

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ, *CAMPUS* DE UNIÃO DA VITÓRIA
COLEGIADO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

KARINE LARISSA KURYLUK

ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM *Molossus molossus* (CHIROPTERA,
MOLOSSIDAE) DE UMA POPULAÇÃO DO CENTRO-SUL DO PARANÁ

UNIÃO DA VITÓRIA
2023

KARINE LARISSA KURLUK

ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM *Molossus molossus* (CHIROPTERA,
MOLOSSIDAE) DE UMA POPULAÇÃO DO CENTRO-SUL DO PARANÁ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de licenciada em Ciências Biológicas, ao colegiado de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Estadual do Paraná, *Campus* de União da Vitória.

Orientador (a): Prof. Dr. Rafael Bueno Noletto
Coorientador (a): Prof. Dr. Alan Deivid Pereira

UNIÃO DA VITÓRIA

2023

TERMO DE APROVAÇÃO DA BANCA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE
CURSO

KARINE LARISSA KURYLUK

ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM *Molossus molossus* (CHIROPTERA,
MOLOSSIDAE) DE UMA POPULAÇÃO DO CENTRO-SUL DO PARANÁ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do título de licenciada em Ciências Biológicas, ao colegiado de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Estadual do Paraná, Campus de União da Vitória, pela seguinte banca examinadora:

Orientador Prof. Dr. Rafael Bueno Noletto
Colegiado de Ciências Biológicas, UNESPAR

Dra. Geize Aparecida Deon
Doutora em Genética Evolutiva e Biologia Molecular
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Dr. Sebastião Venâncio Neto
Doutor em Genética animal
Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná -
UFPR

UNIÃO DA VITÓRIA, 21 DE DEZEMBRO DE 2023

:

Dedico a minha filha, meu marido
e aos meus pais .

AGRADECIMENTOS

Durante esta jornada, pude compreender a importância do auxílio e suporte para meu desenvolvimento. Nesse sentido, antecipo minhas desculpas àqueles que, de alguma maneira, contribuíram para este trabalho e não foram mencionados aqui. A essas pessoas, expresso minha sincera gratidão.

Primeiramente quero agradecer em especial à minha filha Melissa, você é quem me motiva a continuar, e quero que saiba que meus esforços são por você.

Ao meu marido Tiago, por toda a força, amparo, consolo e motivação, seu apoio me sustentou nos momentos mais desafiadores, você me motivou a não desistir e me impulsionou cada vez mais.

Aos meus pais, que estiveram ao meu lado me motivando e me dando forças para crescer sempre mais e nunca desistir.

À minha irmã, Karin, Obrigada pela companhia, por me ajudar nas tarefas e trabalhos da faculdade.

A minha amiga Beatriz, por fazer do meu último ano, um dos melhores, sua companhia foi muito importante para mim, sou grata pelos momentos de chá.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem avaliar e colaborar com aprimoramento deste trabalho.

Ao meu coorientador, professor Dr. Alan, obrigada pelos momentos divertidos durante as coletas de morcegos, pela orientação e contribuição para realização deste projeto.

Finalizo aqui com um agradecimento em especial a uma pessoa que foi super importante para realização deste trabalho, meu orientador Prof Dr. Rafael Bueno Noleto. Obrigada, por me apoiar, acreditar e investir na minha formação. Agradeço pelos momentos de descontração, pelas orientações construtivas quando me pedia para fazer os cálculos. Você me inspira, admiro seu entusiasmo, dedicação e exemplo de seriedade e profissionalismo.

Por fim, agradeço a Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR) pela estrutura e ambiente proporcionados durante meus anos de graduação, pelas oportunidades e projetos nos quais participei.

Agradeço a todos que colaboraram, obrigada!

*“Se der certo ou não, não importa.
O que importa é que eu tentei e fui o mais longe que pude.”
Dean Winchester*

RESUMO

Os morcegos, pertencentes à ordem Chiroptera, desempenham um papel fundamental nos sistemas ecológicos, se destacando por serem os únicos mamíferos com capacidade de voo. A família Molossidae, à qual pertencem os indivíduos da espécie *Molossus molossus*, se caracteriza pela cauda livre que se projeta além da membrana interfemural e por glândulas odoríferas que provocam forte odor em suas colônias. Nesta família a espécie *M. molossus* tem uma ampla distribuição, do sul da América do Norte ao Uruguai, sendo morcegos exclusivamente insetívoros. O presente estudo teve como objetivo, a partir de marcadores cromossômicos, analisar a estrutura cariotípica da espécie *M. molossus* coletada no município de União da Vitória, no centro-sul do Paraná. A obtenção de cromossomos mitóticos foi a partir de medula óssea do osso úmero. Técnicas convencionais de coloração e bandamento foram realizadas a fim de melhor caracterizar a microestrutura cariotípica da espécie. A comparação dos resultados deste estudo com cariótipos de outras populações de *M. molossus* revelou uma diferença no número fundamental (NF): enquanto algumas populações apresentam NF=64 para fêmeas e NF=63 para machos, a população do centro-sul do Paraná exibiu um NF=61 em machos, devido ao cromossomo Y ser do tipo acrocêntrico. O bandamento C revelou blocos heterocromáticos restritos à região pericentromérica de todos os cromossomos, incluindo o cromossomo Y. Este último apresenta um menor grau heterocromático em comparação com o de outras populações. Essas variações cromossômicas intraespecíficas sugerem que a população paranaense de *M. molossus*, se apresenta estruturada e fixando certos rearranjos na ausência de fluxo gênico com outras populações ao longo do Brasil. A técnica de coloração com nitrato de prata identificou as Regiões Organizadoras de Nucléolo (Ag-RONs) na região proximal do braço longo do par 9, coincidente em localização com constrições secundárias e com heterocromatinas constitutivas. Esta localização já foi encontrada em outras populações, representando assim um marcador cromossômico espécie-específico. Este estudo constitui a primeira descrição do cariótipo da espécie *M. molossus* no estado do Paraná. Abordagens adicionais com marcadores mais resolutivos, incluindo o estudo molecular da porção heterocromática do cariótipo, serão realizadas a fim de melhor aprofundar nossa compreensão da diversidade cromossômica desta espécie em diferentes regiões do Brasil.

Palavras-chave: Cromossomos – Heterocromatina – Morcegos Neotropicais – rDNA

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Espécie *M. molossus* (Pallas, 1766), popularmente conhecida como morcego da cauda-grossa. Barra= 1 cm.....15
- FIGURA 2 – Cariótipo da espécie *M. molossus* submetidos à coloração convencional com Giemsa. Barra = 10 μ m.....19
- FIGURA 3 – Cariótipo da espécie *M. molossus* submetidos à técnica de bandamento C, demonstrando o padrão de heterocromatina constitutiva do Par 9 portador do rDNA 45S corado com prata (box). Barra = 10 μ m.....21
- FIGURA 4 – Metáfases de *M. molossus* submetidos à dupla coloração com fluorocromos. Indicado o padrão de coloração do par portador do rDNA 45S (par 9). Barra = 10 μ m.....22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2n - Número Diploide

