

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

JOÃO CARLOS FARIAS SANTANA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Tonatia bidens* (CHIROPTERA:
PHYLLOSTOMIDAE)**

Recife
2020

JOÃO CARLOS FARIAS SANTANA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Tonatia bidens* (CHIROPTERA:
PHYLLOSTOMIDAE)**

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

Área de concentração: Evolução

Orientador: Prof^a. Dr^a. Neide Santos

Coorientador: Dr^a. Cibele Gomes de Sotero Caio

Recife

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Silva, João Carlos Farias Santana da
Caracterização genética de *Tonatia bidens* (Chiroptera: Phyllostomidae) / João Carlos Farias Santana da Silva – 2020.

84 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Neide Santos

Coorientadora: Cibele Gomes Sotero Caio

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética, 2020.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Evolução cromossômica 2. Morcego 3. Mitogenoma I. Santos, Neide (orient.) II. Caio, Cibele Gomes Sotero (coorient.) III. Título.

576.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020- 102

JOÃO CARLOS FARIAS SANTANA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Tonatia bidens* (CHIROPTERA:
PHYLLOSTOMIDAE)**

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

Aprovado em: 28/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Neide Santos (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Andrea Pedrosa Harand (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Valéria da Cunha Tavares (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba

Prof^a. Dr^a. Rita de Cassia de Moura (Examinador Interno)
Universidade de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço à minha avó Severina, pela criação, amor e carinho, além do grande apoio e incentivo nos estudos, onde sempre lutou para dar as melhores oportunidades para o meu futuro. À minha mãe Suely (*in memoriam*), que nos deixou tão nova, mas quando viva, mesmo distante, não media esforços para contribuir com o meu sucesso e sempre se orgulhava das minhas conquistas. Agradeço o exemplo de caráter das grandes mulheres da minha vida!

À minha irmãzinha Bia que amo tanto, agradeço pelos momentos de brincadeiras e risadas. Ao meu pai, avós paternos, tios e primos, especialmente ao meu tio Carlinhos o qual sempre tive como exemplo de pai. Agradeço o carinho, apoio e momentos compartilhados nos encontros de fim de semana em sua casa.

À família Barbosa, Dona Edinaura, Simone, Jorge, Eduarda, Junior e Seu Neno por terem me acolhido no Recife. Vocês sempre serão minha segunda família! A Cláudio Andrade por ser bem mais do que amigo, tendo compartilhado comigo não somente o quarto, mas os vários momentos, especialmente os de alegria.

À minha orientadora prof.^a Dra. Neide Santos, a qual tenho grande admiração, pela orientação, ensinamentos e incentivos! Obrigado pela oportunidade, por estar sempre presente e por sua dedicação para com seus alunos. À minha coorientadora Dra. Cibele Sotero-Caio que, em um momento de incerteza na minha vida acadêmica, confiou no meu potencial e me deu a oportunidade de ser responsável pelos “assuntos quiropterológicos” do laboratório e pelo treinamento em pintura cromossômica. E embora distante durante parte do meu mestrado, nossas inúmeras reuniões por Skype contribuíram imensamente para o meu crescimento e para a conclusão do projeto.

Ao Dr. Santelmo Vasconcelos do Instituto Tecnológico do Vale por sua grande colaboração na obtenção das sequências e pela indispensável ajuda na interpretação dos dados. À prof.^a Dra. Andrea Pedrosa por disponibilizar o uso do Fotomicroscópio do Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal.

À Prof.^a Dra. Vilma que abriu as portas do Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH) no início da minha graduação me concedendo a oportunidade de iniciação científica na citogenética.

Aos demais amigos do LGCAH, especialmente à Raysa e Juliana pela convivência e boas risadas no dia-a-dia. À Dra. Darlene Paiva que tinha total curiosidade em aprender a FISH comigo e acabou se tornando uma grande amiga!

Obrigado pelas horas do café, juntamente com Rhavenna e Rafael, apoio técnico, além das conversas produtivas e pelos incentivos durante todo o meu mestrado.

A todos os colaboradores que, gentilmente, emprestaram tecidos os quais serão de grande importância para o futuro do trabalho: Dra. Valeria Tavares (UFPB), Msc. Patrícia Pilatti (UFPE), Drs. Marcelo Nogueira e Adriano Peracchi (UFRRJ).

Aos membros da banca pela cordialidade de aceitarem o convite para avaliar o trabalho e por suas contribuições que serão de valor inestimável para seu aprimoramento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa. À coordenação, professores e secretários do Programa de Pós-graduação em Genética (PPGG).

RESUMO

Morcegos filostomídeos se destacam por sua variação ecológica, morfológica e cromossômica ($2n = 14$ a 46). O gênero *Tonatia* compreende duas espécies, *T. saurophila* e *T. bidens*. Do ponto de vista genético, *T. saurophila* ($2n = 16$ e $NF = 20 / 22$) possui mais dados disponíveis, contudo, a definição do número diploide para *T. bidens* ainda é incerta ($2n = 16 / 26$ e $NF = 20 / 38$). O objetivo desse estudo foi, com base na combinação de dados citogenéticos e de genoma mitocondrial, avaliar as variações cariotípicas e as relações intraespecíficas de *T. bidens* em diferentes localidades, bem como estimar o *status* taxonômico em comparação a outros filostomídeos proximamente relacionados. Análises de citogenética clássica e ZOO-FISH, utilizando sondas cromossomo-específicas de *Macrotus californicus*, foram realizadas em metáfases mitóticas de um espécime macho morfológicamente identificado como *T. bidens* coletado na Paraíba. O sequenciamento *shotgun* foi realizado na plataforma Illumina NextSeq 500. Integramos sequências mitocondriais (*cyt-b* e *cox1*) em análises filogenéticas de *maximum likelihood* (ML) no programa MEGA X. Os resultados mostraram um cariótipo com $2n = 25,XY / NF = 38$ e RONS no par 12q. A ZOO-FISH revelou homologias compartilhadas entre as duas espécies irmãs e entre outros filostomídeos. Uma translocação Robertsoniana em heterozigose foi evidenciada, rob(2;3). O mitogenoma obtido com 16.717 pb tem todos os 37 genes comuns em mitogenoma animal. Na filogenia obtida a partir de dados do *barcode* (*cox1*) recuperou-se uma relação bem suportada entre os representantes de *T. bidens* com $2n = 26$ e 25 (Mato Grosso e Paraíba). A reconstrução filogenética com sequências do *cyt-b* recuperou um grupo monofilético fortemente suportado formado por *T. saurophila* e *T. bidens* de diferentes localidades. As distâncias genéticas para o *cyt-b* entre *T. bidens* mostraram que espécimes do Paraguai e São Paulo são mais proximamente relacionados do que qualquer um desses ao indivíduo do nordeste brasileiro. A partir de nossos dados podemos concluir que *T. bidens* apresenta um cariótipo variável com $2n = 26 / 25$, indicando que rearranjos cromossômicos estão envolvidos na remodelação da arquitetura cromossômica da espécie, além de valores intraespecíficos de estruturação genética elevados entre espécimes do nordeste e sudeste do Brasil.

Palavras-chave: Morcego. *Tonatia*. Evolução cromossômica. Mitogenoma.

ABSTRACT

Phyllostomid bats stand out for their ecological, morphological and chromosomal variation ($2n = 14$ to 46). The genus *Tonatia* includes two species, *T. saurophila* and *T. bidens*. From a genetic standpoint, *T. saurophila* ($2n = 16$ and $FN = 20 / 22$) has more data available, however, the definition of diploid number for *T. bidens* is still uncertain ($2n = 16 / 26$ and $FN = 20 / 38$). This study aimed, through cytogenetics and mitochondrial genome data combination, to evaluate the karyotypic variations and intraspecific relations of *T. bidens* from different localities, as well as to estimate the taxonomic status and perform a comparative analysis with other closely related phyllostomids. Analyses of classic cytogenetics and ZOO-FISH, using chromosome-specific probes from *Macrotus californicus*, were performed on mitotic metaphases obtained from one male specimen morphologically identified as *T. bidens* and sampled from Paraíba State. Shotgun sequencing was conducted on an Illumina NextSeq 500 platform. We integrated mitochondrial sequences (*cyt-b* and *cox1*) in Maximum Likelihood (ML) phylogenetic reconstruction using MEGA X software. The results showed a karyotype with $2n = 25, XY / FN = 38$ and NORs on pair 12q. ZOO-FISH revealed homologies shared between the two sister-species and other phyllostomids. A heterozygous Robertsonian translocation was found, $rob(2;3)$. The mitogenome obtained with 16,717 bp has all 37 genes common in animal mitogenomes. The phylogeny using barcode data (*cox1*) recovered a well-supported relationship between the representatives of *T. bidens* with $2n = 26$ and 25 (Mato Grosso and Paraíba). Phylogenetic reconstruction with *cyt-b* sequences recovered a strongly supported monophyletic group formed by *T. saurophila* and *T. bidens* from different locations. Genetic distances for *cyt-b* between *T. bidens* showed specimens from Paraguay and São Paulo are more closely-related than any of these specimens to that from northeastern Brazil. From our data, we can conclude that *T. bidens* presents a variable karyotype with $2n = 26 / 25$, indicating that chromosome rearrangements are involved in remodeling the chromosomal architecture of the specie and additionally that there are high intraspecific values of genetic structuring between specimens from northeast and southeast of Brazil.

Keywords: Bat. *Tonatia*. Chromosomal evolution. Mitogenome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Hipótese atual da classificação da ordem Chiroptera. Setas mostram posições alternativas para a superfamília Emballonuroidea e para a família Myzopodidae por MEREDITH <i>et al.</i> (2011). (Fonte: adaptado de AMADOR <i>et al.</i> , 2018).	19
Figure 2 -	Representantes da família Phyllostomidae. a) <i>Platyrrhinus lineatus</i> ; b) <i>Diphylla ecaudata</i> ; c) <i>Desmodus rotundus</i> ; d) <i>Diaemus youngi</i> ; e) <i>Centurio senex</i> . (Fonte adaptada: LÓPEZ-BAUCELLS <i>et al.</i> 2016)	22
Figura 3 -	Filogenia proposta por BAKER <i>et al.</i> (2003b) a partir de inferência Bayesiana de dados concatenados de DNAm e RAG2.	25
Figura 4 -	Filogenia proposta por HOFFMANN <i>et al.</i> , (2008) a partir de inferência Bayesiana de dados concatenados de DNAm e DNA nuclear. Os espécimes utilizados do gênero <i>Mimon</i> nessa análise foi sinonizado como espécies do gênero <i>Gardnerycteris</i> (<i>G. crenulatum</i>).	26
Figura 5 -	Mapa da América do Sul e Sudeste da América Central mostrando localidades de coleta e distribuição geográfica de <i>Tonatia bidens</i> (1) e <i>Tonatia saurophila</i> (2-4) [<i>T. s. bakeri</i> (2); <i>T. s. maresi</i> (3); <i>T. s. saurophila</i> (4)] (Fonte: WILLIAMS <i>et al.</i> , 1995)	28
Figura 6 -	Espécies do gênero <i>Tonatia</i> . a) <i>Tonatia bidens</i> ; b) Características morfológicas de crânio (esquerda), mandíbula (centro) e dentição inferior (direita) de <i>T. bidens</i> ; 1. Constrição pós-orbital ampla; 2. Cíngulo dos caninos inferiores posicionados proximamente, se tocam ou quase se tocam; 3. Incisivos inferiores estreitos; 4. Segundo pré-molar reduzido pelo cíngulo dos pré-molares vizinhos; c) <i>Tonatia saurophila</i> , seta indica presença da listra branca e d) Características morfológicas de crânio (esquerda), mandíbula (centro) e dentição inferior (direita) de <i>T. saurophila</i> ; 5. Constrição pós-orbital menos evidente; 6. Cíngulo dos caninos inferiores separados; 7. Incisivos inferiores relativamente amplos; 8. Segundo pré-molar mais robusto não obscurecido pelo cíngulo	

	dos pré-molares adjacentes. (Fonte adaptada: TAVARES <i>et al.</i> , 2015).....	30
Figura 7 -	Estrutura típica do genoma mitocondrial em mamíferos. Desenho produzido na plataforma OGDRAW versão 1.3.1 (GREINER <i>et al.</i> , 2019) utilizando dados do mitogenoma de <i>Desmodus rotundus</i> (Chiroptera: Phyllostomidae) (ID GenBank: NC_022423.1) e modificada no editor de imagens Inkscape.	32
Figura 8 -	Análise citogenética clássica em <i>Tonatia bidens</i> . a) Coloração convencional $2n = 25,XY \text{ rob}(2;3)$ e $NF = 38$; b) Impregnação com $AgNO_3$. Setas indicam a localização da RON no par 12.	48
Figura 9 -	Homologias cromossômicas de <i>Macrotus californicus</i> (MCA) no cariótipo de <i>Tonatia bidens</i> (TBI). As correspondências cromossômicas entre as duas espécies são mapeadas (número) à direita de cada cromossomo em DAPI invertido. Números em vermelho representam marcações que necessitam de mais experimentos para sua confirmação. À direita, representação esquemática de cada par cromossômico, com respectivas regiões de homologia a cromossomos de MCA de acordo com o código de cores incluído na parte inferior da imagem; A cor branca corresponde a sondas de MCA com as quais experimentos não foram realizados. Nota: * = cromossomos de outra metáfase.....	49
Figura 10 -	Imagens representativas de hibridizações <i>in situ</i> com sondas de <i>Macrotus californicus</i> (MCA) em metáfases de <i>Tonatia bidens</i> (TBI). Sondas utilizadas estão indicadas no canto superior esquerdo das fotomicrografias. Em a, b e c, exemplos de sondas autossômicas e sexual de MCA em TBI. Em d, resultados e esquema compilatório da pintura cromossômica mostrando o rearranjo no novo citótipo de <i>T. bidens</i> ($2n = 25,XY,rob(2;3)$); as sondas envolvidas na translocação são apresentadas com sua marcação nos cromossomos e identificadas ao lado de cada cromossomo em DAPI invertido.	50
Figura 11 -	Representação esquemática do mitogenoma de <i>T. bidens</i> produzido na plataforma OGDRAW (GREINER <i>et al.</i> , 2019). Círculo interno corresponde ao conteúdo GC e o círculo externo a	

	representação dos diferentes genes. As sequências de RNAs estão identificadas pelas letras de seus respectivos aminoácidos...	51
Figura 12 -	<i>Codon usage</i> no genoma mitocondrial de <i>Tonatia bidens</i> . Frequência de <i>codon usage</i> localizadas no eixo Y. Grupo de códon para os respectivos aminoácidos estão plotados abaixo do gráfico com as respectivas cores associadas (eixo X).	54
Figura 13 -	Filogenia molecular da região <i>barcode</i> para a subfamília Phyllostominae, construída a partir do método de <i>Maximum likelihood</i> valores de <i>bootstrap</i> na parte superior de cada clado. Dados citogenéticos para o gênero <i>Tonatia</i> inseridos em parênteses. As espécies do gênero <i>Tonatia</i> foram recuperadas como um clado monofilético com valor de <i>bootstrap</i> >50. No gênero, o primeiro grupo recuperado na filogenia está formado pelos representantes de <i>T. saurophila</i> , incluindo o espécime 2n=16 e NF=20, com suporte alto (100). O segundo grupo resgata o clado formado pelos dois espécimes de <i>T. bidens</i> com citótipos 2n = 25, NF = 38 e 2n = 26, NF = 38 fortemente suportado (100). ..	55
Figura 14 -	Filogenia molecular de genes concatenados (cyt- <i>b</i> ; RNAr 12S-16S – RNAt ^{Val}) da subfamília Phyllostominae, construída a partir do método de <i>Maximum likelihood</i> com valores de <i>bootstrap</i> na parte superior de cada clado. Localização dos espécimes do gênero <i>Tonatia</i> com siglas dos países descritas em parênteses: BRA – Brasil; EQU – Equador; GUI - Guiana; GUF – Guiana Francesa; PAN - Panamá e PAR – Paraguai.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação e número de espécies da ordem Chiroptera.	20
Tabela 2 -	Subfamílias de Phyllostomidae e número de espécies caracterizadas citogeneticamente.....	35
Tabela 3 -	Dados citogenéticos para a subfamília Phyllostominae.	38
Tabela 4 -	Anotação do mitogenoma de <i>Tonatia bidens</i>	52
Tabela 5 -	Comparação da distância genética do gene citocromo <i>b</i> (cyt- <i>b</i>) entre o espécime de <i>Tonatia bidens</i> do nordeste brasileiro (M829 - TBI) e alguns representantes da subfamília Phyllostominae. Valores estimado (%) usando o <i>p-distance</i> no MEGA X.....	57
Tabela 6 -	Dados citogenéticos comparativos para o gênero <i>Tonatia</i>	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
A	Adenina
AgNO ₃	Nitrato de prata
AIC	Do inglês: Akaike Information Criterion
AMD	Actinomicina D
<i>atp</i>	ATP sintetase
BOLD	Do inglês: Barcode of Life Data System
C	Citosina
COI	<i>Citocromo oxidase subunidade I</i>
<i>cox</i>	Do inglês: <i>cytochrome oxidase c</i>
<i>cyt-b</i>	Do inglês: <i>cytochromo b</i>
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAmt	DNA mitocondrial
DOP-PCR	Do inglês: <i>Degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction</i>
FISH	Do inglês: <i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
g	Grama
G	Guanina
GCP	Genes codificadores de Proteínas
H ₂ O	Molécula química da água
HCl	Ácido Clorídrico
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
Kb	Kilo pares de bases
Ma	Milhões de anos
MCA	<i>Macrotus californicus</i>
ML	Maximum likelihood
mm	Milímetros
MWA	<i>Macrotus waterhousii</i>
<i>nad</i>	NADH desidrogenase

NF	Número Fundamental
ng	Nano grama
NL	Neighbor-Joining
p	Braço cromossômico curto
pb	Pares de bases
q	Braço cromossômico longo
RAG2	Do inglês: Recombination Activating Gene 2
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	RNA ribossomal
RNAt	RNA transportador
rob	Translocação Robertsoniana
RON	Região Organizadora de Nucléolo
<i>spp.</i>	Espécies
SSC	Do inglês: <i>Saline-Sodium Citrate</i>
T	Timina
TBI	<i>Tonatia bidens</i>
TSA	<i>Tonatia saurophila</i>
U	Uracila
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
≅	Aproximadamente igual
≥	Maior ou igual
°C	grau Celsius
μL	Microlitro
2n	Número diploide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	ORDEM CHIROPTERA: ASPECTOS GERAIS E EVOLUTIVOS.....	18
2.2	FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE: ASPECTOS GERAIS.....	21
2.2.1	Sistemática da Família Phyllostomidae.....	23
2.3	SUBFAMÍLIA PHYLLOSTOMINAE: ASPECTOS GERAIS E SISTEMÁTICA.....	26
2.3.1	Gênero <i>Tonatia</i>: sistemática e taxonomia (<i>sensu</i> WILLIAMS <i>et al.</i>, 1995)	27
2.4	GENES MITOCONDRIAIS E SEU EMPREGO EM ESTUDOS FILOGENÉTICOS NA FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE.....	31
2.5	EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA NA FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE..	33
2.5.1	Subfamília Phyllostominae (<i>sensu</i> BAKER <i>et al.</i>, 2016)	37
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	AMOSTRAGEM.....	42
4.2	ANÁLISE CITOGENÉTICA: PREPARAÇÃO CROMOSSÔMICA E CITOGENÉTICA CLÁSSICA.....	42
4.2.1	Coloração Convencional	42
4.2.2	Impregnação com nitrato de prata (AgNO₃).....	43
4.3	PINTURA CROMOSSÔMICA UTILIZANDO SONDAS DE <i>Macrotus californicus</i> (MCA)	43
4.3.1	Análise dos dados de ZOO-FISH.....	44
4.4	ANÁLISE MOLECULAR: CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA, EXTRAÇÃO DO DNA E SEQUENCIAMENTO GENÔMICO.....	45
4.4.1	Montagem e caracterização do mitogenoma de <i>T. bidens</i>	45
4.4.2	Análises Filogenéticas.....	46
5	RESULTADOS.....	48
5.1	DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA DE <i>Tonatia bidens</i> (TBI).....	48

5.2	MITOGENOMA DE <i>T. bidens</i> : CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	51
6	DISCUSSÃO	58
6.1	CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE <i>Tonatia bidens</i>	58
6.2	MITOGENOMA DE <i>T. bidens</i> : CARACTERIZAÇÃO E TAXONOMIA INTEGRATIVA.....	62
6.2.1	Caracterização do Mitogenoma.....	62
6.2.2	Taxonomia integrativa no gênero <i>Tonatia</i>	63
7	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICE A - NÚMERO DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS DO GENE COI.....	81
	APÊNDICE B - NÚMERO DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS DO GENE CYT-B E DO FRAGMENTO CONCATENADO RNAr 12S-16S – RNAt^{Val} SEPARADOS POR TÁXON E LOCALIZAÇÃO.	82
	APÊNDICE C - ESTRUTURAS DOS 22 RNAts DO MITOGENOMA DE <i>Tonatia bidens</i>.	83
	APÊNDICE D - FILOGENIA MOLECULAR DA SUBFAMÍLIA PHYLLOSTOMINAE, CONSTRUÍDA A PARTIR DO MÉTODO DE <i>MAXIMUM LIKELIHOOD</i> VALORES DE <i>BOOTSTRAP</i> NA PARTE SUPERIOR DE CADA CLADO. (A) FILOGENIA DO GENE CYT-B; E (B) DO FRAGMENTO MITOCONDRIAL CONCATENADO RNAr 12S-16S – RNAt^{Val}. LOCALIZAÇÃO DOS ESPÉCIMES DO GÊNERO <i>Tonatia</i> COM SIGLAS DOS PAÍSES DESCRITAS EM PARÊNTESES: BRA – BRASIL; EQU – EQUADOR; GUI - GUIANA; GUF – GUIANA FRANCESA E PAR – PARAGUAI.....	84

1 INTRODUÇÃO

A ordem Chiroptera apresenta ampla variabilidade ecológica e morfológica, associadas às múltiplas adaptações alimentares das espécies. No grupo, a família Phyllostomidae, amplamente distribuída nas Américas, se destaca por apresentar uma rápida diversificação e extrema variação morfológica e ecológica associadas a altas taxas de mudanças cromossômicas.

Dados cromossômicos são importantes para a sistemática e taxonomia, embora, raramente são incluídos na diagnose de novas espécies ou em estudos sistemáticos que empregam marcadores moleculares. A utilização de forma integrada de diferentes tipos de dados facilita as delimitações taxonômicas, particularmente no caso de espécies simpátricas, ou espécies com identificações ambíguas. Em muitos casos, a carência de estudos integrativos mais aprofundados impossibilita a estimativa de mudanças genéticas em linhagens evolutivas e sua relação com taxas de especiação e diversificação.

