

9.1 Protocolos

9.1.1 Bandeamento C (Baseado em Sumner, 1972)

1. Mergulhar a lâmina em uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,2 N por 30 minutos a temperatura ambiente.
2. Lavar com água destilada.
3. Mergulhar a lâmina em solução de hidróxido de bário (BaOH) 5% a 60 °C por 30 segundos a 1 minuto.
4. Lavar em banhos rápidos de HCl 0,2 N e água destilada.
5. Mergulhar em solução de 2 x SSC a 60 °C por 45 minutos.
6. Lavar com água destilada.
7. Corar com uma solução de Giemsa a 2% por 10 minutos

9.1.2 Reações de PCR DNAr 5S

Preparo do mix de reação

Reagente	Quantidade
Tampão Taq 10x	2,5 µL
Taq polymerase (5U/µL)*Invitrogen, 11615-010	0,25 µL
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µL
dNTP (8 µM)	0,8 - 1,0 µL
DNA (150,0 – 200,0 mg/µL)	1,0 µL
Pimer F (10,0 µM)	1,0 µL
Primer R (10,0 µM)	1,0 µL
H ₂ O mili-Q (q.s.p. 25,0 µL)	q.s.p. 25,0 µL

Ciclos para a PCR

Etapa	Temperatura	Tempo	
1	95 °C	5 min	
2	95 °C	40 seg	← 30x
3*	X °C	40 seg	
4	72 °C	1 min	
5	72 °C	5 min	
6	4 °C	Forever	

* Ciclo de anelamento do primer: X = 54 (reação DNAr 5S).

9.1.3 Marcação da sonda através da reação de PCR

Utilizar o plasmídeo com inserto do gene de RNAr 5S para a reação de PCR.

A reação é semelhante a uma reação de identificação de inserto.

Mix de reação

Reagente	Quantidade
Tampão Taq 10x	2,5 µL
Taq polymerase (5U/µL)* ^{Invitrogen, 11615-010}	0,25 µL
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µL
dNTP (8 mM)*	0,8 - 1,0 µL
DNA (1.000 ng/µL)	0,3 µL
Pimer F (10,0 µM)	1,25 µL
Primer R (10,0 µM)	1,25 µL
H ₂ O mili-Q (q.s.p. 25,0 µL)	q.s.p. 25,0 µL

* Utilizar os dNTPs em separado (2 mM): Adicionar igual volume de dCTP, dGTP, dTTP. Para o dTTP deve ser usado 70% do volume usado para os outros dNTPs e 30% do Digoxigenin-11-dUTP (Roche, cat. no. 11573152910). Checar inicialmente a concentração dos reagentes.

9.1.4 Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

1 – Pré-tratamento das lâminas

- o Fixar as Lâminas em Carnoy por 15 minutos;
 - o Desidratar em série alcoólica: 5 min em etanol 70% e 100%;
- Incubar as lâminas a 60 °C por 30min;
- Deixar esfriar por 5-10min;
- Marcar a lâmina com lápis de diamante;
- RNase:
 - o Incubar as lâminas com 50 µL de solução de RNase por 1h a 37 °C em câmara úmida pré-aquecida;
Solução estoque de RNase (4 °C): 20 mg/mL de RNase (Invitrogen)
Solução de RNase para uso: 100 µg/mL em 2 x SSC (diluição 1:200)
- Lavar as lâminas 3 x 5 min em 2 x SSC.
- Pepsina:
 - o Incubar as lâminas com 50 µL de solução de pepsina por 20 min a 37 °C em câmara úmida pré-aquecida;
Solução estoque de pepsina (20 °C): 1 mg/mL em H₂O miliQ
Solução de pepsina para uso: 10 µg/mL em 0,01 N HCl (diluição 1:100)
- Lavar as lâminas 2x 5 min em 2 x SSC;
- Colocar as lâminas no PBD + formaldeído por 10min;
- Lavar as lâminas 2 x 5 min em 2 x SSC;
- Série alcoólica: 5 min em etanol 70% e 5 min em etanol 100%;
- Colocar as lâminas na estufa a 37 °C até secar (aprox. 10-15 min);
- Preparar o mix de sonda.

2 – Hibridização

- Preparar a **mistura de hibridização** (76% de estringência):

Quantidade/Reagente	Concentração inicial	Concentração final
6 µL sonda	200-250ng	
15 µL formamida	100%	50%
6 µL sulfato de dextran	50%	10%
3 µL 20XSSC	20XSSC	2XSSC

OBS: A quantidade final do mix poderá variar dependendo da quantidade de sonda utilizada.