AgNO₃ - Nitrato de prata

CMA³ - Cromicina A³

DAPI - 4,6-diamidino-2-fenilindol

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

HCl - Ácido Clorídrico

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

KCl – Cloreto de Potássio

NF - Número Fundamental

RON – Região Organizadora de Nucléolo

DNAr - DNA ribossomal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 BIOMA MATA ATLÂNTICA.....	15
3.2 CITOGENÉTICA DE QUIRÓPTEROS COM ÊNFASE EM MOLOSSÍDEOS.....	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 TIPO DE PESQUISA.....	18
4.2 ÁREA DE ABRANGÊNCIA.....	18
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
4.3.1 Obtenção de metáfases a partir da medula óssea.....	19
4.3.2 Detecção da Heterocromatina Constitutiva.....	20
4.3.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos.....	20
4.3.4. Dupla coloração Cromomicina A3/DAPI.....	20
4.3.5 Análises cromossômicas:.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	21
5.1 NÚMERO DIPLOIDE E MORFOLOGIA CROMOSSÔMICA.....	22
5.2 HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA.....	24
5.3 DUPLA COLORAÇÃO COM FLUOROCROMOS CMA3/DAPI.....	25
5.4 REGIÕES ORGANIZADORAS DO NUCLÉOLO (RONS).....	27
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Reis *et al.* (2007) a ordem Chiroptera, palavra derivada do grego *cheir* (mão) e *pteron* (asa), é o grupo de mamíferos mais diversificado do mundo. Mesmo possuindo todas as características comuns aos demais mamíferos, são os únicos dentro da classe Mammalia com a real capacidade de voar (Reis *et al.*, 2007, 2017). Esta ordem abriga 21 famílias e engloba 1.460 descritas no mundo todo (Mammal Diversity, 2023), estando distribuída em todos continentes, exceto em algumas ilhas do Pacífico e regiões muito frias ou de altitude extrema (Hill; Smith, 1988). Atualmente no Brasil a fauna de quirópteros está representada por 181 espécies de morcegos oficialmente registradas (Garbino *et al.*, 2022), o que corresponde a 24.1% de todos os mamíferos do país (Abreu *et al.*, 2021), sendo que, ao menos 118 dessas espécies foram registradas no bioma Mata Atlântica (Varzinczak *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2017). Esses mamíferos se destacam pela diversidade em espécies e por ocuparem variados e diferentes habitats, também pela complexidade funcional do grupo e sua importância ecológica (Flores; Chumacero, 2010; Kunz *et al.* 2011). Possuem a maior plasticidade alimentar entre todas as ordens de mamíferos, consumindo pólen, néctar, partes florais, folhas, frutos, artrópodes, peixes, anfíbios, lagartos, aves, mamíferos de pequeno porte e sangue (Reis *et al.*, 2017).

A ordem Chiroptera através de dados morfométricos e comportamentais, foi subdividida em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera (Simmons, 2005). Estudos filogenéticos recentes baseados em dados morfológicos e moleculares, reclassificaram em duas subordens a Yinpterochiroptera, representada pelas espécies pertencentes às famílias Rhinolophidae e pela antiga família Pteropodidae, além de Yangochiroptera, que tem como representantes as famílias Nycteridae, Emballonuridae, Phyllostomidae, Mormoopidae, Noctilionidae, Furipteridae, Thyropteridae, Myzopodidae, Mystacinidae, Natalidae, Molossidae, Miniopteridae, Cistugidae e Vespertilionidae (Teeling *et al.*, 2005; Hutcheon; Kirsch, 2006; Fenton *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2017). No Brasil, ocorrem nove das 16 famílias da subordem Yangochiroptera, sendo elas: Emballonuridae, Phyllostomidae, Mormoopidae, Noctilionidae,

Furipteridae, Thyropteridae, Natalidae, Molossidae e Vespertilionidae (Abreu *et al.*, 2021).

A família de morcegos insetívoros Molossidae compõem um importante segmento da fauna de quirópteros brasileiros, com implicações ecológicas, econômicas e sanitárias (Taddei, 1999). Constituem-se de 134 espécies no mundo agrupadas em 21 gêneros, sendo encontradas nas regiões tropicais do mundo (Mammal Diversity, 2023). No Brasil, a família Molossidae é representada por 8 gêneros e 32 espécies distribuídas por todo o território (Garbino *et al.*, 2022). Estes morcegos são caracterizados pela cauda livre que se projeta além da membrana interfemural e por glândulas odoríferas que provocam forte odor em suas colônias (Reis *et al.*, 2017). Possuem coloração marrom, preta ou cinza, os membros inferiores são curtos e fortes, com pés estreitos, apresentam focinho largo, orelhas são largas de tamanho e forma variáveis, há dimorfismo sexual, uma vez que os machos são maiores do que as fêmeas (Peracchi *et al.*, 2006). Esses organismos são gregários e podem constituir colônias de tamanhos variados e devido à sua dieta restrita, alimentando-se principalmente de insetos (Silva *et al.*, 2003), percorrendo centenas de quilômetros em busca de alimentos (Macdonald, 2001). Os Molossidae são considerados os mais rápidos entre os morcegos e tendem a voar bem acima da copa das árvores e fora de alcance humano, dificultando a coleta. Por consequência, essa família não possui grande representação em coleções científicas, tornando o conhecimento taxonômico e ecológico escassos (Fabian; Gregorin, 2007). Morcegos desta família compõem um importante segmento da fauna de quirópteros brasileiros, com implicações ecológicas, econômicas e sanitárias (Taddei, 1999).

O gênero *Molossus* é o 3º táxon mais rico dentre as espécies da família molossidae, possui uma distribuição essencialmente neotropical, ocorrendo do sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina, incluindo diversas ilhas caribenhas, como as Grandes e Pequenas Antilhas, Antilhas Holandesas e Trinidad e Tobago (López-González; Presley, 2001). O gênero é definido por uma série de características anatômicas, tais como: orelhas de tamanho mediano e levemente triangulares, antítrago arredondado e destacado da borda basal da orelha, incisivos superiores em linha com os caninos e afilados e convergentes, lábios

superiores lisos, sem sulcos ou verrugas, mas com uma ilhota de pelos curtos, negros e apicalmente espatulado abaixo das narinas, crista sagital bem desenvolvida, principalmente nos machos, e rostro obtuso (Reis *et al.*, 2017).

Quirópteros da espécie *Molossus molossus* (Pallas 1766) são morcegos exclusivamente insetívoros com ampla distribuição pelas Américas e pelo território brasileiro (Fabian; Gregorin 2007). No Brasil, a espécie está presente em cinco grandes biomas (Amazônia, Floresta Atlântica, Cerrado, Caatinga e Pantanal, (Sartore *et al.*, 2017).

Embora nos últimos anos descrições das relações filogenéticas dos gêneros de molossídeos tenham sido propostas tanto para dados morfológicos (Gregorin, 2000), quanto para dados moleculares (Ammerman *et al.*, 2012), segundo Lindsey e Ammerman (2016), a falta de dados genéticos para espécies de *Molossus* são aparentes, e estudos adicionais sobre as relações filogenéticas deste gênero, são necessários. Abordar essa carência de informações é crucial para avançar nosso conhecimento sobre a biogeografia, evolução e diversidade dessa família de morcegos como um todo.

Os primeiros estudos sobre cariótipos de morcegos datam da primeira década do século XX (Bovey, 1949). Mas somente após 1956, com o desenvolvimento de novas técnicas para obtenção de cromossomos em mamíferos, em especial a de Ford e Hamerton (1956), no qual introduziram o uso de colchicina seguida da hipotonização das células com citrato de sódio, reiniciaram-se os estudos citogenéticos em morcegos. A partir daí, e com o advento e aperfeiçoamento de novas metodologias, diversos estudos foram publicados relativos à morfologia e número cromossômico dos quirópteros. Apesar do grande sucesso das técnicas, apenas 21 das 875 espécies conhecidas tiveram seus cariótipos descritos até 1965 (Baker, 1970).

No Brasil, os primeiros estudos sobre o número e morfologia dos cromossomos de espécies de morcegos foram conduzidos por Beçak *et al.*, (1968; 1969), Yonenaga (1968), Yonenaga *et al.*, (1969) e Toledo (1973). Por volta de 1989, apenas 25% das espécies registradas em nosso território tinham seus cariótipos descritos a partir de espécimes capturados no Brasil (Varella-Garcia *et al.*, 1989), quadro que vem mudando lentamente, indicando que a quiropterofauna

brasileira carece ainda de estudos mais aprofundados nessa área (Reis *et al.*, 2007). Diante do que foi exposto, o presente trabalho teve como finalidade realizar uma caracterização cromossômica de um indivíduo macho da espécie *M. molossus* de uma população do centro-sul do Paraná, no sentido de cobrir uma escassez de estudos dessa natureza em populações paranaenses.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A partir de dados cromossômicos descrever possíveis novos padrões cariotípicos para a espécie *Molossus molossus* (Chiroptera, Molossidae) proveniente da Mata Atlântica paranaense.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar cariótipos de indivíduos da espécie *M. molossus* que ocorrem na Mata Atlântica centro-sul paranaense a partir de marcadores citogenéticos clássicos e moleculares;
2. Comparar a estrutura cariotípica da população paranaense com a de outras já descritas;
3. A partir de dados cromossômicos, acrescentar subsídios na discussão sobre a evolução cromossômica do gênero.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOMA MATA ATLÂNTICA

A Mata Atlântica representa o terceiro maior bioma do Brasil e a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano, com uma extensão original de cerca de 1.360.000 km², estendendo-se desde o litoral do Nordeste até o Rio Grande do Sul e adentra o interior do continente a partir das regiões Sudeste e Sul até a Argentina e o Paraguai (Cardoso, 2016), representando um *hotspot* de biodiversidade (Ribeiro *et al.*, 2009). Apesar de originalmente ocupar uma área equivalente a 15% do território nacional (Brasil, 2002), atualmente, a Mata Atlântica está reduzida a 7,84% de sua área, com cerca de 102.000 Km² (Apremavi, 2023). Mesmo reduzida e muito fragmentada, estima-se que a Mata Atlântica possua cerca de 20.000 espécies vegetais, ou seja, entre 33% e 36% das espécies existentes no Brasil, o levantamento da fauna indica que a mata atlântica abriga 849 espécies de aves, 370 espécies de anfíbios, 200 espécies de répteis, 270 de mamíferos e cerca de 350 espécies de peixes (Campanili; Schaffer, 2010). O conjunto de diferentes ecossistemas favorece a biodiversidade que o bioma possui (importante para a regulação ambiental), entretanto atualmente este bioma corresponde apenas a 12.4% de sua extensão original, pois a mesma sofreu o processo de fragmentação pela ação humana (INPA, 2023).