A integração de dados citogenéticos e marcadores mitocondriais pode representar uma ferramenta poderosa na caracterização genética de espécies. Diferentes genes mitocondriais como os genes *COI* (citocromo oxidase c I) e *cyt-b* (citocromo b) se destacam por sua ampla utilização em estudos de caracterização de quirópteros e análises filogenéticas. Além disso, técnicas de citogenética molecular como a pintura cromossômica permitem a inferência dos rearranjos que ocorreram ao longo da diferenciação das espécies, através da identificação precisa de homologias cromossômicas. Dados obtidos de amostras cariotípicas combinados a seus respectivos marcadores mitocondriais permitem a caracterização genética inequívoca das espécies.

Apesar de esforços para elucidar as relações genéticas a partir de dados moleculares e cariotípicos, essa integração ainda é inexistente para vários grupos-chave dentro da família Phyllostomidae. No gênero *Tonatia*, historicamente os dois únicos representantes, *T. saurophila* e *T. bidens*, foram caracterizados com números diploides iguais ($2n = 16$). Contudo, evidências recentes sugerem que *T. bidens* apresente constituição cromossômica distinta. No centro-oeste brasileiro, um novo citótipo com $2n = 26$ foi descrito para *T. bidens*, o referido espécime foi caracterizado pela região *barcode* do gene *COI*. Entretanto, não foi possível definir, a partir dos dados apresentados, se o

espécime investigado corresponde a uma nova espécie ou realmente representa *T. bidens* com diferente número cariotípico.

Devido à falta de integração de diferentes dados cromossômicos e moleculares ao longo de sua área de ocorrência, *Tonatia bidens* não possui a definição do seu número diploide ($2n = 16 / 26$). Informações moleculares são desconhecidas e pouco exploradas ao longo de sua distribuição geográfica, principalmente na região nordeste do Brasil. Neste trabalho, com base na combinação de dados citogenéticos (convencional e pintura cromossômica) e de genoma mitocondrial, avaliamos as variações cariotípicas e as relações intraespecíficas de *T. bidens* em diferentes localidades, bem como o *status* taxonômico em comparação a outros filostomíneos proximamente relacionados. Discutimos o papel dos rearranjos cromossômicos na evolução do gênero *Tonatia* e suas implicações para determinar o cariótipo ancestral do grupo. Analisamos os dados cromossômicos e moleculares de forma integrada a fim de testar a hipótese de que espécimes com cariótipos diferentes correspondem a diversidade genética ainda não atribuída a espécie *Tonatia bidens*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ORDEM CHIROPTERA: ASPECTOS GERAIS E EVOLUTIVOS

Morcegos são os únicos representantes dos mamíferos capazes de realizar voos verdadeiros devido as suas características morfológicas especializadas. Esses animais pertencem à ordem Chiroptera, do grego “*cheir*” = mão e “*pteron*” = asa, que apresentam ampla variedade ecológica, observando-se diversidade morfológica associada a habilidade de voo, ecolocalização e diversas adaptações alimentares como respostas adaptativas a vários nichos ecológicos. Essas adaptações foram importantes para manutenção das relações tróficas nos ecossistemas (SIMMONS, 2005; REIS *et al.*, 2007).

Os morcegos tradicionalmente eram classificados com base em análises morfológicas em duas subordens: Microchiroptera (ecolocalizadores) e Megachiroptera (não ecolocalizadores) (SIMMONS e GEISLER, 1998). No entanto, após estudos sistemáticos moleculares, esses termos não estão mais em uso devido a filogenia não sustentar a monofilia da subordem Microchiroptera. Atualmente, os quirópteros estão distribuídos em duas subordens: Yinpterochiroptera (Pteropodiformes) e Yangochiroptera (Vespertilioniformes), sendo Yinpterochiroptera composta por seis famílias de microquirópteros e os morcegos que não possuem ecolocalização da família Pteropodidae (Megaquirópteros), pois apresentam uma relação mais próxima entre elas. Por sua vez, a subordem Yangochiroptera é formada apenas por famílias de microquirópteros (Figura 1) (TEELING *et al.*, 2005; JONES e TEELING, 2006).

Chiroptera é a segunda maior ordem em números de espécies depois da ordem Rodentia, correspondendo a cerca de 20% do percentual de espécies entre os mamíferos, com mais de 1.400 espécies reunidas em 227 gêneros e 21 famílias (Tabela 1) (BURGIN *et al.*, 2018). A subordem Yinpterochiroptera é representada pela família Pteropodidae juntamente à superfamília Rhinolophoidea, com seis famílias (Craseonycteridae, Hipposideridae, Megadermatidae, Rhinolophidae, Rhinopomatidae e Rhinonycteridae), enquanto a subordem Yangochiroptera é formada por 14 famílias reunidas em três superfamílias: Noctilionoidea, Emballonuroidea e Vespertilionoidea (Figura 1). Nove famílias de Yangochiroptera apresentam ocorrência nas Américas,

nenhuma ocorrência de Yinpterochiroptera, estando todas representadas no Brasil (SIMMONS, 2005; REIS *et al.*, 2007; NOGUEIRA *et al.*, 2018).

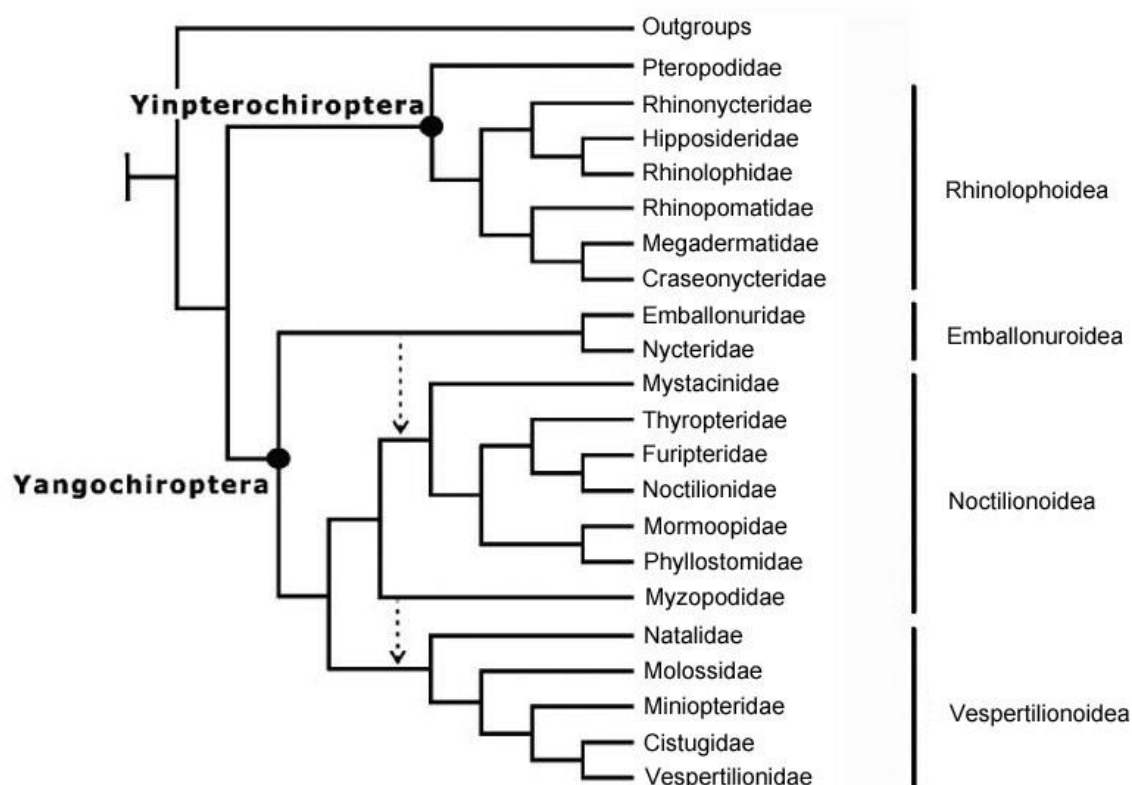


Figura 1. Hipótese atual da classificação da ordem Chiroptera. Setas mostram posições alternativas para a superfamília Emballonuroidea e para a família Myzopodidae por MEREDITH *et al.* (2011). (Fonte: adaptado de AMADOR *et al.*, 2018).

A descrição da diversidade de espécies de morcegos vem crescendo substancialmente nos últimos anos quando comparada à tradicional compilação de espécies realizada por SIMMONS (2005). Na região neotropical, concentram-se diversas famílias de morcegos que apresentaram um incremento de aproximadamente oito espécies novas ao ano, com atualmente 380 espécies, o que representa um aumento de 75 novas espécies descritas desde 2005, de acordo com a última atualização realizada por SOLARI e MARTÍNEZ-ARIAS (2014). No Brasil, o número de espécies tem aumentado desde as compilações de REIS *et al.* (2007) com $n = 167$, chegando a $n = 172$ em 2012 (PAGLIA *et al.*, 2012) e $n = 178$ em 2014 por NOGUEIRA *et al.* (2014). Recentemente, NOGUEIRA *et al.* (2018) atualizaram a lista da quiropteroфаuna brasileira com 182 espécies distribuídas em nove famílias (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação e número de espécies da ordem Chiroptera.

Ordem Chiroptera			
Classificação		Número de espécies	
		Mundo ¹	Brasil ²
Subordem Yinpterochiroptera			
Família	Pteropodidae	197	-
Superfamília Rhinolophoidea			
	Rhinolophidae	102	-
	Hipposideridae	88	-
Família	Megadermatidae	6	-
	Craseonycteridae	1	-
	Rhinopomatidae	6	-
	Rhinonycteridae	9	-
Subordem Yangochiroptera			
Superfamília Emballonuroidea			
	Emballonuridae	54	17
Família	Myzopodidae	2	-
	Nycteridae	16	-
Superfamília Noctilionoidea			
	Furipteridae	2	1
	Noctilionidae	16	2
Família	Thyropteridae	5	5
	Mormoopidae	17	4
	Mystacinidae	2	-
	Phyllostomidae	218*	93
Superfamília Vespertilionoidea			
	Natalidae	11	1
	Miniopteridae	35	-
Família	Cistugidae	2	-
	Molossidae	122	31
	Vespertilionidae	493	28
TOTAL		1.404	182

Fonte: ¹BURGIN *et al.* (2018) a partir do banco de dados *Mammal Diversity Database* (MDD) <https://mammaldiversity.org.>; ²NOGUEIRA *et al.* (2018); *Registros publicados até novembro de 2018 (SILES e RIOS, 2019).

As espécies da ordem Chiroptera vêm sendo estudadas em diversas áreas da genética, incluindo a sistemática molecular, a citogenética e a genômica, de forma a esclarecer os eventos que moldaram a arquitetura genética dos morcegos, resultando na diversificação da ordem (TEELING *et al.*, 2018). Do ponto de vista citogenético, a ordem Chiroptera apresenta elevada diversidade cariotípica, com variação de número diploide entre $2n = 14$ na espécie *Vampyressa melissa* Thomas, 1926 (Phyllostomidae) a $2n = 62$ em 13 espécies da família Rhinolophidae (GARDNER, 1977; ZIMA *et al.*, 1992). A citogenética se destaca por um importante papel na complementação de estudos de sistemática

de morcegos, a partir de reconstruções filogenéticas utilizando dados cromossômicos (GOMES *et al.*, 2018; BENATHAR *et al.*, 2019).

Estudos de evolução cromossômica em morcegos são mais frequentemente realizados por meio de bandejamento G que, no entanto, apresenta limitações na determinação dos rearranjos cromossômicos em espécies com cariótipos altamente rearranjados (SOTERO-CAIO *et al.*, 2017a). Para isso, a pintura cromossômica se apresenta como uma técnica mais robusta, especialmente no esclarecimento das taxas de mudanças cariotípicas entre os morcegos (SOTERO-CAIO *et al.*, 2015), além de fornecer caracteres adicionais (rearranjos cromossômicos) que podem ser incorporados a matrizes de dados em um contexto filogenético (GOMES *et al.*, 2018; BENATHAR *et al.*, 2019; SOLARI *et al.*, 2019). Os resultados presentes na literatura fornecem subsídios para preencher lacunas de informações sobre os principais eventos na evolução da arquitetura genômica entre as famílias de morcegos, por exemplo, Phyllostomidae (SOTERO-CAIO *et al.*, 2013, 2015; GOMES *et al.*, 2018; BENATHAR *et al.*, 2019), Vespertilionidae (VOLLETH *et al.*, 2002; MAO *et al.*, 2007; RICHARDS *et al.*, 2010; KULEMZINA *et al.*, 2011) e Rhinolophidae (AO *et al.*, 2007; KACPRZYK *et al.*, 2016; VOLLETH *et al.*, 2017), servindo como ponte entre citogenética e investigações de taxonomia, sistemática e história natural de quirópteros.

2.2 FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE: ASPECTOS GERAIS

Morcegos da família Phyllostomidae são endêmicos do continente americano, encontrados principalmente na região neotropical e conhecidos por apresentarem um apêndice nasal em forma de folha (*New World leaf-nosed bats*) (Figura 2a) (SIMMONS, 2005). A presença da folha nasal é uma característica comum entre os filostomídeos, no entanto, morcegos vampiros da subfamília Desmodontinae e a espécie *Centurio senex* Gray, 1842 (Stenodermatinae) não apresentam essa característica de forma desenvolvida (Figura 2b-e).

Dentre as famílias da ordem Chiroptera, Phyllostomidae é a mais diversa na região neotropical, com cerca de 63,5% da quiropterofauna de morcegos na região (SOLARI e MARTÍNEZ-ARIAS, 2014). Constitui a segunda maior família de morcegos (depois da família Vespertilionidae), com 218 espécies reunidas em 60 gêneros (BAKER *et al.*, 2016; SILES e RIOS, 2019). Atualmente, os morcegos filostomídeos estão agrupados em 11 subfamílias: Carrollinae, Desmodontinae,

Glossophaginae, Glyphonycterinae, Lonchophyllinae, Lonchorhininae, Macrotinae, Micronycterinae, Phyllostominae, Rhinophyllinae e Stenodermatinae (BAKER *et al.*, 2016; CIRRANELLO *et al.*, 2016). No Brasil, representa a família de morcegos mais numerosa, com cerca de 93 espécies com representantes de 44 gêneros (NOGUEIRA *et al.*, 2018).

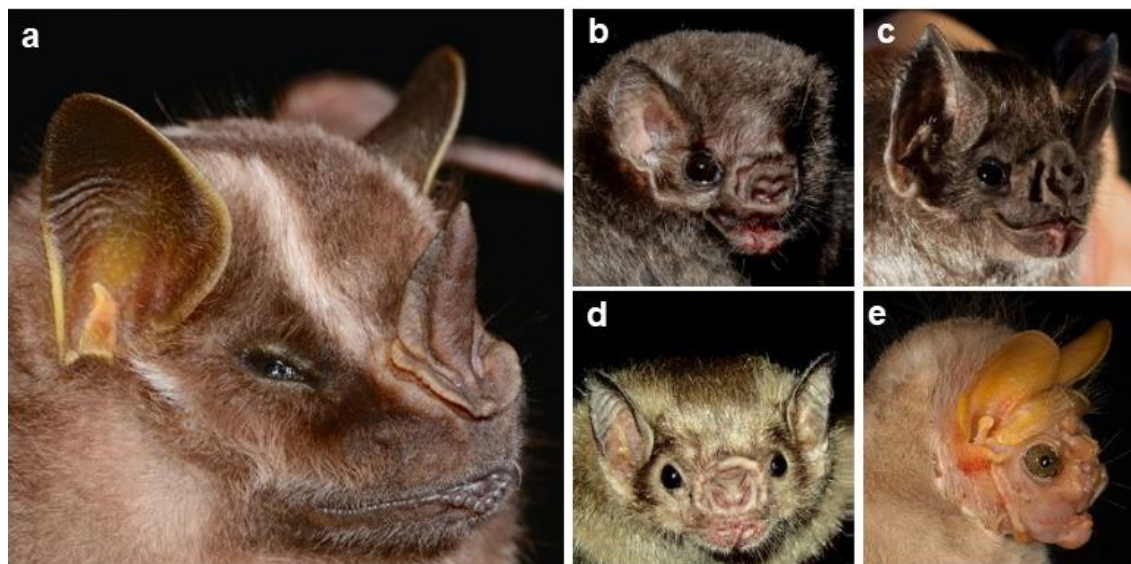


Figure 2. Representantes da família Phyllostomidae. a) *Platyrrhinus lineatus*; b) *Diphylla ecaudata*; c) *Desmodus rotundus*; d) *Diaemus youngi*; e) *Centurio senex*. (Fonte adaptada: LÓPEZ-BAUCELLS *et al.* 2016)

A família Phyllostomidae possui uma grande diversidade trófica associada a adaptações morfológicas, o que favorece o sucesso adaptativo em diversos habitats como a Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata atlântica e até mesmo em áreas urbanas (REIS *et al.*, 2007; PAGLIA *et al.*, 2012). As estratégias alimentares entre as famílias de morcegos são normalmente limitadas a uma ou duas fontes de alimento (BAKER *et al.*, 2012), por outro lado, a família Phyllostomidae são descritos seis tipos diferentes de hábitos alimentares, podendo ser insetívoros, carnívoros, frugívoros, nectarívoros, onívoros e hematófagos. Essa variação alimentar entre os filostomídeos está associada a grandes variações morfológicas (interna e externa), fisiológicas e comportamentais (BAKER *et al.*, 2012).

As pesquisas com o objetivo de reconstruir a história filogenética dos filostomídeos, sua origem evolutiva e radiação têm sido realizadas buscando também compreender possíveis mecanismos genéticos envolvidos na sua diversificação. Dentre eles, destacam-se estudos acerca da plasticidade

genômica, potencialmente envolvida na diversidade ecológica, morfológica e fisiológica do grupo, como a fixação de rearranjos cromossômicos e alteração de expressão gênica por DNA móvel (PARISH *et al.*, 2002; SOTERO-CAIO *et al.*, 2015; 2017b; SOUZA *et al.*, 2017).

2.2.1 Sistemática da Família Phyllostomidae

Investigações sistemáticas em morcegos filostomídeos têm sido intensivamente conduzidas nas últimas décadas com a ajuda de marcadores moleculares (BAKER *et al.*, 2003b, 2016; DATZMAN *et al.*, 2010; ROJAS *et al.*, 2016; AMADOR *et al.*, 2018) e caracteres morfológicos em separado ou combinados com os moleculares (WETTERER *et al.*, 2000; DÁVALOS *et al.*, 2012; CIRRANELLO *et al.*, 2016. TAVARES *et al.*, 2018). A heterogeneidade no grupo tem motivado inúmeros estudos com finalidades diversas que produzem contribuições indiretas ou diretas para uma classificação da família, resultando em evidências mais fortes de grupos monofiléticos e relações entre os clados.

Morcegos filostomídeos tiveram sua diversificação há aproximadamente 35 milhões de anos (Ma), entretanto, muitas espécies se diversificaram em um curto período evolutivo de 10 a 5 Ma (AMADOR *et al.*, 2018). A reconstrução da história evolutiva da família vem sofrendo modificações, especialmente no que diz respeito às relações entre suas subfamílias, devido às incongruências impulsionadas pela rápida diversificação e pelos grandes acúmulos de mudanças adaptativas. O reflexo disso é evidente em diferentes conjuntos de dados que mostram filogenias moleculares e morfológicas de Phyllostomidae não congruentes (WETTERER *et al.*, 2000; BAKER *et al.*, 2003b; DATZMAN *et al.*, 2010; ROJAS *et al.*, 2011, 2016; DÁVALOS *et al.*, 2012; AMADOR *et al.*, 2018, TAVARES *et al.* 2018).

Diversos trabalhos realizados durante o século XX foram revisados por WETTERER *et al.* (2000), que de certa forma forneceram contribuições para a atual classificação da família Phyllostomidae. Esses autores se basearam em análises de parcimônia de 150 caracteres morfológicos, incluindo alguns dados cromossômicos, gerando uma classificação de Phyllostomidae com sete subfamílias e 53 gêneros. No trabalho foram observados clados formados por espécies que possuem hábitos alimentares correlatos mais adaptações

morfológicas a eles associadas. Contudo, a filogenia resultante ainda apresentava limitações na resolução das relações entre os grupos.

Anos depois, em contraste aos resultados de WETTERER *et al.* (2000), dados de DNA mitocondrial (DNAMt) e nuclear se mostraram bastante diferenciados das análises morfológicas sugeridas até então, demonstrando que morcegos com hábitos alimentares similares não necessariamente se agrupavam. BAKER *et al.* (2003b) em uma análise baseada em fragmentos de DNAMt de 2,6 Kb (incluindo RNAr 12S, RNAt^{Val} e RNAr 16S) e o gene nuclear *RAG2*, descobriram que algumas guildas alimentares evoluíram em diferentes momentos na árvore filogenética. Diante disso, um novo agrupamento foi proposto, com reorganização da família Phyllostomidae em 11 subfamílias. Atualmente a filogenia proposta por BAKER *et al.* (2003b) vem sendo utilizada como referência para estudos recentes (Figura 3).

Novas tentativas de reconstrução da filogenia da família Phyllostomidae produziram suporte adicional para a maioria dos clados detectados na topologia proposta por BAKER *et al.* (2003b) principalmente ao nível de subfamília. Como visto em ROJAS *et al.* (2011), usando citocromo *b* e incorporando as sequências obtidas por BAKER *et al.* (2003b); mais o gene citocromo oxidase *c I* (DUMONT *et al.*, 2012); caracteres dentários, genes mitocondriais e nucleares (DÁVALOS *et al.*, 2012 e 2014). Para produzir uma classificação mais robusta e estável da família Phyllostomidae, BAKER *et al.* (2016) nomearam clados utilizando os dados moleculares publicados por BAKER *et al.* (2003b) integrando dados cariotípicos como caracteres diagnósticos para cada táxon; em conjunto a esses dados CIRRANELLO *et al.* (2016) forneceram caracteres morfológicos diagnósticos para cada clado, que juntos propuseram uma topologia ligeiramente modificada (posição de Lonchorhininae) de BAKER *et al.* (2003b). Recentemente, AMADOR *et al.* (2018) utilizando um total de nove genes mitocondriais e nucleares observaram congruência nas subfamílias, tribos e subtribos propostas por BAKER *et al.* (2016) com algumas exceções.