- Dar um vortex na mistura de hibridização por no mínimo 10 s;
- Aquecer a mistura de hibridização a 95 °C por 10 min e transfira para o gelo por pelo menos 5 min;
- Dar um spin e coloque a **mistura de hibridização** na lâmina, cubra com lamínula de vidro;
- Desnaturar as lâminas a 75 °C por tempo variável (o tempo de desnaturação varia de acordo com a espécie);
 - o Incubar em câmara úmida pré-aquecida a 37 °C de 18 a 72 h

3 – Banhos pós-hibridização

- Retirar as lâminas da câmara úmida e retirar cuidadosamente a lamínula;
Incubar as lâminas em 2 x SSC TA, por 5 min;

Lavagem convencional (72% de Estringência):

- Incubar 2 vezes em 2 x SSC, 42 °C, por 5 min;
- Incubar 2 vezes em 0,1 x SSC, 42 °C, por 5 min;
- Incubar em 2 x SSC, 42 °C, por 5 min;

- Transferir para 2 x SSC, TA, por 10 min;
- Transferir para o PBD a 45 °C até preparar o anticorpo.

4 – Detecção (para sondas marcadas indiretamente)

Anticorpos primários:

0,5 µL de rodamina ou 0,30 µL de FITC

99,5µL de PBD

Soma por lâmina: 100 µL

- Aplicar o mix na lâmina e cobrir com lamínula ou parafilme e incubar a 37 °C em câmara úmida por 45min (FITC) e 30min (rodamina);
- Remover o parafilme e lave 3 vezes em PBD por 2 min cada.

* Amplificação do sinal com Anti-avidina

1,0 µL de anti-avidina

29 µL de PBD

Soma por lâmina: 30 µL

- Aplicar na lâmina e cobrir com lamínula e incubar a 37 °C por 10min;
- Remover o parafilme e lave 2 vezes em PBD por 2 min cada;
- Aplicar 20 µL de DAPI e cobrir com parafilme e deixar por 15 min;
- Remover parafilme, cobrir com lamínula e selar com esmalte.
- Quando utilizar Iodeto de propídeo com Vectashield, aplicar 8 a 10 µL, cobrir com lamínula e selar com esmalte.

9.1.5 Ciclos para a PCR (ISSR)

Etapa	Temperatura	Tempo	
1	94 °C	5 min	
2	94 °C	30 seg	
3	50 °C	30 seg	35x
4	72 °C	1 min	
5	72 °C	5 min	
6	10 °C	Forever	

Mix de reação para os *primers* de ISSR 1 e 3.

Reagente	Volume	Concentração final
H ₂ O	11.8 µL	-
Solução tampão	3 µL	1x
MgCl ₂	0.8 µL	2mM/ µL
dNTP	0.5 µL	2,5 mM / µL
<i>Primer</i> ISSR	1 µL	0,5 mM / µL
Taq Polimerase	0.4 µL	2U / µL
DNA	1 µL	~15ng

9.1.6 Ciclos para a PCR (COI)

Etapa	Temperatura	Tempo	
1	94 °C	4 min	
2	94 °C	30 seg	
3	47 °C	40 seg	
4	72 °C	1 min	5x
5	94 °C	30 seg	
6	50 °C	40 seg	
7	72 °C	1 min	35x
8	72 °C	10 min	

Mix de reação para os *primers* do gene COI.

Reagente	Volume	Concentração final
H ₂ O	7.9 µL	-
Solução tampão	4.0 µL	1x
MgCl ₂	0.8 µL	2mM/ µL
dNTP	2.0 µL	2,5 mM / µL
<i>Primer F/R</i>	2/2 µL	0,5 mM / µL
Taq Polimerase	0.3 µL	2U / µL
DNA	1 µL	~15ng

9.1.7 Purificação de PCR utilizando PEG 8000

1. Verificar a qualidade do produto de PCR em gel de agarose.
2. Transferir, se necessário, o produto de PCR para um tubo de microcentrífuga de 0,5ml.
3. Adicionar 1 volume de solução de PEG (PEG 8000 20% NaCl 2,5M) ao PCR.
4. Incubar a 37 °C por 30 minutos.
5. Centrifugar a 13.000 RPM por 20 minutos. Coloque os tubos fechados com a alça da tampa voltada para a parte externa do rotor (assim você saberá onde sedimentará o pellet já que não será possível vê-lo)
6. Retirar o sobrenadante com o auxílio de um micropipetador P20-200 suavemente.
7. Adicionar 125µl de etanol 80% gelado. Espere 1 minuto e centrifugue por 2 minutos a 13000 RPM.
8. Retirar o sobrenadante com o auxílio de um micropipetador P20-200 suavemente.
9. Repetir os passos 7 e 8.
10. Deixar evaporar o etanol residual utilizando o banho seco, estufa ou deixe sobre a bancada. Cubra com papel higiênico para que não entre sujeira no tubo.
11. Ressuspender o pellet entre 5 e 15 µl* de água Milli-Q fervida por pelo menos 2 horas (overnight de preferência). *O volume de água dependerá da concentração inicial do PCR, ajuste conforme sua necessidade.
12. Quantificar o produto purificado em gel de agarose. (1-2µl).