O bioma Mata Atlântica é formado por um mosaico de ecossistemas, com estruturas e composições florísticas bastante diferenciadas, acompanhando a diversidade dos solos, relevos e características climáticas. A Mata Atlântica faz parte do bioma das florestas pluviais equatoriais, se estendendo ao longo da costa litorânea, banhada pelo oceano atlântico e grande parte pela bacia do rio Paraná, com temperatura média de 25°C e precipitação ao longo. Como a formação florestal é marcada por sua fisionomia alta e densa, com estratificação vertical, geralmente a vegetação dos estratos inferiores vive em um ambiente úmido e menos iluminado (Probio, 2006).

Estudos na Mata Atlântica envolvendo mamíferos revelaram que esses animais têm seus padrões de diversidade, abundância e riqueza influenciados negativamente pelos efeitos da fragmentação (Vieira *et al.* 2003; Pardini 2004; Pardini *et al.* 2005, 2009). Particularmente para os quirópteros, uma variação na

disponibilidade dos recursos em ambientes fragmentados pode alterar a estrutura da comunidade desses animais (Schulze *et al.* 2000; Faria 2006). A ordem Quiróptera é segunda maior em riqueza de mamíferos no Brasil representada por 181 espécies, (Garbino *et al.*, 2022), distribuídas em nove famílias (Reis *et al.*, 2011), sendo a Mata Atlântica o bioma com melhor estado de conhecimento para os representantes desse grupo (Bernard *et al.*, 2011).

3.2 CITOGENÉTICA DE QUIRÓPTEROS COM ÊNFASE EM MOLOSSÍDEOS

A citogenética compreende estudos relacionados aos cromossomos isolados ou em conjunto, sua morfologia, função, replicação, comportamento nas divisões celulares, sua variabilidade e evolução, e sua forma distendida ou condensada (Guerra, 2004). Por meio dos estudos citogenéticos clássicos é possível localizar as regiões organizadoras dos nucléolos com a impregnação com nitrato de prata (AgNO_3) (Howell; Black, 1980), demonstrar variações na quantidade e constituição da heterocromatina constitutiva por meio do bandamento C (Sumner, 1972), bem como identificar eventuais rearranjos cromossômicos, tais como inversões pericêntricas, fusões/fissões cêntricas por meio do bandamento G e R (Sumner, 1990). Marcadores cromossômicos têm contribuído como ferramentas para elucidar problemas taxonômicos, delinear relações filogenéticas entre grupos e entender mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação cariotípica de morcegos (Araujo, 2016; Schmidt, 2017). Adicionalmente o estudo do cariótipo permite focar problemas relativos à determinação cromossômica do sexo, mecanismos de origem dos rearranjos cromossômicos, papel da heterocromatina constitutiva na evolução, significado adaptativo de polimorfismos cromossômicos, papel da variabilidade cromossômica na especiação e, até mesmo, a estrutura e dinâmica das populações com variabilidade cromossômica (Yonenaga 1977; Reig 1984).

Entre 1968 e 1969 foram publicados os primeiros trabalhos científicos brasileiros, mostrando grandes resultados em relação à taxonomia, morfologia e variação cariotípica dos morcegos (Varella-Garcia; Taddei, 1989). O desenvolvimento das técnicas citológicas tornou possível a determinação da morfologia cromossômica, número diploide, número fundamental e pareamento de cromossomos homólogos (Calixto, 2008; Fialho, 2009). Estas técnicas permitem

identificar homeologias entre cromossomos inteiros ou de apenas segmentos, bem como demonstrar rearranjos cromossômicos surgidos ao longo do processo evolutivo (Calixto, 2008).

A família Molossidae tem sido caracterizada por possuir cariótipos com número diploide variando de $2n=34$ a 48 cromossomos e número fundamental (NF) variando de 54 a 64 (Warner *et al.*, 1974; Morielle-Versute *et al.*, 1996; Leite-Silva *et al.*, 2003). Os cariótipos dos representantes dos Molossidae foram basicamente estudados após coloração convencional (Baker *et al.* 1982; Arroyo Nombela *et al.* 1986; Morielle *et al.* 1988; Morielle-Versute *et al.* 1996). As regiões organizadoras do nucléolo (RONs) após a coloração com nitrato de prata têm sido consideradas importantes marcadores para estudos de evolução cromossômica na ordem Chiroptera (Volleth, 1987; Morielle-Versute; Varella-Garcia 1988; Souza; Araújo 1990; Morielle-Versute *et al.* 1996).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 TIPO DE PESQUISA

O estudo experimental adota uma abordagem metodológica rigorosa, iniciando com a formulação precisa do problema e das hipóteses, que delimitam as variáveis exatas e controladas para o objeto estudado (Trivinos, 1987).

Essencialmente, a pesquisa consiste em identificar um objeto de estudo, selecionar as variáveis que podem influenciá-lo e estabelecer métodos de controle e observação dos efeitos que essas variáveis exercem sobre o objeto, no qual se constitui com as seguintes propriedades: manipulação, controle e distribuição aleatória (Gil, 2002).

4.2 ÁREA DE ABRANGÊNCIA

O presente estudo desenvolveu-se com um indivíduo macho da espécie *Molossus molossus* (Figura 1), o espécime foi capturado no município de União da Vitória, localizado na região sul do estado do Paraná, em uma área alterada para uso como pastagem e piscicultura: o Centro de Pesquisas e Extensão em Aquicultura Ildo Zago (CEPEA), o qual está vinculado a Universidade Estadual do Paraná - UNESPAR (26°13'12.8'S e 51°07'50.9"W).

A pesquisa é amparada pela autorização permanente de coleta ICMBio Nº 87088-1. Esse trabalho é autorizado pelo Comitê de Ética de Uso de Animal (Processo CEUA 2023/008) da Universidade Estadual do Paraná. O indivíduo utilizado para a realização deste estudo cromossômico está depositado na coleção científica do laboratório da Universidade Estadual do Paraná, Campus de União da Vitória.

FIGURA 1 – Espécie *Molossus molossus* (Pallas, 1766), popularmente conhecida como morcego da cauda-grossa. Barra = 1 cm.



Fonte: a autora

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 Obtenção de metáfases a partir da medula óssea (Ford e Hamerton, 1956):

Foi injetado fermento glicosado (na mesma proporção de duas vezes a de açúcar) na região intraperitoneal (0,2mL a cada 25g de peso corporal); após 24 h, foi injetado intraperitonealmente 0,2mL de solução de colchicina 0,5%, para cada 25g de peso corporal, e ficou agindo por 40 minutos; o animal foi anestesiado com isoflurano e após foi dissecado removendo os úmeros e a medula óssea foi exposta, com seringa depositando em 3 a 4 ml de solução de cloreto de potássio; o material foi centrifugado em cerca de 1000 rpm por 5 minutos e retirado o sobrenadante; após foram introduzidos cerca de 4 ml de solução hipotônica KCL 0,075 M; O material foi incubado a 37°C por 30 minutos; em seguida foi fixado em metanol e ácido acético (3:1). Preferencialmente deixou-se na 1ª fixação por 2 horas ou overnight; O passo 7 foi repetido por mais 2 vezes. Isso pôde então ser guardado no freezer, acondicionado em microtubos, ou trabalhado conforme os seguintes passos: Foram pingadas 3-4 gotas da suspensão obtida sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa e conservadas em álcool gelado, deixando secar ao ar. Foi corada com solução de Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato (pH=6,8), durante

7-8 minutos. A lâmina foi lavada com água destilada ou água corrente e deixada secar ao ar.