Por outro lado, algumas diferenças ainda encontradas nas topologias tendem a estar relacionadas a agrupamentos com valores de confiança baixos e conflitantes na filogenia da família, como o caso da posição filogenética da subfamília Lonchorhininae que ainda se mantém pouco resolvida, e os diferentes momentos de divergência das linhagens basais Micronycterinae e Desmodontinae

(ROJAS *et al.*, 2011, 2016; DÁVALOS *et al.*, 2014; AMADOR *et al.*, 2018). Em contrapartida, as contribuições dos diferentes estudos sugerem o crescente consenso da congruência das posições filogenéticas dos principais grupos de filostomídeos, fornecendo suportes adicionais a classificação proposta em BAKER *et al.* (2016).

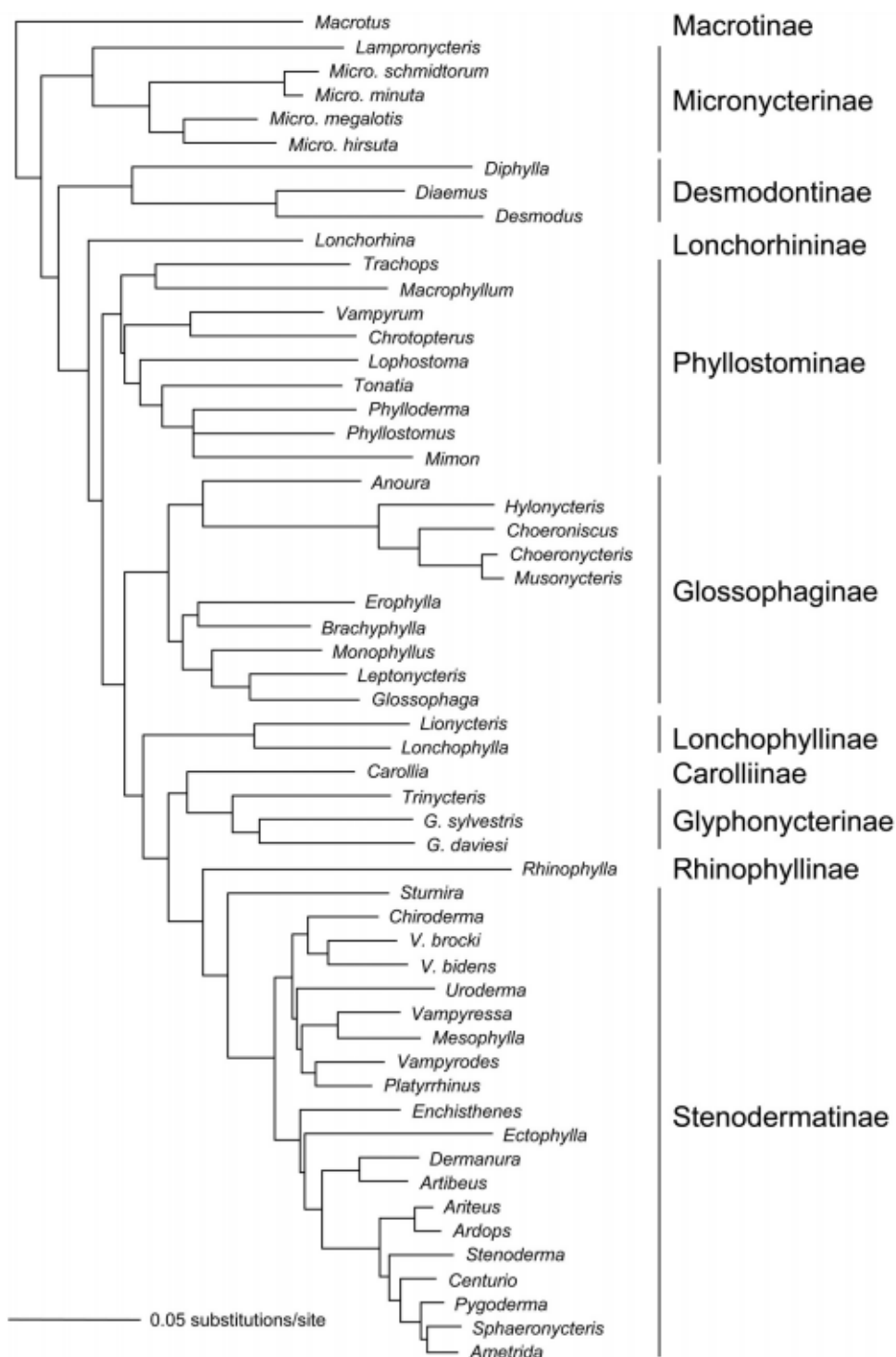


Figura 3. Filogenia proposta por BAKER *et al.* (2003b) a partir de inferência Bayesiana de dados concatenados de DNAm_t e RAG2.

2.3 SUBFAMÍLIA PHYLLOSTOMINAE: ASPECTOS GERAIS E SISTEMÁTICA

A subfamília Phyllostominae é bastante diversificada e com representantes essencialmente neotropicais. Os morcegos filostomíneos apresentam considerável diversidade morfológica e peso que pode variar de 10 a 200 g, sendo a espécie *Vampyrum spectrum* Linnaeus, 1758 considerada o maior morcego das Américas. As espécies do grupo variam nas estratégias alimentares: carnívoria, insetívoria e frugívoria (REIS *et al.*, 2007).

Atualmente são conhecidas 24 espécies de morcegos filostomíneos reunidas em 10 gêneros, com distribuição desde o México até o norte da Argentina (BAKER *et al.*, 2016). Em 2014 foi descrito um novo gênero na subfamília, *Gardnerycteris* (*G. crenulatum*, *G. koepckeae* e *G. keenani*), antes com seus representantes incluídos no gênero *Mimon* (HURTADO e PACHECO, 2014; HURTADO e D'ELÍA, 2018). No Brasil, são encontradas 17 espécies representantes de todos os 10 gêneros (NOGUEIRA *et al.*, 2018). A partir de dados moleculares e morfológicos foi proposta uma classificação para os filostomíneos, formada por três tribos: Macrophyllini (gêneros *Macrophyllum* e *Trachops*), Phyllostomini (*Gardnerycteris*, *Lophostoma*, *Tonatia*, *Phylloderma* e *Phyllostomus*) e Vampyrini (*Chrotopterus*, *Mimon* e *Vampyrum*) (Figura 4; HOFFMANN *et al.*, 2008; BAKER *et al.*, 2016; CIRRANELLO *et al.*, 2016).

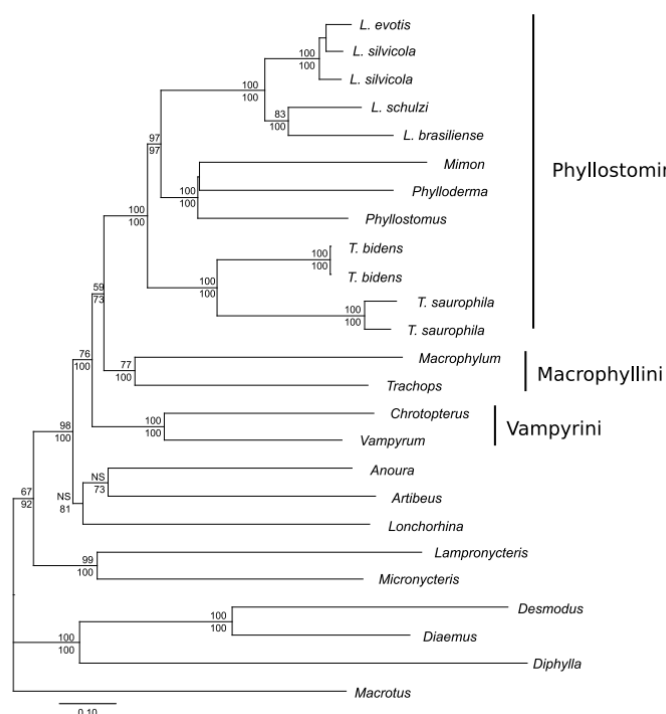


Figura 4. Filogenia proposta por HOFFMANN *et al.*, (2008) a partir de inferência Bayesiana de dados concatenados de DNAm e DNA nuclear. Os espécimes utilizados do gênero

Mimon nessa análise foi sinonizado como espécies do gênero *Gardnerycteris* (*G. crenulatum*).

Avanços nos estudos da sistemática na subfamília Phyllostominae a partir de dados de DNAm e nuclear têm buscado compreender as relações filogenéticas entre as três tribos (BAKER *et al.*, 2003b; HOFFMANN *et al.*, 2008). HOFFMANN *et al.* (2008), usando a análise combinada dos genes citocromo *b*, RNAr 12S – 16S e gene nuclear *RAG-2*, apoiaram a monofilia das três tribos (Figura 4).

2.3.1 Gênero *Tonatia*: sistemática e taxonomia (*sensu* WILLIAMS *et al.*, 1995)

Os morcegos neotropicais do gênero *Tonatia* incluem duas espécies: *T. saurophila* e *T. bidens*. Entretanto, até 2002 o gênero originalmente era composto por mais cinco espécies hoje sinonizados no gênero *Lophostoma*, após alterações propostas por LEE-JR *et al.* (2002). Esses autores, baseados em dados de DNAm, encontraram diferenças significativas e a parafilia dentro do gênero *Tonatia* em relação as demais cinco espécies (*Lophostoma brasiliense* Peters, 1866; *L. carrikeri* Allen, 1910; *L. evotis* Davis e Carter, 1978; *L. schulzi* Genoways e Williams, 1980; e *L. silvicola* d'Orbigny, 1836), restringindo assim o gênero *Tonatia* a duas espécies. A composição do gênero *Tonatia* por duas espécies foi igualmente proposta por PORTER *et al.* (2003) a partir de genes mitocondriais e um gene nuclear.

A espécie *Tonatia bidens* foi descrita por Spix, 1823 com localidade tipo no estado da Bahia (Brasil), enquanto a descrição de *T. saurophila* por Koopman e Williams, 1951 foi baseada em material fóssil de uma caverna na Jamaica. Anos depois, KOOPMAN (1976) realizou comparações entre esse fóssil e espécimes de *T. bidens* da América Central e da região norte da América do Sul, reconhecendo o fóssil como uma subespécie do táxon *T. bidens*. Até então, *Tonatia bidens* apresentava duas subespécies: *T. bidens saurophila* (conhecida apenas pelo fóssil) e *T. b. bidens* reportado em países da América Central e do Sul (Belize, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guatemala, Guianas, Honduras, Panamá, Peru e Venezuela), desconsiderando da análise representantes de *T. bidens* do nordeste e sul do Brasil (WILLIAMS *et al.*, 1995).

Análises taxonômicas recentes no gênero não foram realizadas desde o trabalho de WILLIAMS *et al.* (1995), no qual foram descritas as diferenças entre as duas espécies e entre as subespécies de *Tonatia saurophila*. Esses autores,

após examinarem por meio de caracteres morfológicos de crânio e dentição os espécimes de *T. bidens* da região sul da América do Sul (Argentina, Brasil e Paraguai), elevaram novamente a subespécie *T. b. saurophila* a *status* de espécie (*T. saurophila*). Dessa forma, as duas espécies ocorreriam em simpatria na região nordeste do Brasil (Figura 5). Ainda nesse trabalho, também foi proposto a separação de *T. saurophila* em três subespécies: *T. s. saurophila* (Jamaica – localidade tipo), *T. s. bakeri* e *T. s. maresi*. Desde então, o reconhecimento das subespécies de *T. saurophila* foi comumente aceito por décadas. Após a finalização do presente trabalho, BASANTES *et al.* (2020), por meio de integração de dados morfológicos, morfométricos e moleculares, apresentaram evidências que *T. s. bakeri* e *T. s. maresi* são espécies bem suportadas e distintas entre si e quando comparadas também com uma terceira espécie *T. s. saurophila* (táxon extinto, registros fósseis). Portanto, o gênero *Tonatia* agora inclui três espécies viventes (*T. bakeri*, *T. bidens* e *T. maresi*) e uma espécie extinta (*T. saurophila*).

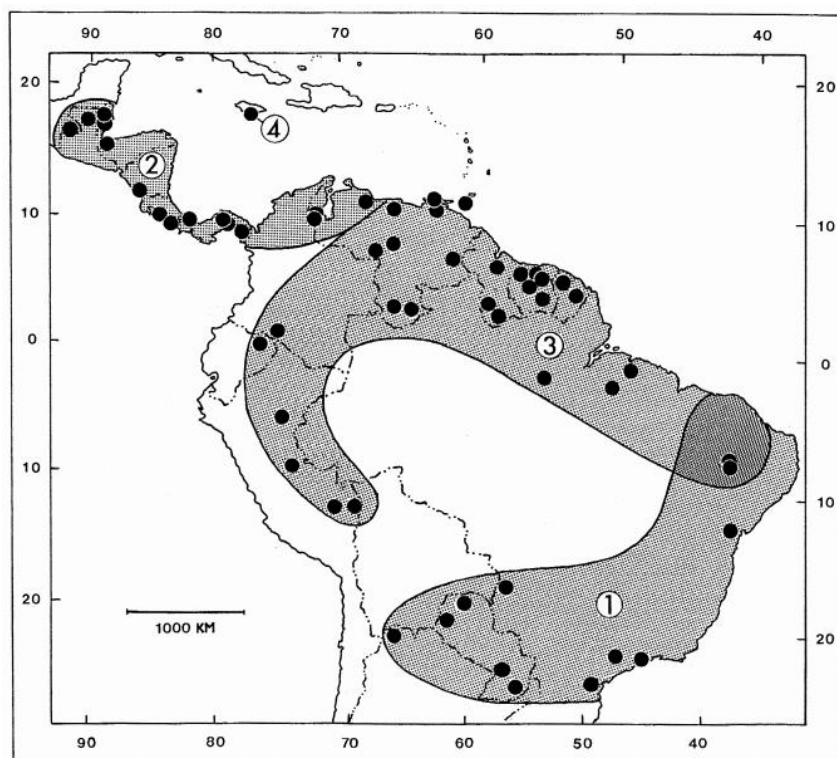


Figura 5. Mapa da América do Sul e Sudeste da América Central mostrando localidades de coleta e distribuição geográfica de *Tonatia bidens* (1) e *Tonatia saurophila* (2-4) [*T. s. bakeri* (2); *T. s. maresi* (3); *T. s. saurophila*(4)] (Fonte: WILLIAMS *et al.*, 1995)

A partir das análises de WILLIAMS *et al.* (1995), ficou determinado que *T. bidens* estava restrita ao nordeste e sul do Brasil, grande parte do Paraguai e norte da Argentina, enquanto *T. saurophila* estava presente no Caribe, América

Central, além de norte e nordeste da América do Sul (WILLIAMS *et al.*, 1995). Espécimes originalmente identificados como *T. bidens* em diversos trabalhos anteriores as considerações de WILLIAMS *et al.* (1995) foram reconhecidas como sendo de fato *T. saurophila* de acordo com a atualização de sua distribuição (BAKER, 1970; PATTON e BAKER, 1978; BAKER e BICKHAM, 1980).

Em termos de taxonomia, os representantes do gênero *Tonatia* são facilmente diferenciados dos demais filostomíneos por terem um único par de incisivos inferiores, três pares de pré-molares inferiores e uma cauda que se estende até aproximadamente a metade do comprimento do uropatágio (GARDNER, 2007). Entretanto, *Tonatia bidens* e *T. saurophila* apresentam alta similaridade morfológica entre si, principalmente externa, o que dificulta a delimitação taxonômica entre elas, resultando em identificações errôneas, particularmente nas regiões onde as espécies são simpátricas (WILLIAMS *et al.*, 1995; TAVARES *et al.*, 2015).

Tonatia bidens apresenta porte médio com pelagem marrom-acinzentada, mais clara no ventre, com hábito alimentar bastante variado, incluindo insetos, anfíbios, répteis, aves de pequeno porte e até mesmo morcegos (MARTUSCELLI, 1995; BARQUEZ *et al.*, 1999; ESBÉRARD e BERGALLO, 2004). Tem como localidade-tipo a região do rio São Francisco, no estado da Bahia, com distribuição desde o nordeste e sudeste do Brasil, norte da Argentina, oeste e sul do Paraguai e Bolívia (Figura 5) (WILLIAMS *et al.*, 1995; PACA *et al.*, 2012). A ausência de listra no topo da cabeça entre as orelhas pode ser útil na diferenciação por morfologia externa (WILLIAMS *et al.*, 1995) (Figura 6a). Caracteres diagnósticos utilizados para a espécie são: incisivos inferiores estreitos, caninos inferiores na margem medial separados por um pequeno espaço, segundo pré-molar inferior reduzido e largura média da constrição pós-orbital de 5.9 mm (WILLIAMS *et al.*, 1995) (Figura 6b).

Tonatia saurophila tem como localidade-tipo St. Elizabeth Parish, Jamaica, e está distribuída desde o sul do México (Chiapas), alguns países da América Central, até países do norte da América do Sul (Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname, Trindade, Venezuela, e norte-nordeste do Brasil) (Figura 5) (WILLIAMS *et al.*, 1995; REIS *et al.*, 2007; AGUIAR *et al.*, 2015). Esses morcegos apresentam ampla variedade de fontes alimentares como insetos, pequenos vertebrados e frutos (HUMPHREY *et al.*, 1983; REIS e PERACCHI,

1987; RIVAS-PAVA *et al.*, 1996; BERNARD, 2002; GIANNINI e KALKO, 2004). A espécie é caracterizada por possuir um espaço relativamente amplo entre os caninos inferiores, segundo pré-molar inferior maior, largura da constrição pós-orbital em média 5.4 mm, além da presença de uma linha clara de pelo curto no topo da cabeça (WILLIAMS *et al.*, 1995) (Figura 6 c-d).

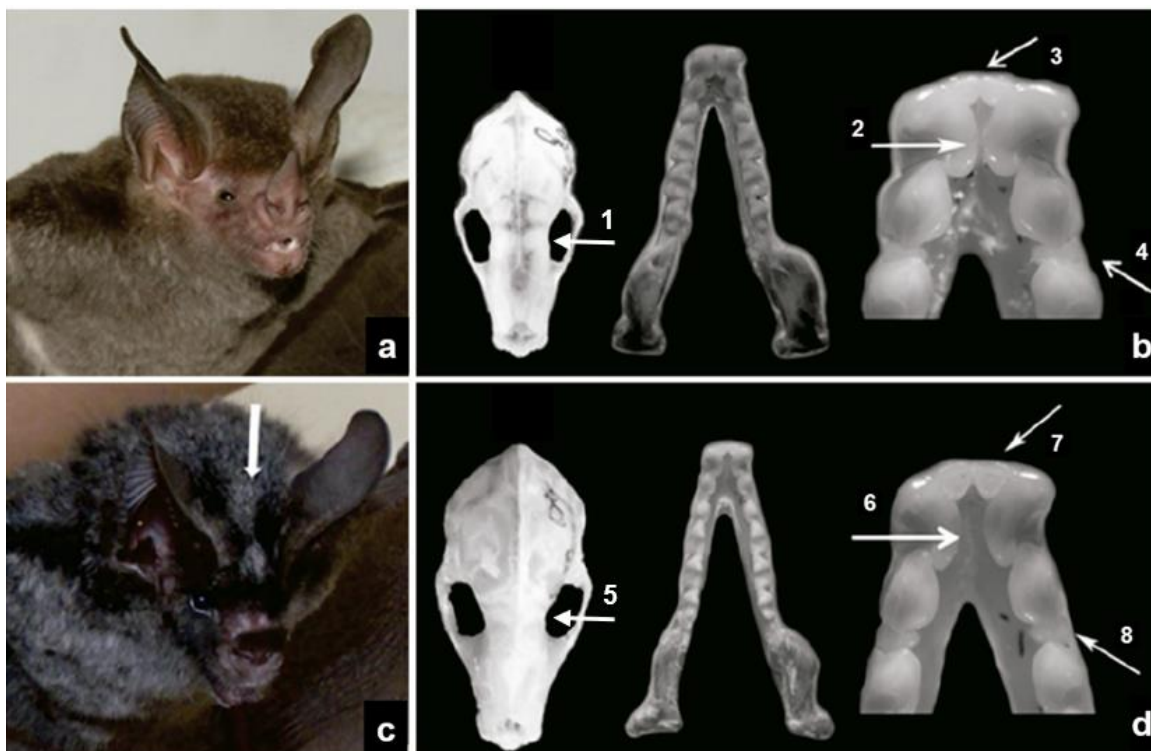


Figura 6. Espécies do gênero *Tonatia*. a) *Tonatia bidens*; b) Características morfológicas de crânio (esquerda), mandíbula (centro) e dentição inferior (direita) de *T. bidens*; 1. Constrição pós-orbital ampla; 2. Cíngulo dos caninos inferiores posicionados proximamente, se tocam ou quase se tocam; 3. Incisivos inferiores estreitos; 4. Segundo pré-molar reduzido pelo cíngulo dos pré-molares vizinhos; c) *Tonatia saurophila*, seta indica presença da listra branca e d) Características morfológicas de crânio (esquerda), mandíbula (centro) e dentição inferior (direita) de *T. saurophila*; 5. Constrição pós-orbital menos evidente; 6. Cíngulo dos caninos inferiores separados; 7. Incisivos inferiores relativamente amplos; 8. Segundo pré-molar mais robusto não obscurecido pelo cíngulo dos pré-molares adjacentes. (Fonte adaptada: TAVARES *et al.*, 2015).

Morcegos do gênero *Tonatia* são pouco amostrados na natureza e suas pesquisas se concentram em registros de algumas ocorrências das espécies, parasitismos e hábitos alimentares (ESBÉRARD e BERGALLO, 2004; PACA *et al.*, 2012; AGUIAR *et al.*, 2015). Do ponto de vista genético, poucos estudos foram realizados no gênero com enfoque para sistemática molecular (LEE-JR *et al.*, 2002; POTER *et al.*, 2003) e o genoma mitocondrial está disponível apenas para *T. saurophila* (BOTERO-CASTRO *et al.*, 2013). Contudo, o gênero tem sido amplamente investigado do ponto de vista citogenético, com maior destaque para

espécie *T. saurophila* (PATTON e BAKER, 1978; SANTOS *et al.*, 2002; SOTERO-CAIO *et al.*, 2015; RIBAS *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2015).

2.4 GENES MITOCONDRIAIS E SEU EMPREGO EM ESTUDOS FILOGENÉTICOS NA FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE

Uma das principais ferramentas para análises de diversidade genética são os marcadores moleculares. Dentre eles, os genes mitocondriais são amplamente utilizados em estudos de diversificação e filogenia molecular. Sequências de DNAm são empregadas em estudos para inferir as relações filogenéticas de diversos grupos de animais (BAKER *et al.*, 2016; BOTERO-CASTRO *et al.*, 2018; UPHAM *et al.*, 2019). Entre as características do DNAm, as principais para sua utilização como marcador molecular são: organização conservada em vertebrados, não possuem recombinação, herança exclusivamente ou prevalentemente materna, além de taxa evolutiva relativamente rápida (AVISE, 2004; GISSI *et al.*, 2008; LUO *et al.* 2018).

O genoma mitocondrial (mitogenoma) é organizado em 37 genes e em mamíferos geralmente possui de 15 a 20 Kb. O mitogenoma tipicamente está organizado em 13 genes codificadores de proteínas envolvidas na cadeia respiratória, duas subunidades de RNA ribossomal (RNAr), que codificam as subunidades: grande (*rnaL* 16S) e pequena do ribossomo mitocondrial (*rnaS* 12S), além de 22 RNAs e uma região não codificadora (região controle ou D-loop) envolvida na regulação da replicação e transcrição mitocondrial (Figura 7; ANDERSON *et al.*, 1981; ASIN-CAYUELA e GUSTAFSSON, 2007; GISSI *et al.*, 2008).

Dos 22 RNAs encontrados em mitogenomas, cada um tem especificidade para carregar um aminoácido distinto, exceto os aminoácidos leucina e serina que possuem duas cópias de RNA: *trnL* (TAG), *trnL2* (TAA), *trnS* (GCT) e *trnS2* (TGA). Os genes codificadores de proteínas pertencem ao complexo enzimático envolvido na fosforilação oxidativa: citocromo *b* (*cyt-b*); citocromo oxidase *c* subunidades I-III (*cox1-3*); NADH desidrogenase (*nad1-6*, *4L*) e as duas subunidades de ATP sintetase (*atp6* e *atp8*) (Figura 7; ANDERSON *et al.*, 1981).

Atualmente os morcegos da família Phyllostomidae são o grupo da ordem Chiroptera com maior amostragem de sequências depositadas em bancos de dados para uma região com cerca de 670 pb do gene citocromo *c* oxidase I,

gêneros *Lophostoma* (VELAZCO e CADENILLAS, 2011; CAMACHO *et al.*, 2016), *Platyrrhinus* (VELAZCO *et al.*, 2010) e *Lonchophylla* (PARLOS *et al.*, 2014) devido aos níveis de congruência em mamíferos (BAKER e BRADLEY, 2006).

Mitogenomas também têm sido usados em análises filogenéticas na família Phyllostomidae. Atualmente 20 genomas mitocondriais completos estão disponíveis na literatura para representantes das 11 subfamílias (PUMO *et al.*, 1998; MEGANATHAN *et al.*, 2012; BOTERO-CASTRO *et al.*, 2013, 2018). Os mitogenomas dos filostomídeos variam de 16.546 pb em *Anoura caudifer* Geoffroy, 1818 a 16.785 pb em *Brachyphylla cavernarum* Gray, 1834, ambas espécies da subfamília Glossophaginae. Análises filogenéticas a partir desses dados mostraram grandes similaridades com a topologia proposta por BAKER *et al.* (2003b), com exceção apenas na posição da subfamília Lonchorhininae como grupo irmão da subfamília Phyllostominae (BOTERO-CASTRO *et al.*, 2018), mesma condição observada em outras árvores com diferentes conjuntos de dados (DÁVALOS *et al.*, 2014; AMADOR *et al.*, 2018).

2.5 EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA NA FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE

Estudos de sistemática e filogenética em morcegos objetivam agrupar as linhagens taxonômicas com caracteres derivados compartilhados entre si, baseando-se em ancestralidade comum. Esses dados têm sido gerados a partir de diferentes abordagens, como análises morfológicas e por sequências de DNA nuclear ou mitocondrial (WETTERER *et al.*, 2000; BAKER *et al.*, 2003b; HOFFMANN *et al.*, 2008). No entanto, as hipóteses filogenéticas geradas a partir de um único conjunto de dados nem sempre esclarecem as relações entre os grupos taxonômicos ou apresentam baixos valores de suporte. Dessa forma, trabalhos mais robustos e com integração de dados podem ser utilizados para contornar essas situações e prover hipóteses de ancestralidade compartilhada para agrupamentos ambíguos (SOLARI *et al.*, 2019).

Dados citogenéticos se caracterizam como importantes marcadores filogenéticos para diversos grupos, tendo em vista que alterações cariotípicas, sejam elas estruturais ou numéricas, significam modificações no genoma da espécie, com implicações muitas vezes determinantes para o processo evolutivo (O'BRIEN *et al.*, 1999; ROKAS e HOLLAND, 2000). Os primeiros resultados de caracterização citogenética na família Phyllostomidae basearam-se na análise

convencional destacando o número diploide ($2n$), número de braços dos cromossomos autossômicos (NF), morfologia e sistema de determinação sexual, contribuindo para o entendimento da composição cromossômica dos representantes da família (BAKER, 1967; YONENAGA *et al.*, 1969). Posteriormente, com o surgimento de metodologias que possibilitaram a diferenciação longitudinal dos cromossomos, como os padrões de bandeamento G, a identificação de rearranjos cromossômicos e estudos comparativos tornaram-se possíveis (PATTON e BAKER, 1978; MORIELLE-VERSUTE *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 2005).

Um dos primeiros estudos realizados para o entendimento da evolução cromossômica entre Phyllostomidae e morcegos das famílias Mormoopidae e Noctilionidae, por análise de bandeamento G, foi o de PATTON e BAKER (1978). Esses autores propuseram um cariótipo com $2n = 46$ e NF = 60 como ancestral para a família Phyllostomidae, bem como para a superfamília Noctilionoidea, e apenas a espécie *Macrotus waterhousii* Gray, 1843 manteve essa condição.

A rápida diversificação e extrema variação morfológica e ecológica na família Phyllostomidae estão associadas a altas taxas de mudanças cromossômicas (BAKER e BICKHAM, 1980). As espécies da família Phyllostomidae apresentam número cromossômico variando de $2n = 14$ em *Vampyressa melissa* a $2n = 46$ em *Macrotus waterhousii*, com NF variando de 20 a 68 (BAKER, 1979). Em diversos representantes da família, a fórmula cariotípica mais comumente encontrada apresenta $2n = 32$ e NF = 56. Para as 11 subfamílias de Phyllostomidae, os dados citogenéticos atuais estão organizados na Tabela 2.

Em Phyllostomidae, os padrões cariotípicos parecem estar associados a redução do número diploide e de bandas cromossômicas, principalmente por rearranjos Robertsonianos, com retenção dos grupos de ligação (PATTON e BAKER 1978). Por esse motivo, estudos de evolução cromossômica em espécies de morcegos têm revelado homologias de cromossomos ou de braços cromossômicos inteiros em espécies das subfamílias Phyllostominae (RODRIGUES *et al.*, 2000; RIBAS *et al.*, 2015; SOTERO-CAIO *et al.*, 2015), Stenodermatinae (RIBEIRO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005, PIECZARKA *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2016) e Desmodontinae (VARELLA-GARCIA *et al.*, 1989; SANTOS *et al.*, 2001; SOTERO-CAIO *et al.*, 2011).

Por outro lado, segundo BAKER e BICKHAM (1980), as mudanças cromossômicas em morcegos não ocorrem de maneira constante, de forma que algumas linhagens apresentam mudanças mais rápidas e consideráveis, enquanto outras, denotam uma taxa lenta de evolução cromossômica. Assim, três categorias foram adequadas para explicar os padrões de evolução cariotípica em morcegos: conservadorismo cariotípico, evolução cromossômica moderada (ortoseleção cariotípica) e megaevolução cariotípica.

Tabela 2. Subfamílias de Phyllostomidae e número de espécies caracterizadas citogeneticamente.

Subfamília	2n	NF	N	Conv.	Banda G	ZOO-FISH	Fonte
Macrotinae	40-46	60	2	2	2	1	1 e 2
Micronycterinae	25-42	50-68	12	5	4	4	3-5 e 20
Desmodontinae	28-32	52-60	3	3	3	3	6 e 7
Lonchorhininae	32	60	6	1	1	–	8
Phyllostominae	16-34	20-62	24	19	12	6	2,4 e 9-12
Glossophaginae	16-32	24-60	37	13	13	2	1,4,11,13 e 14
Lonchophyllinae	28-36	34-50	20	6	3	1	1 e 3
Carollinae	20-22	36-38	8	4	4	1	1,4,10 e 11
Glyphonycterinae	22-28	40-52	5	3	1	1	3 e 15
Rhinophyllinae	26-38	48-62	3	2	2	2	1, 15 e 16
Stenodermatinae	14-44	18-62	98	48	29	8	4 e 17-19
Total	14-46	18-68	218	106	74	29	

Nota: **N:** número de espécies de acordo com SILES e RIOS (2019) **Conv.:** número de espécies com 2n descrito por coloração convencional. A compilação de fontes foi realizada pela busca preferencial de dados referentes a bandeamento G e hibridização *in situ* com sondas de cromossomos inteiros (ZOO-FISH). Fonte: 1. BAKER, (1979); 2. SOTERO-CAIO *et al.* (2015); 3. PATTON e BAKER (1978); 4. BAKER (1967); 5. RIBAS *et al.* (2013); 6. SOTERO-CAIO *et al.* (2011); 7. SANTOS *et al.* (2001); 8. BARROS *et al.* (2009); 9. RIBAS *et al.* (2015); 10. Pleczarka *et al.* (2005); 11. VARELLA-GARCIA *et al.* (1989); 12. BAKER *et al.* (1982); 13. SOTERO-CAIO *et al.* (2013); 14. VOLLETH *et al.* (1999); 15. GOMES *et al.* (2018); 16. GOMES *et al.* (2012); 17. BAKER e HSU (1970); 18. PIECZARKA *et al.* (2013); 19. GOMES *et al.* (2016); 20. BENATHAR *et al.*, (2019).

A maioria dos morcegos filostomídeos apresenta cariótipos conservados ao nível de gênero, com taxas de evolução cromossômica baixas, que diferem por poucos ou nenhum rearranjo após sua formação. O gênero *Artibeus* (2n = 30/31) é um exemplo desse conservadorismo intragenérico, com praticamente nenhuma variação no padrão de bandeamento G entre suas 23 espécies. No entanto, linhagens taxonômicas que evoluíram por ortoseleção cariotípica, (WHITE, 1975), como o gênero *Uroderma* (2n = 36-44), frequentemente diferem por poucos rearranjos quando comparados a espécies relacionadas, mas sem grandes taxas

de variações nos tipos de rearranjos (baixo a moderado) (SILVA *et al.*, 2005; PIECZARKA *et al.*, 2013).

Por outro lado, outros gêneros demonstram uma extrema variabilidade cariotípica interespecífica, como *Micronycteris* ($2n = 25-42$) (RIBAS *et al.*, 2013; BENATHAR *et al.*, 2019) e *Vampyressa* ($2n = 14-24$) (GOMES *et al.*, 2016), ou apresentam pouca variação no gênero, mas possuem cariótipos extremamente rearranjados quando comparados aos cariótipos ancestrais para suas respectivas subfamílias, como é o caso do gênero *Tonatia* ($2n=16$) (RIBAS *et al.*, 2015; SOTERO-CAIO *et al.*, 2015). Assim, essas linhagens que sofreram uma megaevolução cromossômica e os cariótipos das espécies intimamente relacionadas podem ser tão diferentes que as homologias de bandas não podem ser determinadas apenas com o bandeamento G. Nesse caso, a utilização de bandas G como marcadores/caracteres filogenéticos é recomendada apenas em espécies filogeneticamente mais próximas ou com cariótipos distinguíveis por poucos rearranjos cromossômicos (RODRIGUES *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2012).

Em estudos de evolução cromossômica onde a comparação de bandas G não consegue detectar homologias interespecíficas, principalmente em espécies com altas taxas de rearranjos, a técnica de pintura cromossômica apresenta vantagens. Essa técnica possibilita a detecção de homologias cromossômicas baseadas em sequências de DNA conservadas de cromossomos inteiros ou de regiões cromossômicas, apresentando maior precisão na inferência dos rearranjos cromossômicos (YANG *et al.*, 1995; FERGUSON-SMITH *et al.*, 1998; O'BRIEN *et al.*, 1999).

Na pintura cromossômica, uma variante denominada ZOO-FISH aperfeiçoada por SCHERTHAN *et al.* (1994), é usada para estudos comparativos entre cromossomos de espécies diferentes, evidenciando rearranjos que moldaram a arquitetura cromossômica ao longo da divergência das espécies e fornecendo um mapa citogenético. Os primeiros estudos de ZOO-FISH foram realizados utilizando sondas cromossomo-específicas de humanos em diferentes espécies de primatas (WIENBERG *et al.*, 1990).

ZOO-FISH muitas vezes é complementar ao bandeamento cromossômico, fornecendo resultados mais precisos, garantindo a identificação dos rearranjos ocorridos, embora com limitações para inversões. As hibridizações *in situ* de

cromossomos totais de uma espécie podem detectar homologias em apenas um cromossomo, no qual a presença física de grandes regiões cromossômicas contendo genes são detectados em ambas as espécies sendo denominadas sintênicas (YONENAGA-YASSUDA, 2004). A presença de cromossomos conservados (ou mais especificamente, seu compartilhamento) é um forte indicativo da ocorrência dos mesmos no cariótipo ancestral das linhagens (FERGUSON-SMITH e TRIFONOV, 2007).

Por outro lado, algumas espécies apresentam sinais de hibridização em diferentes cromossomos ou segmentos cromossômicos, indicando a ocorrência de rearranjos entre cromossomos distintos durante o processo de diferenciação das espécies. Normalmente, um menor número de rearranjos cromossômicos é observado entre espécies mais relacionadas entre si, tornando a ZOO-FISH uma importante ferramenta na reconstrução filogenética entre diferentes grupos a partir da reconstrução da evolução cromossômica (FERGUSON-SMITH *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2006). Além disso, a pintura cromossômica contribui na identificação das taxas de mudanças da arquitetura cromossômica, possibilitando a correlação entre as mudanças genômicas com os padrões de diversificação das espécies. (RIBAS *et al.*, 2013; SOTERO-CAIO *et al.*, 2015).

Na família Phyllostomidae estudos de citogenética comparativa por FISH (ZOO-FISH) têm sido realizados utilizando sondas de cromossomos inteiros de três espécies: *Phyllostomus hastatus* Pallas, 1766 (Phyllostominae), *Carollia brevicauda* Schinz, 1821 (Carollinae) (PIECZARKA *et al.*, 2005) e *Macrotus californicus* (Macrochinae) (SOTERO-CAIO *et al.*, 2013). Até o momento, dados de pintura cromossômica estão disponíveis para 29 espécies, representantes de 10 das 11 subfamílias, (dados de pintura são inexistentes apenas para espécies da subfamília Lonchorhininae), com o propósito de contribuir para a reconstrução do caminho evolutivo das espécies bem como os eventos de rearranjos cromossômicos na família Phyllostomidae (Tabela 2) (PIECZARKA *et al.*, 2005, 2013; SOTERO-CAIO *et al.*, 2011, 2013, 2015; RIBAS *et al.*, 2013, 2015; GOMES *et al.*, 2016, 2018; BENATHAR *et al.*, 2019).

2.5.1 Subfamília Phyllostominae (*sensu* BAKER *et al.*, 2016)

Na subfamília Phyllostominae praticamente todas as espécies foram investigadas através das diversas técnicas citogenéticas clássicas. Dentre

espécies congêneras, a maioria apresenta poucas variações cariotípicas, entretanto, a subfamília também possui espécies com altas taxas de rearranjos cromossômicos quando comparadas ao cariótipo ancestral da subfamília (PATTON e BAKER, 1978; BAKER e BICKHAM, 1980; RODRIGUES *et al.*, 2000). Estudos citogenéticos por meio de análises convencionais e de bandeamentos, resumidos na Tabela 3, revelaram uma variação dentro da subfamília de $2n = 16$ em *Tonatia saurophila* a $2n = 34$ em representantes do gênero *Lophostoma* (BAKER, 1979; TUCKER e BICKHAM, 1986; BAKER *et al.*, 2004; SOTERO-CAIO *et al.*, 2015).

Tabela 3. Dados citogenéticos para a subfamília Phyllostominae.

Espécies	2n	NF	Técnicas	Fonte
Tribo Macrophyllini				
<i>Macrophyllum macrophyllum</i>	32	56	Conv.	1
<i>Trachops cirrhosus</i>	30	56	G, C, RON e FISH	2-4
Tribo Phyllostomini				
<i>Gardnerycteris crenulatum</i>	32	60	G e ZOO-FISH (MCA)	5
<i>G. keenani</i>	-	-	-	-
<i>G. koepckeae</i>	32	60	Conv.	2
<i>Lophostoma brasiliense</i>	30	56	G e C	1 e 6
<i>L. carrikeri</i>	26	46	Conv.	7
<i>L. kalkoae</i>	-	-	-	-
<i>L. aequatorialis</i>	34	62	G e ZOO-FISH (MCA)	5 e 8
<i>L. silviculum</i>	34	60	G e ZOO-FISH (CBR e PHA)	6, 8 e 10
<i>L. schulzi</i>	28	36	G e C	1, 9 e 18
<i>L. evotis</i>	-	-	-	-
<i>Tonatia bidens*</i>	16/26	20/38	C, RON e FISH	3 e 11
<i>T. saurophila**</i>	16	20/22	G, C, RON e ZOO-FISH (MCA, CBR e PHA)	5, 10 e 12
<i>Phylloderma stenops</i>	32	58	RON e FISH	1-3 e 6
<i>Phyllostomus discolor</i>	32	60	G e ZOO-FISH (PHA)	3, 10 e 13-15
<i>P. elongatus</i>	32	58	Conv. RON e FISH	3 e 16
<i>P. hastatus</i>	32	58	G e ZOO-FISH (CBR)	14-15 e 17
<i>P. latifolius</i>	32	58	Conv.	18
Tribo Vampyrini				
<i>Chrotopterus auritus</i>	28	52	G, C e RON	15 e 19
<i>Mimon bennettii</i>	30	56	G	7
<i>M. cozumelae</i>	34	60	Conv.	2
<i>Vampyrum spectrum</i>	30	56	Conv.	6 e 2

Nota: **Conv.**: coloração convencional; **G**: bandeamento G; **C**: bandeamento C; **RON**: Impregnação de nitrato de prata na identificação de Região Organizadora de Nucléolo; **FISH**: telomérica e/ou DNAr. **ZOO-FISH**: Sondas utilizadas em parênteses: *Carollia brevicauda* (CBR), *Macrotus californicus* (MCA) e *Phyllostomus hastatus* (PHA). * A espécie *T. bidens* apresenta dois citótipos descritos na literatura $2n = 16$ NF = 20 e $2n = 26$ NF = 38; ** *T. saurophila* com $2n = 16$ NF = 22 por inversão pericêntrica do par 4. **Fonte**: 1. BAKER *et al.* (1982); 2. BAKER (1979); 3. SANTOS *et al.* (2002); 4. BARROS *et al.* (2009); 5. SOTERO-CAIO *et al.* (2015); 6. BAKER E HSU (1970); 7. BAKER *et al.* (1981); 8. BAKER *et al.* (2004); 9. GENOWAYS E WILLIAMS (1980); 10. RIBAS *et al.* (2015); 11. TAVARES *et al.* (2015); 12. BAKER (1970); 13. PATTON e BAKER (1978); 14. RODRIGUES *et al.* (2000); 15. YONENAGA *et al.* (1969); 16. BAKER e BICKHAM (1980); 17. PIECZARKA *et al.* (2005); 18. HONEYCUTT *et al.* (1980); 19. MORIELLE-VERSUTE *et al.* (1992).

A tribo Macrophyllini constituída apenas por duas espécies de gêneros distintos, *Macrophyllum macrophyllum* Schinz, 1821 ($2n = 30$ NF = 56) e *Trachops cirrhosus* Spix, 1823 ($2n = 30$ NF = 56), são pouco caracterizadas citogeneticamente. Análises convencionais foram realizadas para as duas espécies (BAKER *et al.*, 1982), técnicas de bandeamento e FISH com sondas de DNAr 18S apenas para *T. cirrhosus* (SANTOS *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2009), sendo possível identificar algumas homologias com os cromossomos de *Macrotus waterhousii* a partir de bandas G (BARROS *et al.*, 2009). A tribo Vampyrini composta pelos gêneros *Mimon*, *Chrotopterus* e *Vampyrum*, com apenas cinco espécies, apresenta variação cromossômica de $2n = 28-34$ (Tabela 3) (BAKER e HSU, 1970; BAKER, 1979; BAKER *et al.*, 1981; YONENAGA *et al.*, 1969; MORIELLE-VERSUTE *et al.*, 1992).

Com relação a tribo Phyllostomini formada pelos gêneros: *Gardnerycteris*, *Lophostoma*, *Tonatia*, *Phylloderma* e *Phyllostomus*, dados citogenéticos são relativamente bem relatados com emprego de diversas técnicas, exceto para uma espécie do gênero *Gardnerycteris* (*G. keenani* Hurtado e D'Elía, 2018) e duas espécies do gênero *Lophostoma* que não possuem dados citogenéticos descritos na literatura (*Lophostoma kalkoae* Velazco e Gardner, 2012 e *L. evotis* Davis e Carter, 1978). A tribo apresenta número cromossômico variando de $2n = 16-34$, com o gênero *Lophostoma*, representado por sete espécies, apresentando maior variação de número diploide (Tabela 3) (BAKER e HSU, 1970; BAKER *et al.*, 1982; BAKER *et al.*, 2004).

Mesmo apresentando espécies com grandes similaridades cromossômicas, a subfamília Phyllostominae apresenta linhagens com taxas de evolução cromossômica distintas. Na tribo Phyllostomini, por exemplo, é possível observar a presença de conservadorismo cromossômico entre os gêneros *Gardnerycteris*, *Phylloderma*, *Phyllostomus* e em algumas espécies de *Lophostoma*, até altos níveis de rearranjos encontrados em *Tonatia saurophila* evidenciados a partir de bandas G e ZOO-FISH (PATTON e BAKER, 1978; BAKER e BICKHAM, 1980; RIBAS *et al.*, 2015; SOTERO-CAIO *et al.*, 2015).