4.3.2 Detecção da Heterocromatina Constitutiva (Sumner 1972, com modificações):

As lâminas contendo o material celular foram inicialmente tratadas em ácido clorídrico (HCl) 0,2M à 37°C, durante 10 minutos, em seguida foi realizado a preparação em Hidróxido de Bário Ba(OH)₂ a 5%, que foi recém preparada e filtrada, à 25 °C, durante 2 a 3 minutos; após as lâminas foram imersas em solução de ácido clorídrico 0,2M seguido por uma lavagem com água destilada; após foram submergidas em solução salina 2xSSC, a 50°C, durante 30 minutos, após esse tempo as lâminas foram novamente lavadas com água destilada..

4.3.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (Howell e Black 1980 com modificações):

Colocar, sobre as preparações cromossômicas, 3 gotas de solução de gelatina (1%) e 6 gotas de solução aquosa de nitrato de prata (50%). Cobrir a lâmina com uma lamínula (60 x 20 mm) e manter em estufa a 60°C, o tempo necessário para que os cromossomos e núcleos assumam uma coloração dourada e os nucléolos e as RONS uma coloração quase preta (entre 3 a 5 minutos). Remover a lamínula com água destilada corando em seguida com solução de Giemsa a 1%, durante 1 minuto.

4.3.4. Dupla coloração Cromomicina A3/DAPI (Schweizer, 1980 com modificações)

Colocar 50 µL de solução de Cromomicina A3 (0,5 mg/mL) sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por 3 horas em câmara escura gelada. Em seguida escorrer a lamínula e lavar a lâmina em tampão McIlvaine, lavar com água, secando levemente. Adicionar 50 µL de solução DAPI/Antifading 2 µg/mL sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por 1 dia em câmara escura gelada antes de analisar.

4.3.5 Análises cromossômicas:

As preparações cromossômicas foram coradas com coloração convencional (giemsa a 5%) e analisadas em microscópio óptico de campo claro. Análises mais detalhadas, de metáfases consideradas promissoras, foram efetuadas em microscópio de campo claro e epifluorescência Carl Zeiss AxioLab A1, em objetiva de imersão. As imagens presentes neste estudo, foram capturadas através do software ZEN, por meio da câmera CCD AxioCam ICc 1 de 1,4 megapixel acoplada ao microscópio de campo claro e epifluorescência.

A organização e montagem cariotípica, foram realizados por meio do software Photoshop® 7.0. A classificação cromossômica utilizada é a proposta por Green e Sessions (1991) baseada na relação de braços: (RB): braço maior/braço menor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 NÚMERO DIPLOIDE E MORFOLOGIA CROMOSSÔMICA

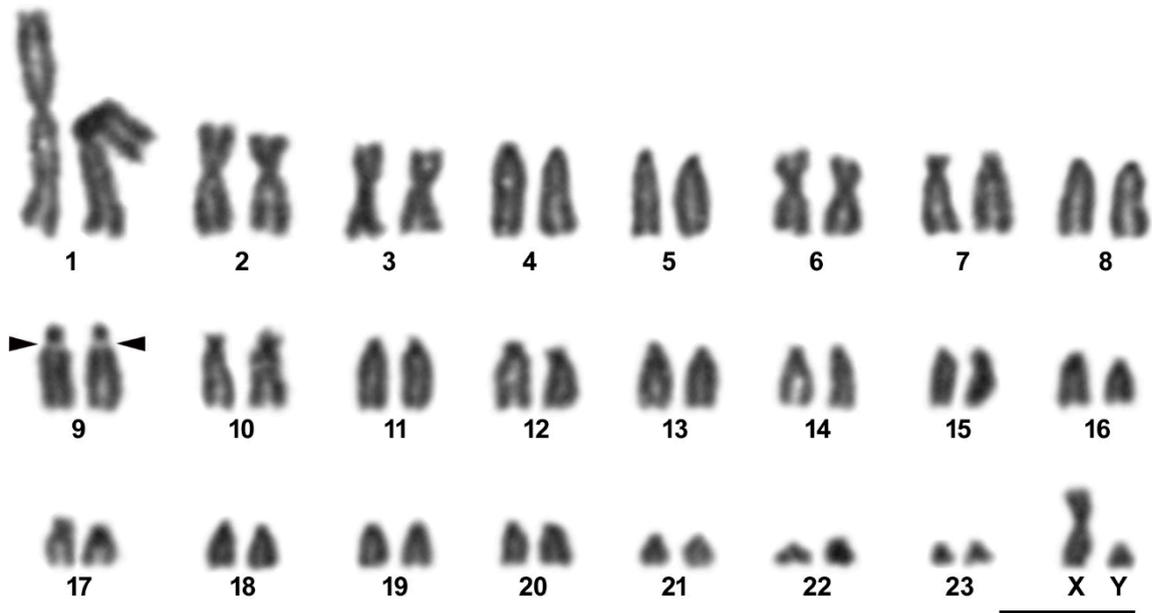
O indivíduo macho da espécie *M. molossus* analisado neste trabalho apresentou conjunto cromossômico com número diploide igual a 48 cromossomos ($2n=48$) e número fundamental igual a 61 (NF=61) devido à presença do par de cromossomos sexuais do tipo XY. O complemento autossômico é constituído por um par de grandes cromossomos metacêntricos (1º par), três pares de metacêntricos médios, dois pares de submetacêntricos e 17 pares de acrocêntricos. O cromossomo X é um metacêntrico de tamanho médio e o Y é um acrocêntrico pequeno, (figura 2). Nosso estudo destacou uma variação distinta no número fundamental de cromossomos dessa população paranaense, com um NF = 61, enquanto que em populações de outras localidades, o número fundamental encontrado consistentemente foi NF=64 para fêmeas e NF=63 para machos, evidenciando assim a relevância das diferenças cromossômicas intraespecíficas. Esta variação na estrutura cariotípica de *M. molossus* do centro-sul paranaense se mostra reflexo de rearranjos cromossômicos que alteram a morfologia de alguns pares sem modificar o $2n$, como os reposicionamentos centroméricos pela atividade de elementos de transposição (Rocchi *et al.*, 2012).

A família Molossidae apresenta uma distribuição limitada às regiões neotropicais, é cosmopolita e também apresenta problemática taxonômica (Gardner, 2007). Na maioria das espécies de Molossidae é encontrado um número diploide de 48 cromossomos. Uma variação no $2n$, de 34 a 52 foi encontrado em apenas 9 espécies (Sreepada *et al.* 2008). A espécie *M. molossus* também possui o usual número diploide de 48 cromossomos e número fundamental (NF) igual a 64, com sistema sexual simples do tipo XX nas fêmeas e XY nos machos (Silva *et al.*, 2003). Em molossídeos o NF por vezes é difícil de determinar, pois vários pares podem ter braços curtos e diminutos e, portanto, uma morfologia subtelocêntrica. No entanto, a detecção desses braços curtos depende da qualidade da preparação cromossômica e do nível de condensação (Leite-Silva, *et al.*, 2003).

O indivíduo macho da espécie *M. molossus* analisado neste trabalho apresentou conjunto cromossômico com número diploide igual a 48 cromossomos

($2n=48$) e número fundamental igual a 61 (NF=61) devido à presença do par de cromossomos sexuais do tipo XY. O complemento autossômico é constituído por um par de grandes cromossomos metacêntricos (1º par), três pares de metacêntricos médios, dois pares de submetacêntricos e 17 pares de acrocêntricos. O cromossomo X é um metacêntrico de tamanho médio e o Y é um acrocêntrico pequeno (figura 2). Nosso estudo destacou uma variação distinta no número fundamental de cromossomos dessa população paranaense, com um NF=61, enquanto que em populações de outras localidades, o número fundamental encontrado consistentemente foi NF=64 para fêmeas e NF=63 para machos, evidenciando assim a relevância das diferenças cromossômicas intraespecíficas. Esta variação na estrutura cariotípica de *M. molossus* do centro-sul paranaense se mostra reflexo de rearranjos cromossômicos que alteram a morfologia de alguns pares sem modificar o $2n$, como os reposicionamentos centroméricos pela a atividade de elementos de transposição (Rocchi *et. al.*, 2012).