Dados citogenéticos para o gênero *Tonatia* foram primeiro descritos para espécimes identificados como *T. bidens* com número cromossômico $2n = 16$ e NF = 20 na América Central e norte da América do Sul (BAKER, 1970; BAKER e HSU, 1970; PATTON e BAKER, 1978; BAKER e BICKHAM, 1980). Contudo, após

as considerações taxonômicas propostas por WILLIAMS *et al.* (1995), todos os espécimes estudados foram reidentificados como *T. saurophila*. A primeira descrição cariotípica para *T. bidens* em seu local de ocorrência, após WILLIAMS *et al.* (1995), foi realizada por SANTOS *et al.* (2002) que analisaram um espécime com $2n = 16$ e $NF = 20$, no estado de Pernambuco, pela impregnação com nitrato de prata ($AgNO_3$) e FISH com DNAr 18S. Historicamente para os pesquisadores, as duas espécies do gênero compartilhavam a mesma fórmula cariotípica. No entanto, as duas espécies descritas para o gênero são simpátricas na região Nordeste do Brasil e ainda é incerto se o cariótipo descrito para a região corresponde a *T. bidens* ou *T. saurophila*.

Atualmente, existem descrições cariotípicas para a espécie *T. saurophila* com $2n = 16$ e $NF = 20$ para espécimes provenientes da região norte e centro-oeste do Brasil (RIBAS *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2015), além de $2n = 16$ com $NF=22$ na Costa Rica e Equador, o qual diferia dos demais por uma inversão pericêntrica no par cromossômico 4 (SOTERO-CAIO *et al.*, 2015). Esses dados são semelhantes aos descritos para a espécie nas décadas de 70 e 80 (BAKER, 1970; BAKER e HSU, 1970; PATTON e BAKER, 1978; BAKER e BICKHAM, 1980). Em contrapartida, um cariótipo com $2n = 26$ e $NF = 38$ foi descrito por TAVARES *et al.* (2015) para espécimes identificados como *T. bidens* na região centro-oeste do Brasil, caracterizados morfológicamente, por análise de citogenética convencional, bandeamento C e pelo sequenciamento do gene *COI*, esse último, em apenas um espécime. A conexão da amostra cariotípica com o marcador molecular foi bem-sucedida na ligação do cariótipo ao gênero. Contudo, o *barcode* desse espécime não pôde ser diretamente associado a espécie *T. bidens*, devido à ausência de outras sequências deste gene para a espécie disponíveis em bancos de dados.

Na família Phyllostomidae as sequências de genes mitocondriais mais comumente utilizadas e disponíveis para *T. bidens* estão representadas por outros marcadores, como o gene RNAr 12S e 16S, e o *cyt-b*. Dessa forma, apesar de forte indicação, como nenhuma dessas sequências foram utilizadas no trabalho de TAVARES *et al.* (2015) para uma comparação com diferentes sequências disponíveis, não foi possível definir se o espécime investigado representava uma nova linhagem para o gênero ou se realmente correspondia a *T. bidens*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar citogeneticamente e filogeneticamente espécimes de *Tonatia bidens*, relacionando as características encontradas com as de outros representantes do gênero e da subfamília Phyllostominae e contextualizar os dados obtidos com a evolução cromossômica e sistemática da família Phyllostomidae.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o cariótipo de *T. bidens* considerando número e morfologia cromossômica;
2. Identificar rearranjos na arquitetura cromossômica de *T. bidens* em comparação a *Macrotus californicus* através da pintura cromossômica, e comparar com dados de outros representantes da família Phyllostomidae;
3. Caracterizar o genoma mitocondrial de *T. bidens*;
4. Fazer análises filogenéticas utilizando dados de marcadores mitocondriais e amostras do gênero *Tonatia* (*bidens* e *saurophila*) e outros filostomíneos, a fim de testar a identidade atribuída aos *T. bidens* de cariótipos incomuns;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM

Um espécime macho morfologicamente identificado como *Tonatia bidens* Spix, 1823, coletado durante uma expedição no Parque Estadual Pedra da Boca no município de Araruna no estado da Paraíba, nordeste do Brasil (6° 27' 32.2"S, 35° 40' 45.4" W) em 2004, foi utilizado para análises citogenéticas e sequenciamento de genoma mitocondrial. A captura do exemplar, com auxílio de redes de neblina "*mist nets*", foi realizada nas proximidades de uma caverna do parque, utilizando licença do IBAMA número 12264-1. O espécime foi depositado na Coleção de Mamíferos do Departamento de Sistemática e Ecologia, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Sequências disponíveis no GenBank foram utilizadas nas análises filogenéticas para representantes do gênero *Tonatia* e outros filostomídeos, 46 sequências do gene COI, 31 do gene *cyt-b* e 21 do fragmento RNAr 12S-16S e RNAt^{Val}, cujo números de acessos estão listados nos Apêndice A e B. Além disso, dados citogenéticos para representantes do gênero *Tonatia* foram compilados a partir de literatura disponível e integrados às análises comparativas.

4.2 ANÁLISE CITOGENÉTICA: PREPARAÇÃO CROMOSSÔMICA E CITOGENÉTICA CLÁSSICA

4.2.1 Coloração Convencional

A técnica de extração direta de medula óssea foi usada para obtenção das preparações cromossômicas (BAKER *et al.*, 2003a), o material em suspensão fixado está depositado no Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH) da UFPE, sob número de identificação M829. Lâminas das preparações cromossômicas foram coradas através de solução de Giemsa 5% por 7 min. Os cromossomos foram caracterizados de acordo com sua morfologia e organizados de forma decrescente de tamanho. A análise cromossômica foi realizada em microscopia óptica (Olympus CX21FS1) em campo claro e com objetivas de imersão (100x).

4.2.2 Impregnação com nitrato de prata (AgNO_3)

A impregnação com nitrato de prata (AgNO_3), técnica para detecção de ribonucleoproteínas, que permite localizar a Região Organizadora de Nucléolo (RON), seguiu o procedimento de HOWELL e BLACK (1980). Nas lâminas foi utilizada uma gota de solução de gelatina 2% (Gelatina em pó (Vetec) em H_2O + ácido fórmico) juntamente com duas gotas de solução de nitrato de prata a 50% em água. Após cobertas com lamínulas, as lâminas foram mantidas em câmara úmida a 70 °C, durante 3 a 5 min, lavadas com água e após secas, analisadas por microscopia óptica em campo claro.

4.3 PINTURA CROMOSSÔMICA UTILIZANDO SONDAS DE *Macrotus californicus* (MCA)

Sondas cromossomo-específicas de *Macrotus californicus* (MCA) ($2n = 40$, XY) foram obtidas por SOTERO-CAIO *et al.* (2013), através de separação por citometria de fluxo e marcadas por reação em cadeia da polimerase com oligonucleotídeos degenerados (DOP-PCR), totalizando 19 sondas de cromossomos autossômicos e dos cromossomos X e Y separadamente. A pintura cromossômica usando sondas cromossômicas totais de MCA seguiu os protocolos descritos por YANG *et al.* (1995) e VOLLETH *et al.* (2002) com algumas modificações detalhadas em SOTERO-CAIO *et al.* (2013). No presente trabalho, foram utilizadas 15 das 21 sondas de forma que as sondas correspondentes aos cromossomos MCA Y, 3, 5, 8, 10 e 19 não foram utilizadas nas hibridizações.

Em detalhe, as lâminas com preparações cromossômicas foram submetidas a um pré-tratamento em pepsina 0,005% em HCl 0,01M por 1 – 1 min 30 s a 37 °C e a uma série de etanol em temperatura ambiente (70, 85 e 100%, por 3 min cada). Em seguida, foram desnaturadas em uma solução de 70% formamida / 30% 2XSSC a 75 °C por 7-8 min e submetidas a uma série gelada de etanol. As misturas de hibridização foram preparadas usando 0,8 – 1,34 μL de sonda em 2,2 – 3,66 μL de solução de hibridização, de acordo com a área da lamínula (15x15 mm^2 e 18x18 mm^2 , respectivamente); para experimentos com dupla sonda, 1,34 μL de cada produto de DOP-PCR foram coprecipitados e ressuspendidos em 4 μL de solução de hibridização (1 ml Formamida [Sigma]; 400 μL 50% Dextran sulfato;

200 µL 20XSSC em 400 µL H₂O Mili-Q). As sondas em mistura de hibridização foram desnaturadas a 75 °C por 7 min e posteriormente aplicadas nas lâminas. A etapa de hibridização ocorreu a 37 °C durante um período de 72 h em câmara úmida.

Para a remoção de marcações inespecíficas, após a hibridização, as lâminas foram lavadas em 1XSSC a 75 °C por 2 min, seguidas de lavagem em 2XSSC a temperatura ambiente pelo mesmo tempo. As lâminas foram incubadas em solução bloqueadora 1X (Vector laboratories) por 20 min a 37 °C. As detecções foram realizadas usando Estreptavidina-FITC (1:500, Amersham Biosciences) e Anti-Digoxigenina-Rodamina (1:200, Roche Applied Science) intercaladas com etapas de lavagem em 4XSSCT (por três vezes; 4 min cada) e uma lavagem em 4XSSC (3 min) a 37 °C. Todas as lâminas foram tratadas com Actinomicina D (AMD) e contracoradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) e montadas com Vectashield (Vector laboratories). Os resultados foram visualizados a partir de um microscópio Leica DMLB 5500B conectado a um sistema de fluorescência e acoplados a uma câmera. Os sinais das hibridizações e DAPI foram detectados a partir de diferentes filtros. As imagens das células capturadas pelo software Leica Las-AF foram ajustadas quanto ao brilho e contraste no Adobe Photoshop CS5 e os ideogramas montados no Inkscape 0.92.

A escolha da sonda de MCA se deu pela hipótese vigente de que o cariótipo do gênero *Macrotus* se apresenta próximo ao proposto como ancestral para a família Phyllostomidae (*Macrotus waterhousii*, MWA, 2n = 46, XY; NF = 60), que difere apenas por três fusões cêtricas do cariótipo de MWA) (PATTON e BAKER, 1978; BAKER e BICKHAM, 1980). Portanto, a cada hibridização foi possível a visualização imediata dos rearranjos cromossômicos, e qualquer variação ou quebra de homologia das sondas de MCA representou evidência de que rearranjos ocorreram na diferenciação do cariótipo ancestral.

4.3.1 Análise dos dados de ZOO-FISH

Com base no tamanho, morfologia e padrões de bandas AMD/DAPI dos cromossomos, os sinais de hibridização foram atribuídos a cromossomos específicos ou a regiões cromossômicas. O contraste desse mesmo padrão de

bandas foi aprimorado no programa Adobe Photoshop CS5 e usado na análise de dados, identificação e numeração dos cromossomos.

4.4 ANÁLISE MOLECULAR: CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA, EXTRAÇÃO DO DNA E SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

A extração de DNA genômico do espécime de *Tonatia bidens* (M829) foi realizada a partir do material em suspensão fixado utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). A retirada de fixador da amostra foi realizada através de duas lavagens em 1XPBS (Life Technologies, pH 7,4) por 20 minutos cada e posteriormente seguimos o protocolo para sangue sugerido pelo fabricante do kit. A concentração de DNA foi determinada em um NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) e a qualidade do DNA extraído visualizada por gel de agarose a 1%.

O sequenciamento genômico *shotgun* foi obtido na plataforma Illumina NextSeq 500 para o espécime (M829). Aproximadamente 1 ng do DNA extraído foi utilizado para a preparação das bibliotecas com o kit Nextera DNA Flex Library Prep (Illumina), conforme as instruções do fabricante. Em seguida, as corridas de sequenciamento foram realizadas com o kit NextSeq 500 v2 High-output (Illumina), com 300 ciclos (2x 150 pb).

4.4.1 Montagem e caracterização do mitogenoma de *T. bidens*

O mitogenoma foi montado utilizando o programa NovoPlasty 3.6 (DIERCKXSENS *et al.*, 2017), empregando os parâmetros recomendados para montagem com *reads* Illumina *paired-end*. Posteriormente, o mitogenoma foi anotado no MITOS 2 (BERNT *et al.*, 2013), passando por checagens manuais adicionais no Geneious Prime 2020.0.3 (Biomatters) utilizando o genoma mitocondrial de *Tonatia saurophila* (NC_022426) como referência.

A visualização da organização dos genes no mitogenoma de *T. bidens* foi realizada utilizando a plataforma OGDRAW versão 1.3.1 (GREINER *et al.*, 2019), enquanto sua composição de bases e *codon usage* foi acessada com o programa Geneious Prime 2020.0.3. Análises de estruturas secundárias dos genes de RNAs foram feitas no tRNAscan-SE 1.21 (CHAN e LOWE, 2019) e confirmadas no MITOS 2 (BERNT *et al.*, 2013). As estimativas de viés A+T e G+C foram calculadas usando as fórmulas $AT = (A - T) / (A + T)$ e $GC = (G - C) / (G + C)$ (PERNA e KOCHER 1995).

4.4.2 Análises Filogenéticas

- **DNA *barcode***

As sequências do gene *COI* (sigla sinônima *cox1*) utilizadas para a reconstrução filogenética, com números de acesso listados na Tabela 7 (Apêndice A), foram as mesmas usadas por TAVARES *et al.* (2015). A escolha desse grupo de dados objetivou facilitar a comparação e delimitação da posição taxonômica do espécime de *T. bidens* (M829) em meio a outros filostomíneos, estabelecendo ao mesmo tempo uma conexão com o espécime *T. cf. bidens* (2n = 26 NF = 38) analisado por TAVARES *et al.* (2015). As sequências foram alinhadas no MUSCLE (EDGAR, 2004) incorporado ao pacote MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018). Posteriormente o melhor modelo evolutivo foi escolhido no MEGA X para o método de *Maximum Likelihood* (ML) e a construção da árvore foi realizada usando o modelo evolutivo GTR+G+I, com 1000 réplicas de *bootstrap*.

- **Genes *cyt-b* e RNAr 12S-16S - RNAt^{Val}**

Reconstruções filogenéticas com sequências de vários genes mitocondriais foram realizadas para delimitar a posição taxonômica do espécime de *T. bidens* (M829) em comparação a outros representantes do gênero *Tonatia*. Em nossas análises incorporamos as sequências do gene *cyt-b* obtidas por HOFFMANN *et al.* (2008) e VELAZCO e CADENILLAS (2011). Para o fragmento concatenado dos genes RNAr 12S-16S – RNAt^{Val} incorporamos as sequências obtidas por LEE *et al.* (2002), BAKER *et al.* (2003b) e PORTER *et al.* (2003). As construções das filogenias incluíram sequências de outros representantes da subfamília Phyllostominae e de Desmodontinae como grupo externo. Sequências e respectivos números de acesso estão listados na Tabela 8 (Apêndice B).

Três matrizes de alinhamentos foram construídas: (1) todos os *cyt-b*, RNAr e RNAt^{Val} concatenados; (2) apenas sequências do gene *cyt-b*; e (3) apenas sequências de RNA (RNAr 12S-16S – RNAt^{Val}) concatenadas. Para a primeira matriz combinamos as sequências de indivíduos diferentes da mesma espécie devido à ausência de dados para o mesmo indivíduo na maioria dos táxons, como realizado por HOFFMANN *et al.* (2008). As sequências foram alinhadas no MUSCLE no pacote MEGA X. Posteriormente foram avaliadas as distâncias

genéticas (*p-distance*) no pacote MEGA X para a matriz de dados formada pelo gene *cyt-b*. Com base nos alinhamentos, foram construídas as árvores por meio do método ML. Selecionamos o melhor modelo de substituição de nucleotídeos com base no *Akaike Information Criterion* (AIC) (AKAIKE, 1974), no pacote MEGA X. Realizamos as análises no mesmo programa com modelo evolutivo GTR+G para a primeira matriz de dados e GTR+G+I nas matrizes seguintes. Os valores de suporte foram calculados a partir de 1000 réplicas (*bootstrap*) para as três matrizes de alinhamento.

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA DE *Tonatia bidens* (TBI)

Citogenética clássica

Tonatia bidens (M829) apresentou um cariótipo $2n = 25,XY$ e número fundamental $NF = 38$, com sete cromossomos metacêntricos (pares 6, 10 e 11; rob(2;3)), quatro submetacêntricos (pares 4 e 8), quatro subtelocêntricos (pares 1 e 9) e oito acrocêntricos (2 e 3; pares 5, 7 e 12) (Figura 8a). O sistema de determinação sexual é do tipo simples, com o cromossomo X subtelocêntrico pequeno e o cromossomo Y acrocêntrico diminuto (Figura 8a). O espécime possui um grande cromossomo metacêntrico sem par, cuja origem foi confirmada em seguida pela ZOO-FISH, como sendo um rearranjo de translocação Robertsoniana entre os cromossomos 2 e 3. A impregnação com o nitrato de prata revelou a Região Organizadora de Nucléolo (RON) na porção distal do braço longo do par acrocêntrico 12 (Figura 8b).

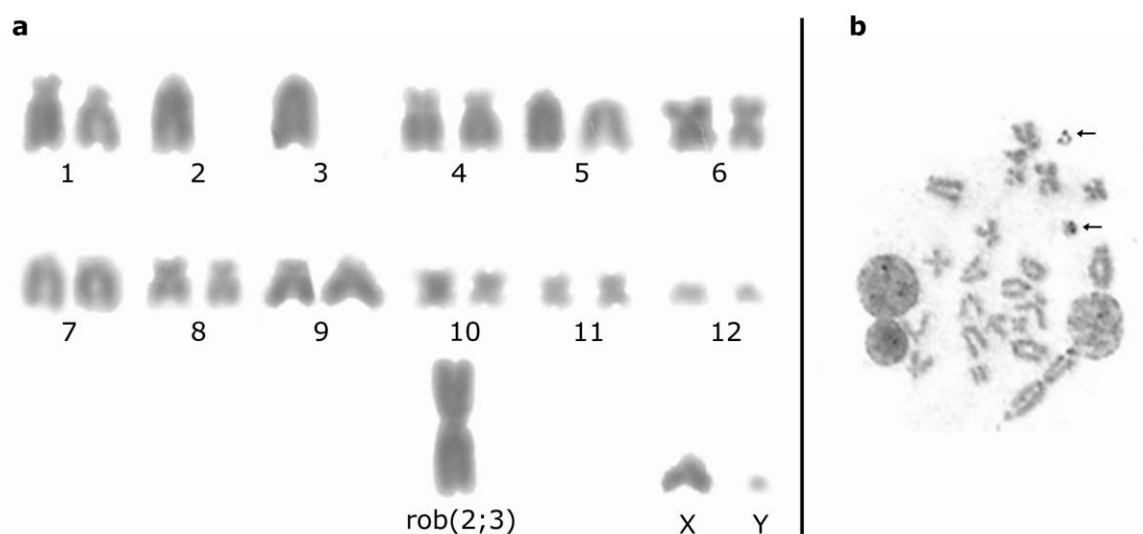


Figura 8. Análise citogenética clássica em *Tonatia bidens*. a) Coloração convencional $2n = 25,XY$ rob(2;3) e $NF = 38$; b) Impregnação com $AgNO_3$. Setas indicam a localização da RON no par 12.

Pintura Cromossômica em *Tonatia bidens* (TBI)

As hibridizações com sondas cromossomo-específicas de *Macrotus californicus* (MCA) no genoma de *Tonatia bidens* (TBI) revelaram um cariótipo extremamente rearranjado. Foram detectados 21 pares de segmentos homólogos

com o uso de sondas correspondentes a 15 cromossomos de *M. californicus* (Figura 9).

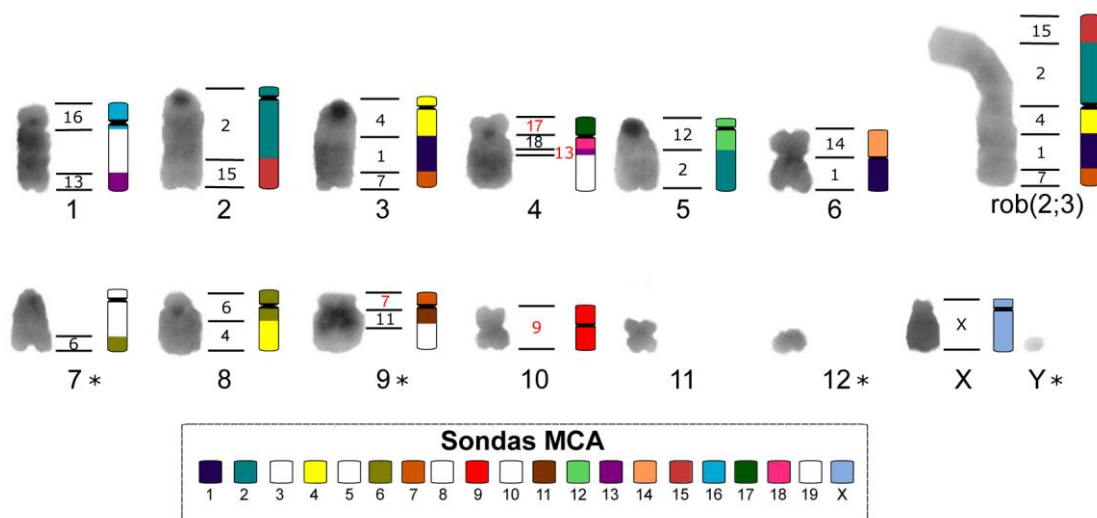


Figura 9. Homologias cromossômicas de *Macrotus californicus* (MCA) no cariótipo de *Tonatia bidens* (TBI). As correspondências cromossômicas entre as duas espécies são mapeadas (número) à direita de cada cromossomo em DAPI invertido. Números em vermelho representam marcações que necessitam de mais experimentos para sua confirmação. À direita, representação esquemática de cada par cromossômico, com respectivas regiões de homologia a cromossomos de MCA de acordo com o código de cores incluído na parte inferior da imagem; A cor branca corresponde a sondas de MCA com as quais experimentos não foram realizados. Nota: * = cromossomos de outra metáfase.

A marcação com apenas uma sonda de *Macrotus* ocorreu em dois cromossomos inteiros de *T. bidens*: TBI 10 (MCA 9) e TBI X (MCA X), revelando um cromossomo sexual X com morfologia subtelocêntrica e eliminando a possibilidade de que o grande cromossomo metacêntrico observado correspondesse ao cromossomo X (Figura 9 e 10a). Hibridizações de cinco sondas autossômicas de *Macrotus* indicaram que o indivíduo analisado é heterozigoto para uma translocação Robertsoniana (Figura 9). Os cromossomos envolvidos na translocação representam as seguintes homologias: TBI 2 (MCA 2/15) e TBI 3 (MCA 1/MCA 4/MCA 7) (Figura 10d).

Cinco sondas de *Macrotus* tiveram homologias em um segmento cromossômico de *T. bidens* (ex. MCA11 = TBI 9; MCA 18 = TBI 4 e MCA 16 = TBI 1) (Figura 10 b-c). Adicionalmente, seis sondas de MCA apresentaram dois sinais de fluorescência com marcações em pares cromossômicos distintos de *T. bidens*: MCA 1 (TBI 3 e 6), MCA 2 (TBI 2 e 5), MCA 4 (TBI 3 e 8), MCA 6 (TBI 7 e 8), MCA 7 (TBI 3 e 9) e MCA 13 (TBI 1 e 4).

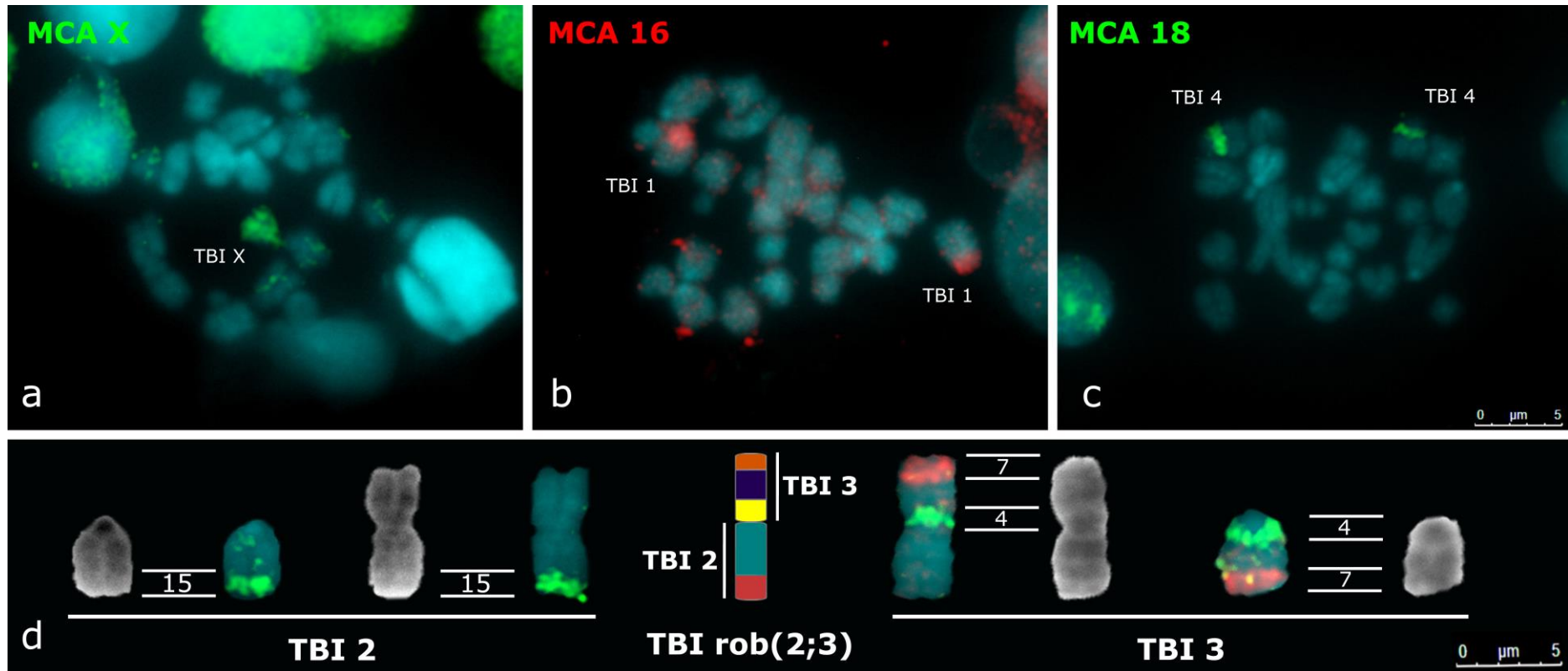


Figura 10. Imagens representativas de hibridizações *in situ* com sondas de *Macrotus californicus* (MCA) em metáfases de *Tonatia bidens* (TBI). Sondas utilizadas estão indicadas no canto superior esquerdo das fotomicrografias. Em a, b e c, exemplos de sondas autossômicas e sexual de MCA em TBI. Em d, resultados e esquema compilatório da pintura cromossômica mostrando o rearranjo no novo citótipo de *T. bidens* ($2n = 25,XY,rob(2;3)$); as sondas envolvidas na translocação são apresentadas com sua marcação nos cromossomos e identificadas ao lado de cada cromossomo em DAPI invertido.

5.2 MITOGENOMA DE *T. bidens*: CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISES FILOGENÉTICAS

O mitogenoma de *T. bidens* é composto por uma molécula de DNA circular com comprimento total de 16.717 pb (Figura 11). A partir da anotação, foram identificados 37 genes no mitogenoma que correspondem a 13 genes codificadores de proteínas (GCPs), dois genes de RNA ribossomal (RNAr) e 22 genes RNA transportador (RNAt) (Tabela 4). O conteúdo de nucleotídeos GC e AT é de 42,2% e 57,7%, respectivamente (0.1% corresponde a uma base não identificada K na posição 2915 no mitogenoma). O mitogenoma mostrou viés de composição AT positiva (0.119) e GC negativa (-0.379).

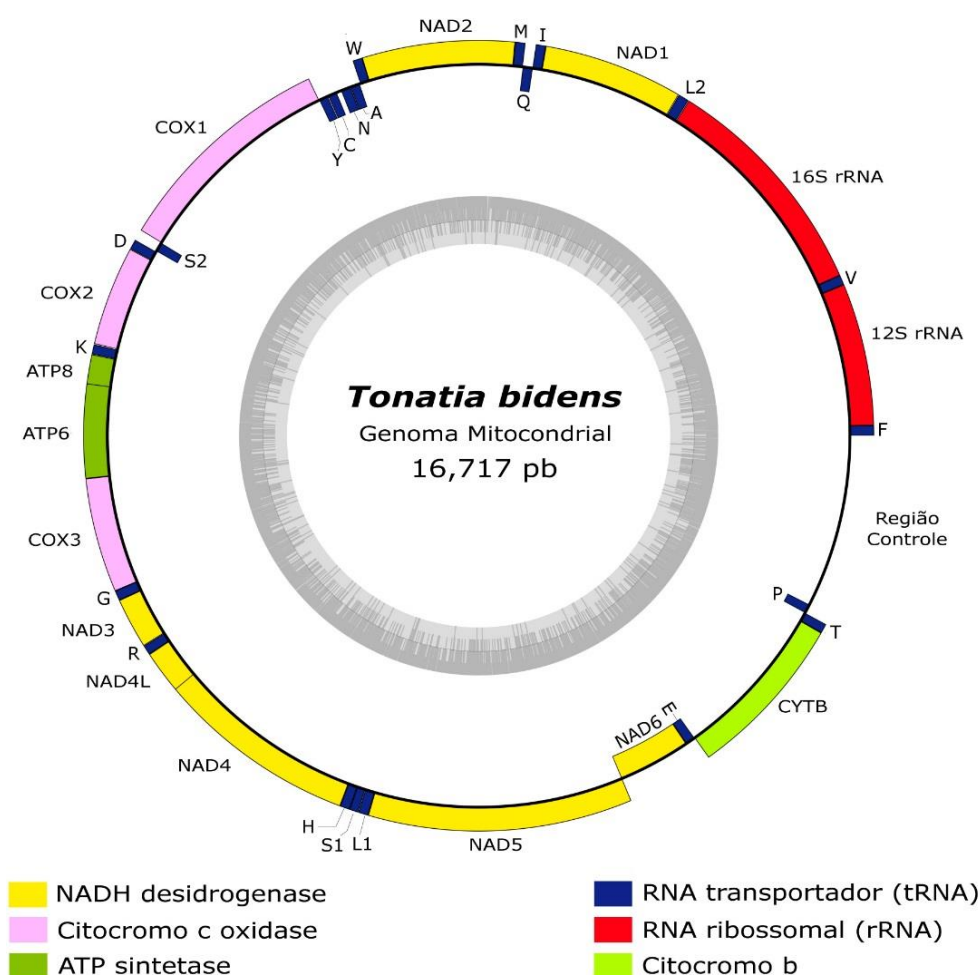


Figura 11. Representação esquemática do mitogenoma de *T. bidens* produzido na plataforma OGDRAW (GREINER *et al.*, 2019). Círculo interno corresponde ao conteúdo GC e o círculo externo a representação dos diferentes genes. As sequências de RNAts estão identificadas pelas letras de seus respectivos aminoácidos.

Tabela 4. Anotação do mitogenoma de *Tonatia bidens*.

Gene	Posição		pb	Códon		Anticódon	SP /EP	Leitura
	Início	Fim		Start	Stop			
tRNA ^{Phe}	1	70	70			GAA	0	+
<i>rrnS</i>	71	1043	973				0	+
tRNA ^{Val}	1044	1111	68			TAC	0	+
<i>rrnL</i>	1112	2688	1577				2	+
tRNA ^{Leu}	2691	2765	75			TAA	2	+
<i>nad1</i>	2768	3724	957	ATG	TAA		-1	+
tRNA ^{Ile}	3724	3792	69			GAT	-3	+
tRNA ^{Gln}	3790	3862	73			TTG	0	-
tRNA ^{Met}	3863	3932	70			CAT	0	+
<i>nad2</i>	3933	4976	1044	ATA	TAG		-2	+
tRNA ^{Trp}	4975	5042	68			TCA	5	+
tRNA ^{Ala}	5048	5115	68			TGC	1	-
tRNA ^{Asn}	5117	5189	73			GTT	2	-
OR ^{Light}	5192	5223	32				0	+
tRNA ^{Cys}	5224	5289	66			GCA	3	-
tRNA ^{Tyr}	5293	5359	67			GTA	1	-
<i>cox1</i>	5361	6905	1545	ATG	TAG		1	+
tRNA ^{Ser}	6907	6975	69			TGA	7	-
tRNA ^{Asp}	6983	7049	67			GTC	1	+
<i>cox2</i>	7051	7734	684	ATG	TAA		3	+
tRNA ^{Lys}	7738	7805	68			TTT	1	+
<i>atp8</i>	7807	8010	204	ATG	TAA		-43	+
<i>atp6</i>	7968	8648	681	ATG	TAA		-1	+
<i>cox3</i>	8648	9432	785	ATG	TA(A)		-1	+
tRNA ^{Gly}	9432	9500	69			TCC	0	+
<i>nad3</i>	9501	9848	348	ATT	TAA		0	+
tRNA ^{Arg}	9849	9916	68			TCG	0	+
<i>nad4L</i>	9917	10213	297	ATG	TAA		-7	+
<i>nad4</i>	10207	11584	1378	ATG	T(AA)		0	+
tRNA ^{His}	11585	11652	68			GTG	0	+
tRNA ^{Ser}	11653	11712	60			GCT	1	+
tRNA ^{Leu}	11714	11783	70			TAG	-9	+
<i>nad5</i>	11775	13592	1818	ATA	TAA		-4	+
<i>nad6</i>	13589	14110	522	ATG	TAA		6	-
tRNA ^{Glu}	14117	14184	68			TTC	4	-
<i>cytb</i>	14189	15328	1140	ATG	AGA		0	+
tRNA ^{Thr}	15329	15394	66			TGT	0	+
tRNA ^{Pro}	15395	15461	67			TGG	0	-
D-loop	15461	16717	1256				0	+

(+) representa a fita de leitura *heavy* (H) e (-) a fita de leitura *light* (L). SP: sobreposição de nucleotídeos; EP: espaçadores intergênicos.

As regiões não codificantes do mitogenoma de *T. bidens* são formadas pela região controle que está localizada entre os genes *trn^{Pro}* e *trn^{Phe}*, com tamanho total de 1.256 pb. Além disso, a anotação indicou múltiplas regiões espaçadoras intergênicas variando de 1 – 7 pb, correspondendo a um total de 40 pb, e a maior

encontrada entre os genes *trn^{ser}* e *trn^{Asp}*. Em contraste, nove regiões de sobreposições foram detectadas, com tamanho total de 71 pb, das quais a sequência de 43 pb abrangendo parcialmente os genes *atp8* e *atp6* é a maior encontrada no mitogenoma de *T. bidens*.

O comprimento total dos GCPs identificados no mitogenoma de *T. bidens* foi de 11.403 pb. Todos os GCPs são codificados na fita H (*heavy* ou pesada), exceto o gene *nad6* na fita L (*light* ou leve) do DNA circular (Figura 11; Tabela 4). O *start* códon ATG é o mais frequente nos GCPs, exceto os genes *nad2* e *nad5* com o códon ATA e o gene *nad3* com o códon ATT. Em relação ao *stop* códon, oito GCPs comumente usam o códon TAA, dois genes usam o TAG e apenas o *cyt-b* termina com AGA. Códon de terminação incompletos TA e T são encontrados nos genes *cox3* e *nad4*, respectivamente (Tabela 4).

O mitogenoma contém 2 genes de RNAs, sendo um gene de subunidade ribossomal maior (*rrnL* – RNAr 16S) e um de subunidade menor (*rrnS* - RNAr 12S) com tamanho total de 2.550 pb. Além disso, 22 RNAs encontrados no genoma DNAm de *T. bidens* variam em tamanho de 60 pb (RNAt-Ser1) a 75 pb (RNAt-Leu2) (Tabela 4). Existem três agrupamentos de RNAs no mitogenoma de *T. bidens*, dos quais o principal (5 RNAs) está localizado entre os genes *nad2* e *cox1*. As estruturas secundárias dos RNAs seguem a constituição em formato de trevo, exceto do RNAt-Ser (GCT) (Apêndice C). Foram observados 8 pareamentos atípicos em algumas estruturas secundárias de RNAs; quatro deles foram pareamentos A-C, três U-U e um A-G.

Com base nos valores de quantidade relativa de *codon usage* do mitogenoma de *T. bidens*, os códon mais frequentemente usados são CAA (Gln), CCU e CCC (Pro). Em contrapartida, os aminoácidos encontrados em maior quantidade no genoma mitocondrial são Leucina (6 códon), Prolina (4) e Serina (6). Os aminoácidos menos frequentes são Triptofano, Metionina e Cisteína (Figura 12). As frequências de códon terminados em A/T são maiores do que os terminados em G/C.

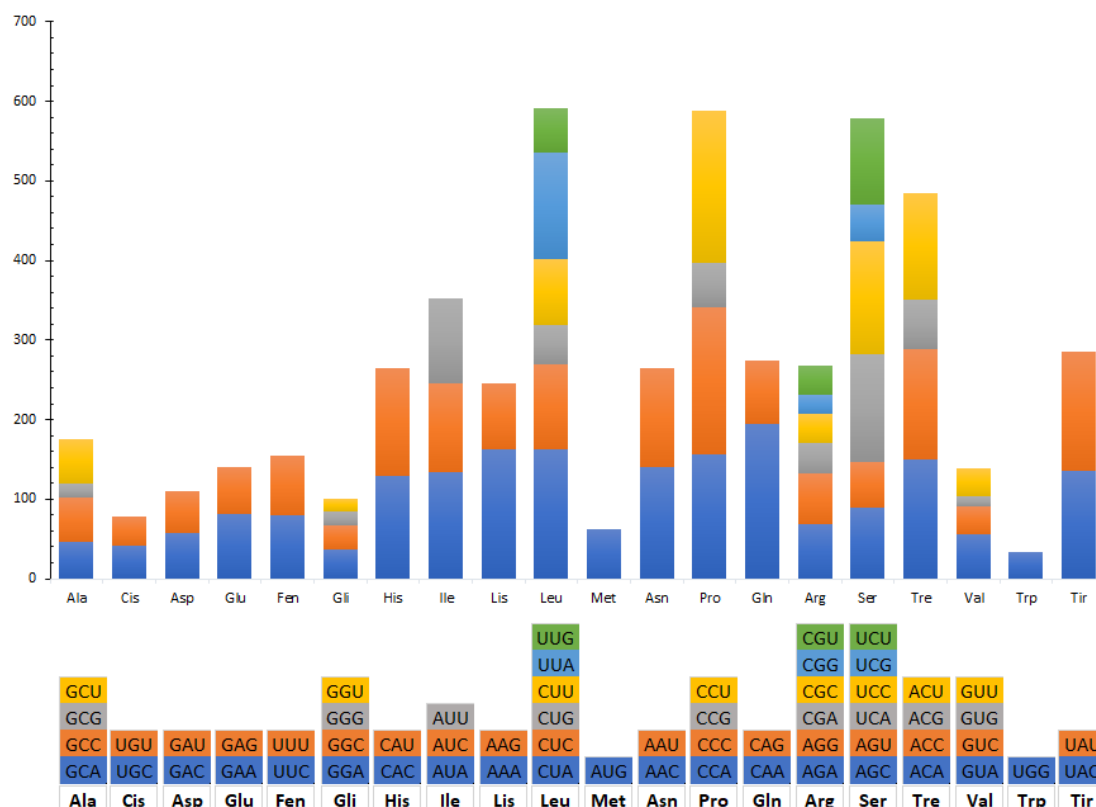


Figura 12. Codon usage no genoma mitocondrial de *Tonatia bidens*. Frequência de codon usage localizadas no eixo Y. Grupo de códons para os respectivos aminoácidos estão plotados abaixo do gráfico com as respectivas cores associadas (eixo X).

Do ponto de vista filogenético, nossas análises incluíram diferentes grupos de sequências mitocondriais disponíveis para a família Phyllostomidae, às quais incorporamos sequências da região barcode do gene *cox1* (COI), o gene citocromo *b* (*cyt-b*) e o fragmento dos genes RNAr 12S-16S – RNAt^{Val} de *T. bidens* (M829). O alinhamento para a análise filogenética com o gene *cyt-b* contou com 31 sequências, e gerou 1.140 posições de nucleotídeos; para o gene *COI* foi obtida uma matriz com 531 caracteres oriundas de 46 sequências utilizadas. Os genes concatenados RNAr 12S-16S – RNAt^{Val} resultaram em uma matriz com 2.536 caracteres para 21 sequências. Finalmente, a matriz que incluiu todos os genes exceto o *COI* concatenados, gerou 3.648 caracteres.

O cladograma gerado a partir da região *barcode* com o método de *Maximum likelihood* (ML) resultou no agrupamento bem definido dos representantes do gênero *Tonatia* (Figura 13). A sobreposição de dados citogenéticos das espécies do gênero a estes resultados mostrou que o espécime de *T. bidens* do nordeste brasileiro com número diploide $2n=25$ e $NF=38$ é grupo irmão do espécime de *T. cf. bidens* do centro-oeste com citótipo diferente ($2n=26, NF=38$), potencialmente representando indivíduos de uma mesma espécie. Este clado bem suportado

compartilha por sua vez, um ancestral comum com um clado formado por *T. saurophila* de diversas regiões, com pelo menos um indivíduo com $2n=16$, $NF=20$. Vale salientar que sequências *barcode* adicionais atribuídas a *T. bidens* não foram utilizadas devido à sua ausência em bancos de dados.

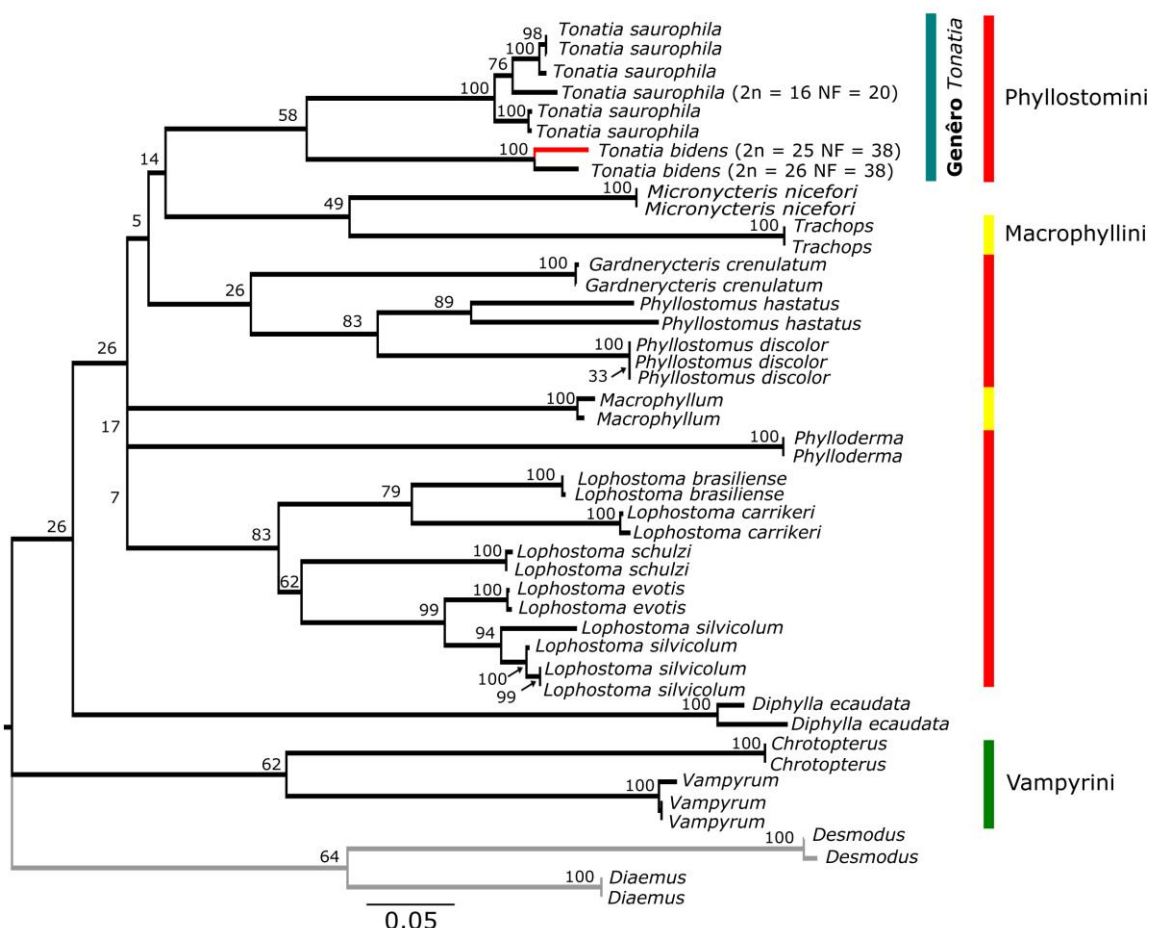


Figura 13. Filogenia molecular da região *barcode* para a subfamília Phyllostominae, construída a partir do método de *Maximum likelihood* valores de *bootstrap* na parte superior de cada clado. Dados citogenéticos para o gênero *Tonatia* inseridos em parênteses. As espécies do gênero *Tonatia* foram recuperadas como um clado monofilético com valor de *bootstrap* >50. No gênero, o primeiro grupo recuperado na filogenia está formado pelos representantes de *T. saurophila*, incluindo o espécime $2n=16$ e $NF=20$, com suporte alto (100). O segundo grupo resgata o clado formado pelos dois espécimes de *T. bidens* com citótipos $2n = 25$, $NF = 38$ e $2n = 26$, $NF = 38$ fortemente suportado (100).