FIGURA 2 – Cariótipo da espécie *Molossus molossus* submetidos à coloração convencional com Giemsa. Barra = 10 µm.



Fonte: a autora

5.2 HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA

O bandeamento C em *M. molossus* evidenciou blocos de heterocromatina na região pericentromérica de todos os cromossomos, incluindo o cromossomo Y, o qual se mostrou pouco heterocromático (Figura 3). Este padrão é recorrente, sendo já descrito para várias espécies da família Molossidae (Morielle-Versute *et al.*, 1996; Leite-Silva *et al.*, 2003). Entretanto, em relação ao cromossomo Y, o padrão observado no indivíduo dessa população paranaense, revelou um nível de heterocromatinização aparentemente menor em comparação com o de outras populações já estudadas (Melo; Neide, 1996; Leite-Silva *et al.*, 2003). Uma peculiaridade do cromossomo Y em morcegos, é o fato dele ser parcial ou totalmente heterocromático (Souza; Araújo 1990; Morielle-Versute *et al.*, 1996; Santos; Souza 1998a,b). Estudos adicionais são necessários para melhor entender sobre as sequências repetitivas presentes no cromossomo Y de *M. molossus*: (1) uma classe de DNA repetitivo que não responde ao bandamento C; (2) um estágio inicial de heterocromatinização; (3) Envolvimento de elementos de transposição silenciando genes antes ativos neste cromossomo.

5.3 DUPLA COLORAÇÃO COM FLUOROCROMOS CMA₃/DAPI

A dupla coloração com fluorocromos CMA₃/DAPI mostrou uma compartimentalização no cariótipo de regiões ricas em bases GC e AT, tanto em regiões eucromáticas quanto heterocromáticas. Blocos GC+ se apresentaram em regiões teloméricas da maioria dos cromossomos, coincidente com as heterocromatinas centromérica e com as Regiões Organizadoras de Nucléolo (rDNA 45S) (Figura 4).

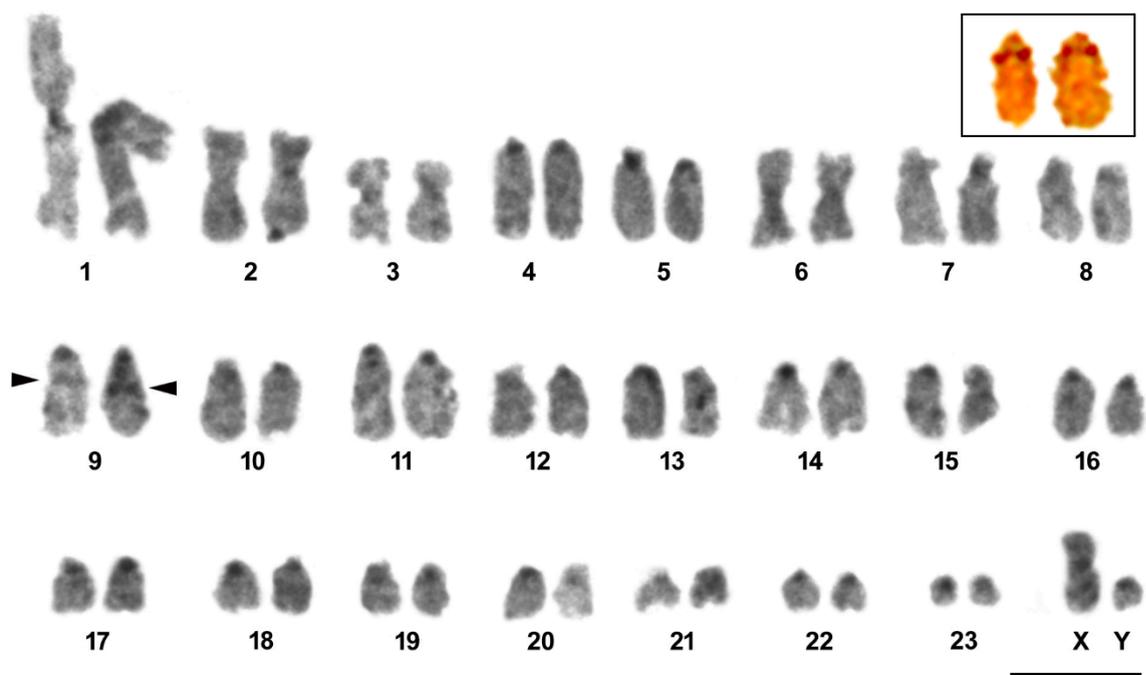
Os genomas nucleares principalmente de vertebrados superiores são mosaicos isocóricos (sequências >100 kb homogêneas na sua composição de bases), tais como as cinco famílias de isocores em mamíferos, L1, L2, H1, H2 e H3, em contraste com os de peixes e anfíbios que se apresentam mais homogêneos (Medrano *et al.*, 1988). Análises fluorescentes com a dupla coloração CMA₃/DAPI tornam-se mais resolutivas quanto a composição de domínios específicos, pois a intensidade do sinal fluorescente é otimizada devido a competição entre os fluorocromos por regiões adjacentes.

Não somente dados do presente estudo mas outros trabalhos indicam que grupos de cromossomos em uma dada espécie, geralmente tendem a acumular heterocromatinas com similar tamanho, composição e localização (John *et al.*, 1985). Isto suporta o fato de que mudanças que afetam o conteúdo heterocromático de um genoma não somente atuam de forma equilocal, mas também são claramente não aleatórias. Conforme o modelo de Rabl (Schweizer *et al.*, 1987) DNAs repetitivos dentro de uma dada banda C podem ser transferidos para outros sítios equilocais como consequência de uma específica disposição espacial de telômeros, centrômeros e braços cromossômicos no núcleo interfásico. Neste contexto, a partir de um segmento primário rico em GC, a dispersão destas sequências nessa população de *M. molossus* foi realizada por mecanismos de amplificação em concerto, incluindo conversão gênica, recombinação desigual e atividade de transposons (Dover, 2002).

Na população de *M. molossus* coletada em localidades do estado de Pernambuco, o padrão observado com fluorocromo DAPI (preferencial AT) revelou uma coloração uniforme em todos os cromossomos do cariótipo (Leite-Silva, 2003). Notavelmente, a heterocromatina não demonstrou variação na riqueza de GC e AT,

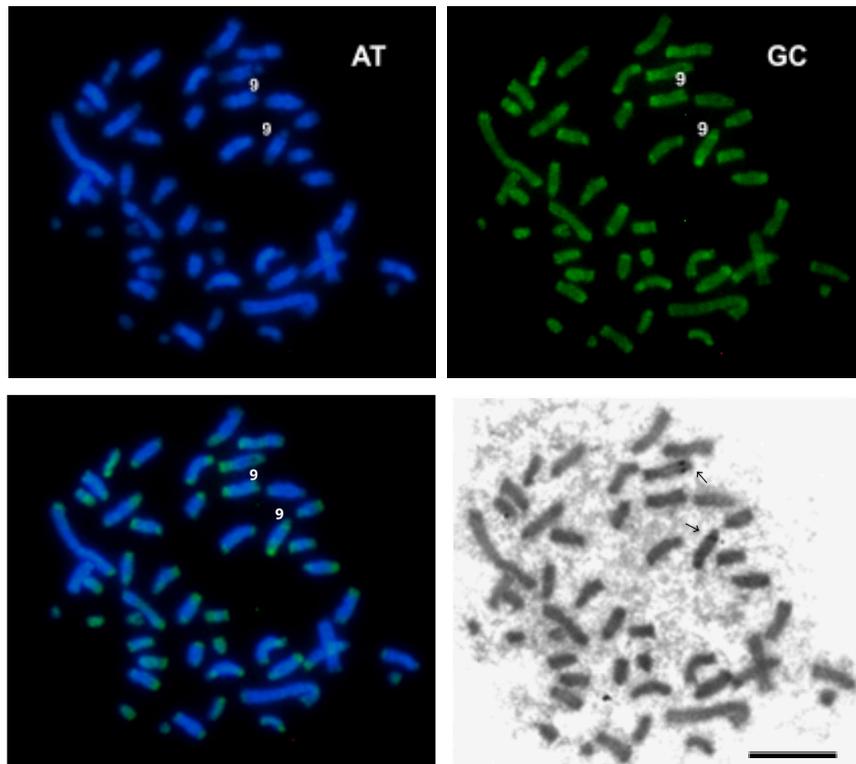
ao contrário de outras espécies de morcegos descritas por Bickham (1987), Ruedas *et al.*, (1990) e Santos e Souza (1998a). A variação na composição das heterocromatinas no cariótipo de diferentes populações de *M. molossus*, reflete um cenário em que, sob diferentes condições ambientais e na ausência de fluxo gênico, diferenças cariotípicas se fixaram. Portanto, colorações com fluorocromos base-preferenciais são ferramentas promissoras no estudo da composição de domínios cromossômicos específicos. Variações na microestrutura cariotípica de uma espécie/população podem ser melhor acessadas, além de utilizadas como marcadores específicos (Noletto, 2009).