A árvore filogenética derivada das análises dos genes mitocondriais concatenados (*cyt-b* + RNAr 12S-16S – RNAt^{Val}) apresenta poucas diferenças nas topologias para subfamília Phyllostominae (Figura 14). A monofilia da subfamília Phyllostominae foi bem suportada (99), bem como a organização das três tribos do grupo com diferentes valores de suporte Vampyrini (100), Macrophyllini + Phyllostomini (71) (Figura 14). Em destaque, no gênero *Tonatia* com monofilia bem suportada (100), o espécime do presente estudo está agrupado com

linhagens de *T. bidens* (100) de diferentes localidades. Além disso, foi observado que o referido espécime do nordeste brasileiro se apresenta menos próximo a um espécime brasileiro, aparecendo como uma linhagem separada a um agrupamento entre representantes da espécie localizados no Paraguai e no sudeste do Brasil (Figura 14). Esses resultados são semelhantes as filogenias obtidas para os genes *cyt-b* e RNAr 12S-16S – RNAt^{Val} separadamente (Apêndice D). Nos resultados da árvore do gene *cyt-b* a separação entre localidades é mais evidente por possuir mais sequências de São Paulo (Apêndice D).

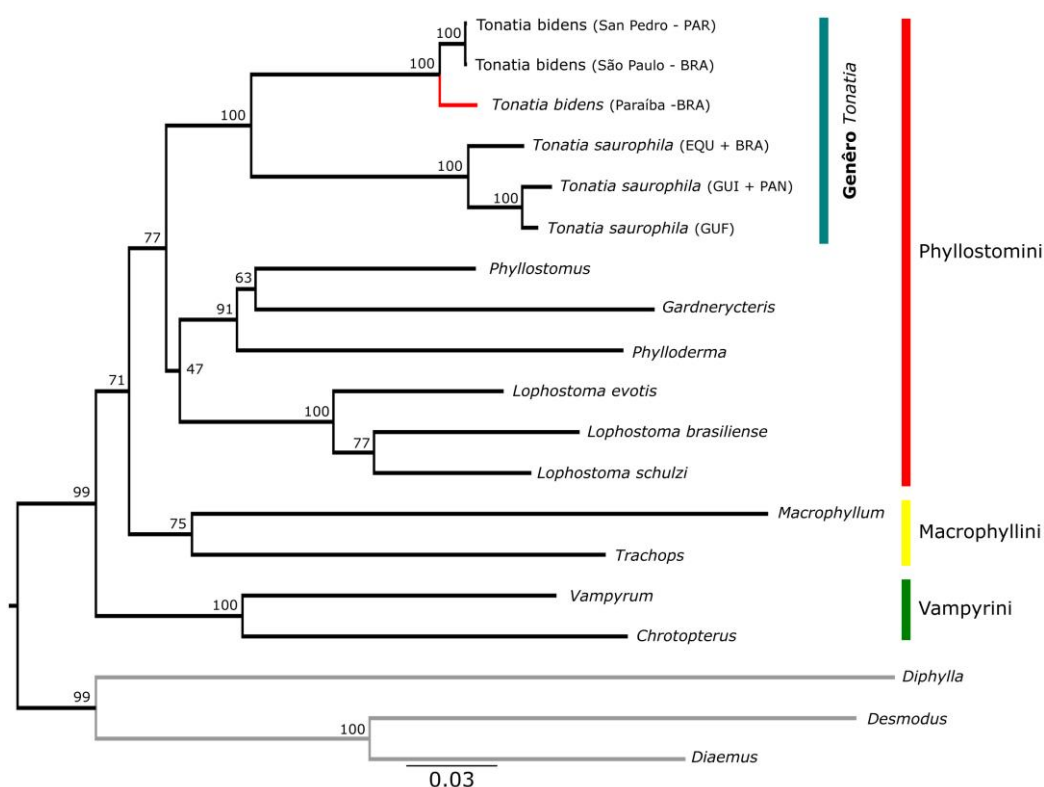


Figura 14. Filogenia molecular de genes concatenados (*cyt-b*; RNAr 12S-16S – RNAt^{Val}) da subfamília Phyllostominae, construída a partir do método de Maximum likelihood com valores de *bootstrap* na parte superior de cada clado. Localização dos espécimes do gênero *Tonatia* com siglas dos países descritas em parênteses: BRA – Brasil; EQU – Equador; GUI - Guiana; GUF – Guiana Francesa; PAN - Panamá e PAR – Paraguai.

Para as distâncias genéticas calculadas a partir de dados pareados entre as espécies utilizadas na filogenia com sequências do gene *cyt-b*, observamos altas taxas de diferenciação genética entre gêneros distintos, com valores mais altos correspondendo a comparações entre membros de subfamílias diferentes. Por exemplo, a distância genética entre o espécime de *T. bidens* (M829, Phyllostominae) e *Desmodus* (Desmodontinae) é de 16,75%. Entretanto, valores altos são ainda encontrados entre membros de uma mesma subfamília, por

exemplo 15,92% entre *T. bidens* e *Lophostoma occidentale* (Phyllostominae) (Tabela 5).

No gênero *Tonatia*, a distância genética entre *T. bidens* (M829) e *T. saurophila* varia de 12,02% a 13,7% para diferentes localidades, semelhante as distâncias vistas para *T. bidens* de San Pedro (Paraguai) e São Paulo (Brasil) em comparação a *T. saurophila* (Tabela 5). Por outro lado, os valores de distância genética entre representantes de *T. bidens* é mais baixa; por exemplo *T. bidens* do Nordeste (M829) diverge das amostras do sudeste em 3,42%, diferença menor para o Paraguai (3,33%). Em contrapartida, os espécimes localizados no sudeste brasileiro e no Paraguai possuem distâncias genéticas entre si baixas com apenas 0,09% (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação da distância genética do gene citocromo *b* (*cyt-b*) entre o espécime de *Tonatia bidens* do nordeste brasileiro (M829 - TBI) e alguns representantes da subfamília Phyllostominae. Valores estimado (%) usando o *p-distance* no MEGA X.

Comparação	<i>p-distance</i> (%)
Intergenérica (Desmodontinae) Grupo externo	
TBI – <i>Desmodus</i>	16,75
TBI – <i>Diaemus</i>	16,93
TBI – <i>Diphylla</i>	18,6
Intergenérica (Phyllostominae)	
TBI – <i>Chrotopterus</i> *	17,54
TBI – <i>Vampyrum</i>	14,3
TBI – <i>Trachops</i> *	16,67
TBI – <i>Macrophyllum</i>	18,51
TBI – <i>Phylloderma</i>	14,04
TBI – <i>Phyllostomus hastatus</i>	13,68
TBI – <i>P. elongatus</i>	14,84
TBI – <i>Gardnerycteris</i>	14,35
TBI – <i>Lophostoma brasiliense</i> *	14,21
TBI – <i>L. carrikeri</i> *	14,87
TBI – <i>L. evotis</i>	13,86
TBI – <i>L. occidentale</i> *	15,92
TBI – <i>L. schulzi</i> *	13,99
TBI – <i>L. silvicola</i>	13,16
Intragenérica	
TBI – <i>T. saurophila</i> (GUI/PAN/GUI)	12,02 / 13,7 / 12,11
TBI – <i>T. bidens</i> (São Paulo -BRA) *	3,42
TBI – <i>T. bidens</i> (San Pedro - PRA)	3,33
<i>T. bidens</i> (San Pedro - PAR) – <i>T. bidens</i> (São Paulo -BRA)	0,09
<i>T. bidens</i> (São Paulo -BRA) – <i>T. saurophila</i> (GUI/PAN/GUI)	12,46 / 12,72 / 12,37
<i>T. bidens</i> (San Pedro - PAR) – <i>T. saurophila</i> (GUI/PAN/GUI)	12,37 / 12,63 / 12,28

Nota: * corresponde à média da distância genética entre indivíduos da mesma espécie. Siglas dos países descritas em parênteses: BRA – Brasil; EQU – Equador; GUI – Guiana; PAR – Paraguai e PAN – Panamá.

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE *Tonatia bidens*

Os resultados mostram que o cariótipo de *T. bidens* ($2n=25$ e $NF=38$) é extremamente rearranjado quando comparado ao cariótipo ancestral para a família Phyllostomidae (*Macrotus waterhousii* $2n=46$; $NF=60$). Essa inferência deriva dos pressupostos da pintura cromossômica com o presente conjunto de sondas, uma vez que *M. californicus* (MCA) possui cariótipo similar ao ancestral (PATTON e BAKER, 1978; BAKER e BICKHAM, 1980; SOTERO-CAIO *et al.*, 2013). A maioria das espécies de Phyllostomidae apresentam cariótipos derivados e distintos da composição cariotípica de *Macrotus*, como reportado em representantes dos gêneros *Anoura* e *Glossophaga* (Glossophaginae), *Lonchophylla* (Lonchophyllinae) (SOTERO-CAIO *et al.*, 2013), *Lophostoma*, *Gardnerycteris* e *Tonatia* (Phyllostominae; SOTERO-CAIO *et al.*, 2015), contudo *Tonatia* parece apresentar uma maior quantidade de quebras de sintenia e reorganização cariotípica do que outros gêneros analisados até o presente.

Os dados obtidos a partir das análises de citogenética clássica para nosso espécime de *T. bidens* (Tabela 6) mostraram-se similares ao cariótipo com $2n=26$ e $NF=38$ recentemente descrito para a espécie (TAVARES *et al.*, 2015). As similaridades incluíram morfologia cromossômica e localização da RON. As comparações desses cariótipos são, portanto, a primeira evidência de que uma constituição cromossômica similar, embora não idêntica é encontrada para a espécie em distintas regiões do território brasileiro (Mato Grosso e Paraíba).

Tabela 6. Dados citogenéticos comparativos para o gênero *Tonatia*.

Espécie	Local	2n	NF	Morfologia cromossômica			RON	Fonte
				M/Sm	St	A		
<i>T. bidens</i>	Paraíba -Brasil	25	38	11	4	8	Par 12	1
	Mato Grosso - Brasil	26	38	10	4	10	Par 13*	2
	Pernambuco - Brasil	16	20	6	-	8	Par 4	3
<i>T. saurophila</i>	Trinidade Amazonas, Pará e	16	20	6	-	8	Par 4/6**	2,4-5
	Mato Grosso - Brasil							
	Costa Rica e Equador	16	22	8	-	6	Par 4	6

Nota: M: Metacêntrico; Sm: Submetacêntrico; St: Subtelocêntrico; A: Acrocêntrico e RON: Região organizadora de nucléolo. Nota: * Mesmo cromossomo referente ao par 12 de *T. bidens* ($2n=25$) com base em morfologia; ** Par 6 apresenta morfologia e banda G correspondente ao cromossomo do par 4 em *T. saurophila*. **Fonte:** 1. Este trabalho; 2. TAVARES *et al.* (2015); 3. SANTOS *et al.* (2002); 4. RIBAS *et al.* (2015); 5. PATTON e BAKER (1978); 6. SOTERO-CAIO *et al.* (2015).

A diferença cromossômica entre os espécimes de *T. bidens*, em termos de morfologia e número, pode ser explicada por apenas um rearranjo de translocação Robertsoniana envolvendo os cromossomos acrocêntricos 2 e 3, confirmada pela ZOO-FISH. A presença do rearranjo em heterozigose no indivíduo analisado no presente estudo sugere a existência de um polimorfismo cromossômico, os quais são raros em populações de morcegos. Até o presente, foram descritas apenas algumas espécies que desviam de um padrão cariotípico intraespecífico estável em Phyllostomidae: *Uroderma bilobatum* W. Peters, 1866, que apresenta representantes com translocações, fusões e inversões (BAKER e LOPEZ, 1970; BAKER, 1979), e *Gardnerycteris crenulatum* Geoffroy St.-Hilaire, 1803 com duas inversões em cromossomos não fixadas (BAKER *et al.*, 1972; SOTERO-CAIO *et al.*, 2015). Adicionalmente, na família Emballonuridae, a espécie *Cormura brevirostris* Wagner, 1843 se destaca por múltiplas translocações e formação de uma cadeia em anel em meiose composta por quatro pares cromossômicos, rearranjos estes provavelmente já fixados para a espécie (ARAÚJO *et al.*, 2016).

Até o momento, casos de heterozigose para translocações Robertsonianas em autossomos foram reportados em apenas algumas espécies de Phyllostomidae como: *Mesophylla macconelli* Thomas, 1901 (BAKER e HSU, 1970), *U. bilobatum* (BAKER, 1979), *U. magnirostrum* Davis, 1968 (BAKER e LOPEZ, 1970) e *Micronycteris hirsuta* W. Peters, 1869 (RIBAS *et al.*, 2013). Esse último também considerado como exemplo de megaevolução cariotípica por BAKER e BICKHAM (1980) e BENATHAR *et al.* (2019). Adicionalmente, em algumas espécies existem casos conhecidos de polimorfismo cromossômicos fixados, por exemplo *Rhinophylla pumilio* W. Peters, 1865 (Rhinophyllinae) (GOMES *et al.*, 2012), e *Rhogeessa tumida* H. Allen, 1866 (Vespertilionidae) (BICKHAM e BAKER, 1977), no qual nenhum cariótipo heterozigoto ainda foi relatado.

Além disso, para o gênero *Tonatia*, outra diferença intraespecífica foi descrita, envolvendo uma inversão pericêntrica entre espécimes de *T. saurophila* (TSA) da Costa Rica e Equador descritas por SOTERO-CAIO *et al.* (2015). Entretanto, estudos adicionais são necessários para descobrir se a inversão existe em forma polimórfica em alguma zona de contato, ou se são rearranjos fixados entre populações distintas.

Em um contexto cromossômico, os dados obtidos evidenciaram diferenças ao nível morfológico, numérico e de distribuição de RON entre cariótipos descritos para as espécies do gênero *Tonatia* (Tabela 6). Nossos dados de *T. bidens* ($2n=25$) quando comparados a *T. saurophila* ($2n=16$) (PATTON e BAKER, 1978; RIBAS *et al.*, 2015; SOTERO-CAIO *et al.*, 2015) e *T. bidens* ($2n=16$) (SANTOS *et al.*, 2002), revelaram morfologia cromossômica diferenciada e distribuição de RONS em cromossomos distintos, localizada em um acrocêntrico médio (*T. saurophila* e *T. bidens*, $2n=16$, NF=20) ou submetacêntrico (*T. saurophila*, $2n=16$ NF = 22; inversão). Ademais, nossa análise de citogenética comparativa evidenciou que ainda é incerta a atribuição taxonômica do espécime utilizado por SANTOS *et al.* (2002), devido a simpatria das duas espécies de *Tonatia* para a região nordeste do Brasil (WILLIAMS *et al.*, 1995), mas como indicado por seu cariótipo de $2n=26/25$, este indivíduo provavelmente consiste em um espécime de *T. saurophila*.

A análise comparativa dos nossos resultados de pintura cromossômica da espécie *T. bidens* (TBI) com dados previamente publicados para a espécie *T. saurophila* (TSA), por SOTERO-CAIO *et al.* (2015), revelaram compartilhamento de segmentos cromossômicos associados entre as duas espécies do gênero *Tonatia*, com destaque para os segmentos MCA2/15 e MCA1/4/7. Esses dados se apresentam como uma forte evidência da ocorrência de sintenia desses segmentos no cariótipo ancestral do gênero. Adicionalmente, foi possível identificar uma inversão do cromossomo X, que se apresenta com morfologia submetacêntrica em TSA e subtelocêntrica em TBI.

A partir desses resultados foi possível identificar cromossomos e grupos sintênicos altamente conservados (MCA9; MCA12/2; MCA14/1 e MCA17/18) em *T. bidens*, compartilhados por outros filostomídeos (SOTERO-CAIO *et al.*, 2013, 2015) dos quais, o segmento MCA17/18 é uma sinapomorfia da subfamília Phyllostomidae (SOTERO-CAIO *et al.*, 2015). No entanto, no genoma *T. saurophila* esses segmentos estão em diferentes cromossomos (ex. MCA14 em TSA2 e MCA1 em TSA3), indicando que esses grupos sintênicos foram envolvidos em rearranjos após a divergência entre as espécies de *Tonatia*. SOTERO-CAIO *et al.* (2015) identificaram 39 rearranjos únicos de fusão e fissão em *T. saurophila*, ao que tudo indica, com dificuldades em indicar o caminho na

derivação do cariótipo de *Tonatia* a partir do ancestral da família, estimando 13 eventos de fusão em tandem.

Na família Phyllostomidae diferentes linhagens têm variações nas taxas de evolução cromossômica, e os filostomíneos em geral não demonstram grandes modificação em comparação ao cariótipo ancestral da família Phyllostomidae (PIECZARKA *et al.*, 2005; RIBAS *et al.*, 2015; SOTERO-CAIO *et al.*, 2015). Algumas linhagens não relacionadas em subfamílias como Micronycterinae, Glossophaginae (gênero *Anoura*) e Stenodermatinae (*Vampyressa* e *Mesophylla*) (SOTERO-CAIO *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2018; BENATHAR *et al.*, 2019), além da espécie *T. saurophila* (Phyllostominae) (SOTERO-CAIO *et al.*, 2015) têm demonstrado pouco conservadorismo cromossômico em comparação ao cariótipo ancestral da família. SOTERO-CAIO *et al.* (2015) sugerem que os eventos responsáveis pelas taxas de reorganização da arquitetura cromossômica de gêneros como *Tonatia* e *Anoura* estejam envolvidos em processos que ocorreram independentemente na evolução de família Phyllostomidae.

O gênero *Tonatia* foi descrito como detentor de uma das maiores taxas de evolução cromossômica entre os mamíferos (SOTERO-CAIO *et al.*, 2015). SOTERO-CAIO *et al.* (2015) sugeriram que todos os rearranjos presentes no gênero haviam ocorrido antes da divergência das duas espécies em um tempo extremamente curto de cerca de 6 Ma e que após essa divergência, as duas espécies teriam mantido um cariótipo estável (com $2n=16$) por cerca de 12 Ma (HOFFMANN *et al.*, 2008). Entretanto, nossos dados sugerem que um menor número de rearranjos ocorreu antes da separação das duas linhagens.

Rearranjos autapomórficos ocorreram durante a divergência de cada linhagem de *Tonatia* (ex. MCA7/11 e MCA17/18/13 em *T. bidens*). Além disso, ao contrário de *T. saurophila*, *T. bidens* possui mais segmentos conservados presentes no cariótipo ancestral da subfamília Phyllostominae. Nossos dados sugerem que *T. bidens* ($2n=25$) apresenta níveis de rearranjos menores quando comparados a *T. saurophila* ($2n=16$). O gênero *Tonatia* divergiu há cerca de 6 Ma (HOFFMANN *et al.*, 2008; SOTERO-CAIO *et al.*, 2015), período em que o mecanismo envolvido na remodelação cromossômica no gênero continuou ocorrendo nos dois cariótipos. Em *T. bidens* esse mecanismo ao que tudo indica atuou em menor magnitude, mas, ainda em progresso visto que nossos dados mostram a presença de rearranjos em heterozigose.

Diante disso, sugerimos que a identificação de grupos sintênicos em um estado intermediário entre os cariótipos do clado TBI/TSA permitirá a determinação do cariótipo ancestral do gênero. Até o presente, nossos dados sugerem que as associações MCA9, MCA12/2, MCA14/1 e MCA17/18, presentes no cariótipo de outros Phyllostominae, bem como segmentos em *T. bidens* MCA2/15 e MCA1/4/7, compartilhadas entre as duas espécies, compunham um cariótipo no *Tonatia* ancestral com um número diploide igual ou maior que o encontrado em *T. bidens*. Ao que tudo indica, não apenas fusões de cromossomos presentes no ancestral de *Tonatia* (como por exemplo TBI 1+3) foram fixadas em *T. saurophila* após a separação das linhagens, mas também inversões foram necessárias para a derivação do cariótipo atual de *T. saurophila*.

6.2 MITOGENOMA DE *T. bidens*: CARACTERIZAÇÃO E TAXONOMIA INTEGRATIVA

6.2.1 Caracterização do Mitogenoma

Em termos de caracterização mitogenômica, *Tonatia bidens* exibiu uma conformação típica, com cerca de 16 kb, consistente com outras espécies de morcegos e similar a outros vertebrados (PUMO *et al.*, 1998; GISSI *et al.*, 2008; MEGANATHAN *et al.*, 2012; BOTERO-CASTRO *et al.*, 2013; 2018). Mitogenomas de mamíferos são relativamente compactos e conservados, embora, algumas regiões de espaçadores e sobreposição intergênicas sejam encontradas (FERNANDEZ-SILVA *et al.*, 2003). Em nossos resultados encontramos regiões com essas características no mitogenoma de *T. bidens*, mas que se mostram pouco variáveis em morcegos (PUMO *et al.*, 1998; MEGANATHAN *et al.*, 2012; LÓPEZ-WILCHIS *et al.*, 2017). Diferenças substanciais na estrutura secundária dos 22 RNAs não foram encontradas, a ausência do braço D no RNA^t-Ser 2 é uma característica predominante em mamíferos (HELM *et al.*, 2000).

A composição de bases na espécie *T. bidens* demonstra que o viés de nucleotídeos GC foi negativo, bem como relatado para outros morcegos da família Phyllostomidae, Vespertilionidae e Mormoopidae (MEGANATHAN *et al.*, 2012; BOTERO-CASTRO *et al.*, 2013; 2018). Mitogenomas com essa condição contém percentuais de AT acima de 50%, que determina as composições de aminoácidos

codificados no mitogenoma (BOTERO-CASTRO *et al.*, 2018). Em comparações realizadas por MEGANATHAN *et al.* (2012) com morcegos das famílias Vespertilionidae (3 spp.), Phyllostomidae (2), Mystacinidae (1), Rhinolophidae (3) e Pteropodidae (3), observamos que os códons mais frequentes em *T. bidens* (CAA (Gln), CCU e CCC (Pro)) apresentam percentuais de ocorrência diferentes entre as famílias.

6.2.2 Taxonomia integrativa no gênero *Tonatia*

A última revisão morfológica realizada no gênero *Tonatia*, considerou o gênero composto por duas espécies *T. bidens* e *T. saurophila*, com distribuições distintas (WILLIAM *et al.*, 1995). Até 2015, dados citogenéticos foram bem relatados para *T. saurophila* (2n=16, NF=20/22) em diferentes localidades (RIBAS *et al.*, 2015; SOTERO-CAIO *et al.*, 2015). Entretanto, para *T. bidens*, caracterizações cariotípicas estavam limitadas a uma descrição de um espécime do nordeste brasileiro (2n=16, NF=20) (SANTOS *et al.*, 2002). Esses dados eram dessa forma, a única evidência de identidade cromossômica idêntica para o gênero *Tonatia*.