FIGURA 3 – Cariótipo da espécie *Molossus molossus* submetidos à técnica de bandamento C, demonstrando o padrão de heterocromatina constitutiva. Par 9 portador do rDNA 45S corado com prata (box). Barra = 10 μ m.



Fonte: a autora

FIGURA 4 – Metáfases de *Molossus molossus* submetidos à dupla coloração com fluorocromos. Indicado o padrão de coloração do par portador do rDNA 45S (par 9). Barra = 10 µm.



Fonte: a autora

5.4 REGIÕES ORGANIZADORAS DO NUCLÉOLO (RONs)

A coloração com nitrato de prata tem sido considerada um marcador importante para o estudo da evolução, permitindo o mapeamento do rDNA 45S, conhecido como Regiões Organizadoras do Nucléolo (RONs). A variação no número e localização das RONs desempenhou um papel na evolução cromossômica dos molossídeos (Leite-Silva *et al.*, 2003). Embora a evolução cromossômica em Molossidae seja geralmente caracterizada por conservadorismo intra e intergenérico, variações têm sido detectadas nos gêneros *Molossops* e *Eumops* (Warner *et al.*, 1974; Leite-Silva *et al.*, 2003). No presente estudo foi possível evidenciar esta família multigênica em região proximal do par acrocêntrico 9 (Figura 3 - box), cujo par também apresentou uma banda heterocromática adjacente ao locus do rDNA 45S (Figura 3 - setas). Este par portador (grande acrocêntrico) é observado em outras populações de *M. molossus*, o que indica ser um bom marcador cromossômico para a espécie, embora outros autores o localizaram em diferentes pares, possivelmente eles representam pares homeólogos (Morielle-Versute *et*

al.,1996; Leite-Silva *et al.*, 2003;). A dinâmica cromossômica da localização das RONS pode ser o resultado de rearranjos intercromossômicos, como translocações e/ou eventos de transposições mediados por elementos de transposição (Ferro *et al.*, 2018; Deon *et al.*, 2022).

Adicionalmente as RONS se mostraram GC+ conforme a dupla coloração CMA₃-DAPI. A correlação de RONS com sequências ricas em GC é comumente relatada em morcegos (Santos e Souza, 1998b) e, se dá em virtude dos genes ribossômicos estarem continuamente sendo expressos (genes *housekeeping*) (Pendás *et al.*, 1993).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de algumas espécies de molossídeos serem mais comuns, o grupo taxonômico tem pouca representação e dados limitados sobre suas relações filogenéticas. Portanto, análises cromossômicas podem gerar informações para melhor esclarecer relações e fornecer insights sobre a evolução desse grupo de morcegos. À medida que conduzimos o primeiro estudo cariotípico em uma população paranaense de *M. molossus*, observamos o surgimento de novos padrões cariotípicos, os quais oferecem novas perspectivas sobre a relação dessas variantes com o ambiente. Esta relação entre a dinâmica evolutiva da microestrutura cromossômica e a localização geográfica pode ser determinada por características ambientais únicas que favoreceram uma organização cariotípica ideal.

Os resultados do presente estudo, baseados nos marcadores empregados, já indicaram certa diversidade na estrutura cromossômica e variabilidade genômica de *Molossus molossus*. Nesse sentido, é crucial a necessidade de abordagens mais detalhadas e direcionadas. Estudos adicionais, como o mapeamento de certas famílias de DNA repetitivo no cariótipo das espécies, principalmente aquelas localizadas no cromossomo Y, são fundamentais para desvendar os complexos processos que vêm moldando os cariótipos dos molossídeos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, E. F., CASALI, D.M.; GARBINO, G. S. T.; LIBARDI, G. S.; LORETTO, D.; LOSS, A. C.; MARMONTEL, M.; NASCIMENTO, M. C.; OLIVEIRA, M.L.; PAVAN, S. E.; TIRELLI, F.P. **Lista de Mamíferos do Brasil**, versão 2021-1 (abril). Comitê de Taxonomia da Sociedade Brasileira de Mastozoologia (CT-SBMz), 2021.
- AMMERMAN, L. K., LEE, D. N. & TIPPS, T. M. First molecular phylogenetic insights into the evolution of free-tailed bats in the subfamily Molossinae (Molossidae, Chiroptera). **Journal of Mammalogy**, 93 (1):12–28. 2012.
- ARAÚJO, S. E. M. **Citogenômica Comparativa de Morcegos da Família Phyllostomidae na Amazônia**. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, 2016.
- ARROYO-NOMBELA, J. J.; RODRÍGUEZ, C.; IBÁÑEZ, C. Analisis citogenetico-cariotipo bandeado de *Tadarida teniotis* (Rafinesque, 1814) (Molossidae-Chiroptera). **Genet. Iber**, v. 38, p. 93-103, 1986.
- APREMAVI, Associação de Preservação do Meio Ambiente e da Vida. **Mata Atlântica, Biodiversidade**, 2023.
- BAKER, R. J. **O papel dos cariótipos nos estudos filogenéticos de morcegos**. Sobre morcegos: um simpósio de biologia de quirópteros. Southern Methodist University Press, Dallas, Texas, p. 303-312, 1970.
- BAKER, R. J.; M. W. HAIDUK; L. W. ROBBINS; A. CADENA & B. F. KOOP, Chromosomal studies of South American bats and their systematic implications. In: Mares. M. A. e Genoways, H. H. (Eds.). **Mammalian Biology in South America**, Vol. 4. Special Publication Series, Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh, Penn., pp. 303-327. 1982.
- BEÇAK, M. L.; BATISTIC, R. F.; VIZOTTO, L. D.; BEÇAK, W. Mecanismo de determinação do sexo XY_1Y_2 em *Artibeus litturatus litturatus* (Chiroptera - Phyllostomatidae). **Ciência e Cultura**, v. 20, p. 173, 1968.
- BEÇAK, M. L.; BATISTIC, R. F.; VIZOTTO, L. D.; BEÇAK, W. Sex determining mechanism XY_1Y_2 in *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae). **Experientia**, v. 25, p. 81-83, 1969.
- BERNARD, E.; AGUIAR, L. M. S.; MACHADO, R. B. Discovering the Brazilian bat fauna: a task for two centuries? **Mammal Review**, v. 41, n. 1, p. 23-39, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2907.2010.00164.x>.
- BICKHAM, J. W.; Chromosomal variation among seven species of lasiurine bats (Chiroptera: Vespertilionidae). – **J. Mammal.** 68: 837–884. 1987.
- BOVEY, R. Les chromosomes des chiropteres et des insectivores. **Revue Suisse de Zoologie**, v. 56, Genève, p. 375-460. 1949.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente - MMA. **Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade brasileira.** Brasília: MMA, SBF, 2002.

CALIXTO, M. S. **Análise citogenética comparativa entre *Glossophaga soricina*, *Plathyrrhinus lineatus* e *Sturnira lilium* (Phyllostomidae, Chiroptera).** 102 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Pernambuco, 2008.

CAMPANILI, M.; SCHÄFFER, W. B. **Mata Atlântica: manual de adequação ambiental.** Brasília: MMA/SBF, 96 p. (Biodiversidade, 35), 2010.

CARDOSO, J. T. A Mata Atlântica e sua Conservação. Florianópolis, **Revista Encontros Teológicos**, v. 31, n. 3, 2016. 2016.

CARVALHO, F.; BOLLA, D. A. S.; MIRANDA, J. M. D.; ZOCHE, J. J. Deslocamentos de morcegos frugívoros (Chiroptera: Phyllostomidae), entre diferentes fitosifionomias da Mata Atlântica, no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n. 2, p. 78-82, 2017.

DEON, G. A.; GLUGOSKI, L.; HATANAKA, T.; SASSI, F. D. M. C.; NOGAROTO, V.; BERTOLLO, L. A.; LIEHR, T.; AL-RIKABI, A.; MOREIRA-FILHO, O.; CIOFFI, M. B.; VICARI, M. R. Evolutionary breakpoint regions and chromosomal remodeling in *Harttia* (Siluriformes: Loricariidae). **Genet Mol Biol.** 45:e20210170. 2022.

DOVER, G. Molecular drive. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 11, p. 587–589, 1 nov. 2002.

ELER, E. S. **Estudos Citogenéticos Evolutivos em Roedores da Família Echimyidae (Mammalia: Rodentia), com ênfase no Gênero *Proechimys*.** [S.l.: s.n.], 2017.

FABIAN, M. E.; GREGORIN, R. Família Molossidae, p. 149-165. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Eds.). **Morcegos do Brasil.** Londrina: N. R. Reis, p. 253. 2007.

FARIA, D. **Phyllostomid bats of a fragmented landscape in the North-Eastern Atlantic Forest, Brazil.** Journal of Tropical Ecology, v. 22, n. 5, p. 531-542, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0266467406003385>.

FENTON, M. B.; SIMMONS, N. B. **Bats - A World of Science and Mystery.** University of Chicago Press, Chicago, London, p. 18, 2014.

FERRO, J. M.; CARDOZO D. E.; SUARÉZ, P.; BOERIS, J.; BLASCO-ZUÑIGA, A.; BARBERO, G.; GOMES, A.; GAZONI, T.; COSTA, W.; NAGAMACHI, C. Y.; RIVERA, M.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; WILEY, J. E.; PIECZARKA, J. C.; HADDAD, C. F. B.; FAIVOVICH, J.; BALDO, D. **Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae).** Plos One 13:1-29. 2018.

- FIALHO, F. S. F. **Análise morfométrica, morfológica e citogenética de morcegos dos gêneros *Artibeus* LEACH, 1821 (Chiroptera, Phyllostomidae)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2009.
- FLORES, J. W. T.; CHUMACERO, L. M. G. Perspectivas sobre el origen y la filogenia de los murciélagos. **Contactos**, v. 77, p. 5–9. 2010
- FORD, C. E.; HAMERTON, J. L. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for Mammalian chromosomes. **Stain technology**, v. 31, p. 247-251, 1956.
- GARBINO, G. S. T.; GREGORIN, R.; LIMA, I. P.; LOUREIRO, L.; MORAS L.; MORATELLI, R.; NOGUEIRA, M. R.; PAVAN, A. C.; TAVARES, V. C.; NASCIMENTO, M. C.; NOVAES, R. L. M.; PERACCHI, A. L. **Updated checklist of Brazilian bats: versão 2020**. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (Sbeq), 2022.
- Gardner, A. L.; Patton, J. L. (Eds.). **Mammals of South America**, volume 2: rodents (Vol. 2). University of Chicago Press. 2007.
- GIL, A. C. Como classificar as pesquisas. **Como elaborar projetos de pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 44-45, 2002.
- GREGORIN, R. **Filogenia de Molossidae Gerais, 1855 (Mammalia: Chiroptera)**. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2000.
- GREEN, D. M.; SESSIONS, S. K. **Nomenclature for chromosomes**. In: **Green DM, Sessions SK (Eds)**. Amphibian Cytogenetics and Evolution. Academic Press, San Diego, p. 431-432. 1991.
- GUERRA, M. Fish – **Conceitos e Aplicações na Citogenética**. SBG, Ribeirão Preto, 2004.
- HILL, J. E.; SMITH, J. D. **Bats: a natural history**. British Museum (Natural History), London, 243p. 1988.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, n. 8, p. 1014-1015, 1980.
- HUTCHEON, J. M.; KIRSCH, J. A. W. A moveable face: Deconstructing the 118 Microchiroptera and a new classification of extant bats. **Acta Chiropterologica**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2006.
- JOHN, B.; KING, M.; SCHWEIZER, D.; MENDELAK, M. Equilocality of heterochromatin distribution and heterochromatin heterogeneity in acridid grasshoppers. **Chromosoma**, 91, 185-200, 1985.
- KUNZ, T. H.; TORREZ, E. B.; BAUER, D.; LOBOVA, T.; FLEMING, T. H. Ecosystem

services provided by bats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 1223, n. 2011.

LEITE-SILVA, C.; SANTOS, N.; FAGUNDES, V.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; SOUZA, M. J. Karyotypic characterization of the bat species *Molossus ater*, *M. molossus*, and *Molossops planirostris* (Chiroptera, Molossidae) using FISH and banding techniques. *Hereditas*, v. 138, p. 94-100, 2003.

LINDSEY, L. L.; AMMERMAN, L. K. Patterns of genetic diversification in a widely distributed species of bat, *Molossus molossus*. *Biodiversitylibrary.org*, v. no.339, 2016.

LÓPEZ-GONZÁLEZ C. & PRESLEY S. J. Taxonomic status of *Molossus bondae* J. A. Allen, 1904 (Chiroptera: Molossidae), with description of a new subspecies. *Journal of Mammalogy* 82(3): 760–774. 2001.

MACDONALD, L. D. Bats. in: the **Encyclopedia of Mamals**. Andromeda Oxford Limited, Oxfordshire, United Kingdom, 2001.

MAMMAL DIVERSITY. Disponível em: <https://www.mammaldiversity.org/>. Acessado em 26 de setembro de 2023.

MEDRANO, L.; BERNARDI, G.; COUTURIER, J.; DUTRILLAUX, B.; BERNARDI, G. Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. *Chromosoma*, 96, 178-183, 1988.

MELO, G. C. V. de; NEIDE, S. **Mapeamento Cromossômico do elemento repetitivo MAZEL/L1-LIKE em espécies de morcegos da família Molossidae**. XXIII CONIC VII CONITI IV ENIC, 2015.

MOREIRA, P. R. L. **Análise de Marcadores Moleculares RAPD em espécies de Morcegos dos Gêneros *Eumops Molossus*, *Eptesicus*, *Myotis* e *Aetibeus* (Chiroptera, Mammalia)**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual, José do Rio Preto -SP, 2004.

MORIELLE, E.; GOLONI-BERTOLLO, E. M.; VARELLA-GARCIA, M.; TADDEI, V. A. A chromosome banding study of *Eumops glaucinus* (Chiroptera; Molossidae). *Revista Brasileira de Genética*, v. 11, p. 791-795, 1988.

MORIELLE-VERSUTE, E.; VARELLA-GARCIA, M. Variability of nucleolus organizer regions in phyllostomid bats. – *Rev. Bras. Genet.* 11: 853–871. 1988.

MORIELLE-VERSUTE, E.; VARELLA-GARCIA, M.; TADDEI, V. A. Karyotypic patterns of seven species of molossid bats (Molossidae, Chiroptera). *Cytogenetics and Cell Genetics*, v. 72, p. 26-33, 1996.

NOLETO, R. B. Cariótipo e mapeamento cromossômico de seqüências repetitivas em peixes marinhos com ênfase em Tetraodontiformes do litoral paranaense. *Ufpr.br*, 2022.

PARDINI, R. Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest

landscape. **Biodiversity and Conservation**. v. 13, p. 2567-2586, DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/B:BIOC.0000048452.18878.2d>, 2004.

PARDINI, R.; SOUZA, S. M.; BRAGA-NETO, R.; METZGER, J. P. The role of forest structure, fragment size, and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic Forest landscape. **Biological Conservation**. v. 124, n. 2, p. 253-266, 2005.

PARDINI, R.; FARIA, D.; ACCACIO, G. M.; LAPS, R. R.; MARIANO-NETO, E.; PACIENCIA, M. L. B.; DIXO, M.; BAUMGARTEN, J. The challenge of maintaining Atlantic Forest biodiversity: a multi-taxa conservation assessment of specialist and generalist species in an agro-forestry mosaic in Southern Bahia. **Biological Conservation**. v. 142, n. 6, p. 1178-1190, 2009.

PENDÁS A. M.; MÓRAN, P. GARCÍA-VAZQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogenet Cell Genet** 63:128–130. 1993.

PERACCHI, A. L.; LIMA, I. P.; REIS, N. R.; NOGUEIRA, M. R.; FILHO, H. O. Ordem Chiroptera. In: N. R. Reis, A. L. PERACCHI, W. A. PEDRO; I. P. LIMA (eds.). **Mamíferos do Brasil**. Governo do Paraná/SEMA/ SBZ, Curitiba, p. 155–234, 2006.

PROBIO, Educação Ambiental: (coordenador) Carlos Hiroo Saito. Brasília: Departamento de Ecologia da Universidade de Brasília/MMA, 2006, 136p. Disponível em: https://antigo.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/livroprofessuer.pdf.

REIG, O. A. Significado de los métodos citogenéticos para la distinción y la interpretación de las especies, con especial referencia a los mamíferos. **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales" Bernardino Rivadavia" e Instituto Nacional de Investigacion de las Ciencias Naturales**, v. 13, p. 19-44, 1984.

REIS, N. R.; PERRACHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Eds.). **Morcegos do Brasil**. Londrina: Nélio R. dos Reis, p. 145-147. 2007.

REIS, N. R.; SHIBATTA, O. A.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Sobre os mamíferos do Brasil**. In: **Mamíferos do Brasil** (N. R. Reis, A. L. Peracchi, W. A. Pedro & I. P. Lima, eds.). 2. ed. N. R. Reis, Londrina, p. 23-29. 2011.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; BATISTA, C. B.; LIMA, I. P.; PEREIRA, A. D. **História Natural dos Morcegos Brasileiros: Chave de Identificação de Espécies**. 1.ed. Rio de Janeiro: Technical Books, p. 416. 2017.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141-1153, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.021>.

ROCCHI, M.; ARCHIDIACONO, N.; SCHEMP, W.; CAPOZZI, O.; STANYON, R. Centromere repositioning in mammals. **Heredity**, v. 108, p. 59–67, 2012.

ROSA, A. J. M.; PAIVA, S. R. **Marcadores Moleculares e suas aplicações em**

estudos populacionais de Espécies de interesse Zootécnico. Embrapa Cerrado, Planaltina, D. F, 2009.

RUEDAS, L. A.; LEE Jr, T. E.; BICKHAM, W.; SCHLITTER, D. A. Chromosomes of five species of vespertilionid bats from Africa. – **J. Mammal.** 71: 94–100. 1990.

SANTOS, N.; SOUZA, M. J. Characterization of the constitutive heterochromatin of *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae, Chiroptera) using the base-specific fluorochromes CMA3 (GC) and DAPI (AT). – **Caryologia** 51: 51–60. 1998a.

SANTOS, N.; SOUZA, M. J. Use of fluorochromes chromomycin A3 and DAPI to study constitutive heterochromatin and NORs in four species of bats (Phyllostomidae). – **Caryologia** 51: 265–278. 1998b.

SARTORE, E. R.; TAVARES, V. C.; MORAS, L. M. 2017. Subfamília Molossinae. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; BATISTA, C. B.; LIMA, I. P.; PEREIRA, A. D. História Natural dos Morcegos Brasileiros, chave de identificação de espécies. Rio de Janeiro, **Technical books editora**, ed.1, p. 276-318, 2017.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetics** 27, 190–193. 1980.

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J.; HAMILTON, B. Heterochromatin and the phenomenon of chromosome banding. **Results. Probl. Cell. Differ.**, 14, 235-254, 1987.

SCHULZE, M. D.; SEAVY, N. E.; WHITACRE, D. F. A comparison of the Phyllostomid bat assemblages in undisturbed Neotropical Forest and in forest fragments of a Slash-and-Burn farming mosaic in Petén, Guatemala. **Biotropica**, v. 32, n. 1, p. 174-184, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7429.2000.tb00459.x>.

SILVA, C. L.; SANTOS, N.; FAGUNDES, V.; YASSUDA, Y. Y.; SOUZA, M. S. de. Karyotypic characterization of the bat species *Molossus ater*, *M. molossus*, and *Molossops planirostris* (Chiroptera, Molossidae) using FISH and banding techniques. **Hereditas**, v. 138, p. 94-100, 2003.

SIMMONS, N. B. **Order Chiroptera.** In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Eds.). **Mammals Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference.** Baltimore, p. 312-529. 2005.

INPA. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica Período 2016/2017. Relatório técnico. São Paulo. 2023.

SREEPADA, K.; KOUBÍNOVÁ, D.; KONECNY, A.; KOUBEK, P.; RÁB, P.; RÁBOVÁ, M.; ZIMA, J. Karyotypes of three species of molossid bats (Molossidae, Chiroptera) from India and Western Africa. **Folia Zool.** 57:347–357. 2008.

SOUZA, M. J.; ARAÚJO, M. C. P. Conservative pattern of the G-bands and diversity of C-banding patterns and NORs in Stenodermatinae (Chiroptera, Phyllostomidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 12, p. 255-268, 1990.

SUMNER, A. T. **Chromosome Banding**. Unwin Hyman, London, 1990.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.

TEELING, E. C.; SPRINGER, M. C.; MADSEN, O.; BATES, P.; O'BRIEN, S. J.; MURPHY, W. J. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. **Science**, v. 307, n. 5709, p. 580-584, 2005.

TADDEI, V. A. Os morcegos. Pp.249-283. In: **Insetos e outros invasores de residências** (Mariconi, F. A. M., coord.). "Biblioteca de Ciências Agrárias Luis de Queirós", USP, Piracicaba, SP, 1ª ed., 460 pp, 1999.

TOLEDO, L. A. **Estudos Citogenéticos em Morcegos Brasileiros (Mammalia-Chiroptera)**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, SP, 1973.

TRIVIÑOS, A. N. S. **Introdução à Pesquisa em Ciências Sociais - A Pesquisa Qualitativa em Educação**. São Paulo: Atlas, 1987. ISBN 8522402736.

VARELLA-GARCIA, M.; TADDEI, V. A. Citogenética de Quirópteros: Métodos e Aplicações. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 6, n. 2, p. 297-323, 1989.

VARELLA-GARCIA, M.; MORIELLE-VERSUTE, E.; TADDEI, V. A. A survey of cytogenetic data on Brazilian bats. **Revista Brasileira de Genética**, v. 12, p. 761-793, 1989.

VARZINCZAK, L. H.; BERNARDI, I. P.; PASSOS, F. C. Is the knowledge of bat distribution in the Atlantic Rainforest sufficient? Comments about new findings and a case study in the Paraná State coastal area, Brazil. **Mammalia**, v. 80, n. 3, p. 263-269, 2016.

VIEIRA, M.V., FARIA, D.M., FERNANDEZ, F.A.S., FERRARI, S.F., FREITAS, S.R., GASPAR, D.A., MOURA, R.T., OLIFIERS, N., OLIVEIRA, P.P., PARDINI, R., PIRES, A.S., RAVETTA, A., MELLO, M.A.R., RUIZ, C.R. & SETZ, E.Z.F. **Mamíferos**. In Fragmentação de Ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas (D.M. Rambaldi & D.A. Suárez, orgs.). MMA, SBF, Brasília, p.125-151. 2003.

VOLLETH, M. Differences in the location of nucleolus organizer regions in European vespertilionid bats. – **Cytogenet. Cell Genet.** 44: 186–197. 1987.

WARNER, J. W.; PATTON, J. L.; GARDNER, A. L.; BAKER, R. J. Karyotypic analyses of twenty-one species of molossid bats (Molossidae: Chiroptera). **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 16, p. 165-176, 1974.

YONENAGA, Y. Estudos cromossômicos em espécies de Chiroptera. **Ciência e Cultura**, v. 20, p. 172, 1968.

YONENAGA, Y.; FROTA-PESSOA, O.; LEWIS, K. R. Karyotypes of seven species of Brazilian bats. **Caryologia**, v. 22, p. 63-78, 1969.

YONENAGA-YASSUDA, Yatiyo. Perspectivas em citogenética de mamíferos brasileiros. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 6, p. 431-433, 1977.