A caracterização cito-taxonômica do grupo foi questionada apenas em um trabalho que relatou potencial diversidade cromossômica no gênero, atribuindo o cariótipo 2n=26 e NF=38 a *T. bidens* (TAVARES *et al.* 2015). No entanto, esses autores não deram indícios moleculares mais robustos para comprovar o *status* taxonômico de *T. bidens* e apesar de fornecerem dados de sequência *barcode* para o exemplar analisado, a ausência de outras sequências para a espécie para serem usadas como referência impediram uma identificação molecular concreta para o espécime. Nossos dados de marcadores mitocondriais se apresentaram valiosos para confirmação do *status* taxonômico desses indivíduos pois este é o primeiro estudo que integra novos indícios, explorando diferentes metodologias e incluindo diferentes indivíduos de *T. bidens* para estabelecer as atribuições taxonômicas e conectar dados de sequências aos dados cromossômicos.

A integração de dados citogenéticos e marcadores moleculares foram usados em diferentes grupos (PARLOS *et al.*, 2014; LUKHTANOV e IASHENKOVA, 2019) para estabelecer a conexão entre o grupo taxonômico e a constituição cromossômica; esse enfoque garante a caracterização genética correta à espécie designada. Dados cariotípicos para *T. bidens* são insuficientes

na literatura, contudo nossos dados possibilitaram a delimitação da posição taxonômica do espécime de *T. bidens* ($2n=25$ e $NF=38$), além de identificar relação com o espécime *T. bidens* ($2n=26$ e $NF=38$) descrito por TAVARES *et al.* (2015). Em uma filogenia do gene *COI* com informações citogenéticas inseridas na árvore para o gênero, apoiamos o clado formado pelos dois espécimes (*bootstrap* = 100) e entre o gênero *Tonatia* (*bootstrap* = 58), diferenciamos por dados moleculares e citogenéticos a espécie *T. bidens* com $2n=26/25$ e $NF=38$ e *T. saurophila* com $2n=16$ e $NF=20$, cujos cariótipos eram considerados até então idênticos ($2n=16$, $NF=20$) (SANTOS *et al.*, 2002; RIBAS *et al.*, 2015; SOTERO-CAIO *et al.*, 2015).

Sequências associadas a *T. bidens* bem caracterizados morfollogicamente estão representadas apenas para os genes *cyt-b*, RNAr 12S-16S – RNAt^{Val} e gene nuclear *RAG2* (LEE-JR *et al.*, 2002; PORTER *et al.*, 2003; HOFFMANN *et al.*, 2008; VELAZCO e CADENILLAS, 2011). Nas filogenias de *Maximum likelihood* dos genes *cyt-b*, do fragmento RNAr 12S-16S – RNAt^{Val} e de todos eles concatenados recuperadas neste trabalho foram concordantes com outras topologias para a subfamília Phyllostominae (PORTER *et al.*, 2003; HOFFMANN *et al.*, 2008). Além disso, o gênero *Tonatia* formando majoritariamente um grupo monofilético bem definido com duas espécies *T. bidens* e *T. saurophila*, que forma um grupo irmão com os demais gêneros da tribo Phyllostomini (*Lophostoma*, *Gardnerycteris*, *Phylloderma* e *Phyllostomus*), foi recuperado. Esses clados aparecem semelhantes a trabalhos prévios (LEE-JR *et al.*, 2002; PORTER *et al.*, 2003; HOFFMANN *et al.*, 2008).

Em contrapartida, recuperamos com suporte elevado o clado formado por espécimes de *T. bidens* em diferentes localidades nos três conjuntos de dados (*bootstrap* > 70%). Diferente de PORTER *et al.* (2003) e HOFFMANN *et al.* (2008), incorporamos um representante de *T. bidens* do nordeste brasileiro na filogenia mitocondrial pela primeira vez. A partir disso, ficou evidente que existe um considerável grau de divergência entre as amostras brasileiras (Floresta Atlântica nordeste vs. sudeste) na topologia das árvores e essa separação é provavelmente resultante de barreiras geográficas na distribuição de *T. bidens* que dificultem o fluxo genético. Estudos prévios descrevem evidências de divisão latitudinal da Floresta Atlântica em grupos como aves (CABANNE *et al.*, 2007), anfíbios (FOUQUET *et al.*, 2012) e pequenos mamíferos não voadores (COSTA,

2003). O padrão da Floresta Atlântica norte vs. sul foi observado nas espécies de morcegos *Desmodus rotundus* (MARTINS *et al.*, 2007, 2009) e *Carollia perspicillata* (DITCHFIELD, 2000), além disso, a possível explicação sugerida pelos autores para a estruturação filogeográfica desses morcegos foram os eventos de isolamento durante a fragmentação natural da floresta (Pleistoceno).

As distâncias genéticas entre os dois representantes do gênero *Tonatia* variam de 12,02% a 13,7%, distância alta também observado por PORTER *et al.*, (2003) para outro conjunto de genes. Nossos dados atendem os critérios propostos por BAKER e BRADLEY (2006) com taxas entre 5% - 14% de distância genética conhecidas para o gene *cyt-b* que separa espécie-irmãs de mamíferos. Valores semelhantes foram relatados para espécies irmãs em outros gêneros da família Phyllostomidae, como *Glossophaga* (HOFFMANN e BAKER, 2001), *Lophostoma* (VELAZCO e CADENILLAS, 2011) e *Lonchophylla* (PARLOS *et al.*, 2014).

Os níveis de divergência das sequências nas linhagens de *T. bidens* em diferentes localidades estão abaixo 5%. Entretanto, as sequências correspondentes a indivíduos do sul da América do Sul divergem entre si por apenas 0.09%. Em contraste ao representante do nordeste do Brasil que possui divergências relativamente altas 3,42 e 3,33% (São Paulo – Brasil e San Pedro – Paraguai, respectivamente). Padrões semelhantes de divergência genética também foram observados em morcegos, como *C. perspicillata* (54 indivíduos), *D. rotundus* (7), *Myotis nigricans* (4) e *Artibeus fimbriatus* (17), para a mesma região de distribuição (Floresta Atlântica norte vs. sul) com taxas de $\leq 2,5$, 3,2, 4 e 2,2%, respectivamente (DITCHFIELD, 2000), que são valores intraespecíficos esperados para espécies com estruturação geográfica (BAKER e BRADLEY, 2006). Nossos dados são condizentes com a delimitação dessas amostras a espécie *T. bidens*, contudo, a análise com mais indivíduos permitirá investigar se linhagens, ao norte e sul da distribuição da espécie, estão seguindo caminhos evolutivos independentes.

7 CONCLUSÕES

1. O cariótipo de *Tonatia bidens* ($2n = 25$ NF = 38) é extremamente rearranjado quando comparado ao de *Macrotus californicus* ($2n = 40$ NF = 60);
2. Cromossomos de *T. bidens* ($2n = 25$ NF = 38) compartilham homologias cromossômicas com a espécie irmã *T. saurophila* ($2n = 16$ NF = 20), além de associações com outros filostomídeos;
3. O cariótipo de *T. bidens* ($2n = 25$ NF = 38) é idêntico ao de *T. bidens* ($2n = 26$ NF = 38) no Mato Grosso, em termos de morfologia cromossômica e sítios de RON, com diferença apenas na translocação rob (2;3), esse rearranjo descrito na Paraíba em forma polimórfica, mas estudos adicionais serão necessários para verificar se o rearranjo está fixado em uma população apresentando $2n = 24$;
4. O mitogenoma de *T. bidens* apresentou estrutura e composição consistente com os relatados anteriormente para a família Phyllostomidae;
5. As análises filogenéticas para diferentes genes delimitaram com forte suporte a monofilia da espécie *T. bidens* do nordeste brasileiro com diferentes linhagens de São Paulo e do Paraguai.
6. Com a integração de diferentes dados provamos a atribuição cromossômica $2n = 26 / 25$ NF = 38 a *T. bidens*. Além disso, citótipos em diferentes regiões do território brasileiro (Paraíba e Mato Grosso) pertencem a mesma espécie (*T. bidens*), mas com presença de rearranjo cromossômico em heterozigose na Paraíba;
7. A descrição e confirmação do cariótipo de *T. bidens*, permitiu identificar diversidade cromossômica até então não atribuída para o gênero *Tonatia*, que antes acreditava-se apresentar uma estabilidade cromossômica entre seus representantes ($2n = 16$);
8. Embora, a conclusão do mapeamento das sondas adicionais de *Macrotus* sejam necessárias para recalcular as taxas de evolução de rearranjos cromossômicos no gênero *Tonatia*, nós não podemos descartar a hipótese de que o gênero talvez apresente taxas de rearranjo menores.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L.M.S.; ROSA, R.O.L.; JONES, G.; MACHADO, R.B. **Effect of chronological addition of records to species distribution maps: the case of *Tonatia saurophila maresi* (Chiroptera, Phyllostomidae) in South America.** Austral Ecol 40:836–844. 2015.
- AMADOR, L.I.; ARÉVALO, R.L.M.; ALMEIDA, F.C.; CATALANO, S.A.; GIANNINI, N.P. **Bat systematics in the light of unconstrained analyses of a comprehensive molecular supermatrix.** J Mammal Evol 23:1–34. 2018.
- ANDERSON, S.; BANKIER, A.T.; BARRELL, B.G.; DE BRUIJN, M.H.L.; COULSON, A.R.; DROUIN, J.; EPERON, I.C.; NIERLICH, D.P.; ROE, B.A.; SANGER, F. *et al.* **Sequence and organization of the human mitochondrial genome.** Nature 290:457–465. 1981.
- AO, L.; MAO, X.; NIE, W.; GU, X.; FENG, Q.; WANG, J.; SU, W.; WANG, Y.; VOLLETH, M.; YANG, F. **Karyotypic evolution and phylogenetic relationships in the order Chiroptera as revealed by G-banding comparison and chromosome painting.** Chromosome Res 15:257–268. 2007.
- ARAÚJO, R.E.F.; NAGAMACHI, C.Y.; COSTA, M.J.R.; NORONHA, R.C.R.; RODRIGUES, L.R.R.; PIECZARKA, J.C. **First description of multivalent ring structures in eutherian mammalian meiosis: New chromosomal characterization of *Cormura brevirostris* (Emballonuridae, Chiroptera).** Genetica 144:407–415. 2016.
- ASIN-CAYUELA, J.; GUSTAFSSON, C.M. **Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells.** Trends Biochem Sci 32:111–117. 2007.
- AVISE, J.C. **Animal Mitochondrial DNA.** In: AVISE, JC (eds) Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates pp 60-68. 2004.
- BAKER, R.J. **Karyotypic trends in Bats.** In: WIMSATT, W.A. (eds) Biology of Bats. Academic Press, NY. Vol 1. 1:65-96. 1970.
- BAKER, R.J. **Karyology.** In: BAKER, R.J.; JONES, J.K.; CARTER, D.C. (eds) Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae. Part III. Special Publications, The Museum: Lubbock, pp 107–155. 1979
- BAKER, R.J.; BICKHAM, J.W. **Karyotypic evolution in bats: Evidence of extensive and conservative chromosomal evolution in closely related taxa.** Syst Zool 29:239–253. 1980.
- BAKER, R.J.; BRADLEY, R.D. **Speciation in mammals and the Genetic Species Concept.** J Mammal 87:643–662. 2006.

BAKER, R.J.; HSU, T.C. **Further studies on the sex chromosome systems of the American leaf-nosed bats (Chiroptera, Phyllostomidae).** Cytogenetics 9:131–138. 1970.

BAKER R.J.; LOPEZ, G. **Karyotypic studies of the insular populations of bats on Puerto Rico.** Caryologia 23:465–472. 1970

BAKER, R.J.; BININDA-EMONDS, O.R.P; MANTILLA-MELUK, H.; PORTER, C.A.; VAN DEN BUSSCHE, R.A. **Molecular timescale of diversification of feeding strategy and morphology in New World leaf-nosed bats (Phyllostomidae): a phylogenetic perspective.** In: GUN NELL, G.F.; SIMMONS, N.B. (eds) Evolutionary history of bats: fossils, molecules and morphology. Cambridge Studies in Molecules and Morphology — New Evolutionary Paradigms. Cambridge Univ Press, Cambridge, xii pp 385–409. 2012.

BAKER, R.J.; FONSECA, R.M.; PARISH, D.A.; PHILLIPS, C.J.; HOFFMANN, F.G. **New bat of genus *Lophostoma* (Phyllostomidae: Phyllostominae) from Northwestern Ecuador.** Occas Pap Mus Texas Tech Univ, 232, 1-16. 2004.

BAKER, R.J.; GARDNER, A.L.; PATTON, J.L. **Chromosomal polymorphism in the Phyllostomatid bat, *Mimon crenulatum* (Geoffroy).** Experientia 28:969–970. 1972.

BAKER, R.J.; GENOWAYS, H.H.; SEYFARTH, P.A. **Results of the Alcoa Foundation-Suriname Expeditions. VI. Additional chromosomal data for bats (Mammalia: Chiroptera) from Suriname.** Ann Carnegie Mus Nat Hist 50:333–344. 1981.

BAKER, R.J.; HAIDUK, M.W.; ROBBINS, L.W.; CADENA, A.; KOOP, B. **Chromosomal studies of South American bats and their systematic implications.** In: MARES, M.A.; GENOWAYS, H.H. (Eds) Mammalian biology in South America. Volume 4. Special Publication Series, Pymatuning Laboratory of Ecology VI: Pittsburgh, pp 303–327. 1982.

BAKER, R.J.; HAMILTON, M.; PARISH, D.A. **Preparations of Mammalian karyotypes under field conditions.** Lubbock, Texas, USA: Occas Pap Mus Texas Tech Univ 228:17. 2003a.

BAKER, R.J.; HOOFER, S.R.; PORTER, C.A.; VAN DEN BUSSCHE, R.A. **Diversification among new world leaf-nosed bats: an evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence.** Lubbock, Texas, USA: Occas Pap Mus Texas Tech Univ 230:1–32. 2003b.

BAKER, R.J.; SOLARI, S.; CIRRANELLO, A.; SIMMONS, N.B. **Higher level classification of phyllostomid bats with a summary of DNA synapomorphies.** Acta Chiropterologica 18:1–38. 2016.

BARKER, R.J. **Karyotypes of bats of the family Phyllostomidae and their taxonomic implications.** Southwest Nat 12:407–428. 1967.

BARQUEZ, R.M.; MARES, M.A.; BRAUN, J.K. **The bats of Argentina.** Lubbock, Texas, USA: Spec Publ Mus Texas Tech Univ. v.42, 288 pp. 1999.

BARROS, H.M.D.R.; SOTERO-CAIO, C.G.; SANTOS, N.; SOUZA, M.J. **Comparative cytogenetic analysis between *Lonchorhina aurita* and *Trachops cirrhosus*. (Chiroptera, Phyllostomidae).** Genet Mol Biol 32:748-752. 2009.

BASANTES, M.; TINICO, N.; VELAZCO, P.M.; HOFMANN, M.J.; RODRÍGUEZ-POSADA, M.E.; CAMACHO, M.A. **Systematics and Taxonomy of *Tonatia saurophila* Koopman & Williams, 1951 (Chiroptera, Phyllosyomidae).** ZooKeys 915:59-86. 2020.

BENATHAR, T.C.M.; NAGAMACHI, C.Y.; RODRIGUES, L.R.R.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A.; YANG, F.; PIECZARKA, J.C. **Karyotype, evolution and phylogenetic reconstruction in Micronycterinae bats with implications for the ancestral karyotype of Phyllostomidae.** BMC Evol. Biol 19:98. 2019.

BERNARD, E. **Diet, activity and reproduction of bat species (Mammalia, Chiroptera) in Central Amazonia, Brazil.** Rev Bras Zool 19:173-188. 2002.

BERNT, M.; DONATH, A.; JÜHLING, F.; EXTERNBRINK, F.; FLORENTZ, C.; FRITZSCH, G.; PÜTZ, J.; MIDDENDORF, M.; STADLER, P.F. **MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation.** Mol Phylogenet Evolut 69:313-319. 2013.

BICKHAM, J.W.; BAKER, R.J. **Implications of chromosomal variation in *Rhogeessa* (Chiroptera: Vespertilionidae).** J Mammal 58:448–453. 1977.

BOTERO-CASTRO, F.; TILAK, M.; JUSTY, F.; CATZEFLIS, F.; DELSUC, F.; DOUZERY, E.J.P. **In Cold Blood: Compositional Bias and Positive Selection Drive the High Evolutionary Rate of Vampire Bats Mitochondrial Genomes.** Genome Biol Evol. 10:2218-2239. 2018.

BOTERO-CASTRO, F.; TILAK, M.; JUSTY, F.; CATZEFLIS, F.; DELSUC, F.; DOUZERY, E.J.P. **Next generation sequencing and phylogenetic signal of complete mitochondrial genomes for resolving the evolutionary history of leaf-nosed bats (Phyllostomidae).** Mol Phylogenet Evol, 69: 728–739. 2013.

BURGIN, C.J.; COLELLA, J.P.; KAHN, P.L.; UPHAM, N. **How many species of mammals are there?** J Mammal 99:1-14. 2018.

CABANNE, G.S.; SANTOS, F.R.; MIYAKI, C.Y. **Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): Vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest.** Biol J Linn Soc 91:73-84. 2007.

CAMACHO, M.A.; CHÁVEZ, D.; BURNEO, S.F. **A taxonomic revision of the Yasuni Round-eared bat, *Lophostoma yasuni* (Chiroptera: Phyllostomidae).** Zootaxa 4114:246-260. 2016.

- CHAN, P.P.; LOWE, T.M. **tRNAscan-SE: Searching for tRNA Genes in Genomic Sequences.** *Methods Mol Biol.* 1962:1-14. 2019.
- CIRRANELLO, A.; SIMMONS, N.B.; SOLARI, S.; BAKER, R.J. **Morphological diagnoses of higher-level phyllostomid taxa (Chiroptera: Phyllostomidae).** *Acta Chiropterologica*, 18:39–71. 2016.
- CLARE, E.L.; LIM, B.K.; FENTON, M.B.; HEBERT, P.D. **Neotropical bats: estimating species diversity with DNA barcodes.** *PLoS One* 6:e22648. 2011.
- COSTA, L.P. **The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals.** *J Biogeography* 30:71-86. 2003.
- DATZMANN, T.; HELVERSEN, O. VON.; MAYER, F. **Evolution of nectarivory in phyllostomid bats.** *BMC Evol Biol* 10:165. 2010.
- DÁVALOS, L.M.; CIRRANELLO, A.L.; GEISLER, J.H.; SIMMONS, N.B. **Understanding phylogenetic incongruence: lessons from phyllostomid bats.** *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 87:991–1024. 2012.
- DÁVALOS, L.M.; VELAZCO, P.M.; WARSI, O.M.; SMITS, P.D.; SIMMONS, N.B. **Integrating incomplete fossils by isolating conflicting signal in saturated and non-independent morphological characters.** *Syst Biol*, 63:582–600. 2014.
- DIERCKXSENS, N.; MARDULYN, P.; SMITS, G. **NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data.** *Nucleic Acids Research* 45: e18. 2017.
- DITCHFIELD, A.D. **The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals.** *Mol Ecol* 9:1307–1318. 2000.
- DUMONT, E.R.; DÁVALOS, L.M.; GOLDBERG, A.; SANTANA, S.E.; REX, K.; VOIGT, C.C. **Morphological innovation, diversification and invasion of a new adaptive zone.** *Proc R Soc* 279B: 1797–1805. 2012.
- ESBÉRARD, C.E.L.; BERGALLO, H.G. **Biological aspects of *Tonatia bidens* (Spix) in Rio de Janeiro State, southeastern Brazil (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae).** *Rev Bras de Zool* v.21, n.2. Curitiba, p.253-259. 2004.
- FERGUSON-SMITH, M.A.; TRIFONOV, V. **Mammalian karyotype evolution.** *Nat Rev Genet* 8:950–962. 2007.
- FERGUSON-SMITH, M.A.; YANG, F.; O'BRIEN, P.C.M. **Comparative Mapping Using Chromosome Sorting and Painting.** *ILAR J* 39:68-76. 1998.
- FERNANDEZ-SILVA, P.; ENRIQUEZ, J.A.; MONTOYA, J. **Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA.** *Exp. Physiol.* 88: 41–56. 2003.

FOUQUET, A.; LOEBMANN, D.; CASTROVIEJO-FISHER, S.; PADIAL, J.M.; ORRICO, V.G.; LYRA, M.L.; ROBERTO, I.J.; KOK, P.J.; HADDAD, C.F.; RODRIGUES, M.T. **From Amazonia to the Atlantic forest: molecular phylogeny of Phyzelaphryninae frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges.** *Mol Phylogenet Evol* 65:547-61. 2012.

GARDNER, A. **Chromosomal variation in *Vampyressa* and a review of chromosomal evolution in the Phyllostomidae (Chiroptera).** *Syst Zool* 26:300 - 18. 1977.

GARDNER, A. **Mammals of South America: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats.** Univ Chicago Press, Chicago, 669 pp. 2007.

GENOWAYS, H.H.; WILLIAMS, S.L. **Results of the Alcoa Foudation-Suriname Expeditions. I. A new species of bat of genus *Tonatia* (Mammalia: Phyllostomidae).** *Ann Carnegie Mus*, 49:203-211. 1980.

GIANNINI, N.P.; KALKO, E.K.V. **Trophic structure in a large assemblage of phyllostomid bats in Panama.** *Oikos*. v.105. Lund, p.209-220. 2004.

GISSI, C.; LANNELLI, F.; PESOLE, G. **Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species.** *Heredity* 101:301–320. 2008.

GOMES, A.J.B.; NAGAMACHI, C.Y.; RODRIGUES, L.R.R.; BENATHAR, T.C.M.; RIBAS, T.F.A.; O'BRIEN, P.C.M.; YANG, F.; FERGUSON-SMITH, M.A.; PIECZARKA, J.C. **Chromosomal phylogeny of Vampyressine bats (Chiroptera, Phyllostomidae) with description of two new sex chromosome systems.** *BMC Evol Biol* 16:119. 2016.

GOMES, A.J.B.; NAGAMACHI, C.Y.; RODRIGUES, L.R.R.; FARIAS, S.G.; RISSINO, J.D.; PIECZARKA, J.C. **Karyotypic variation in *Rhinophylla pumilio* Peters, 1865 and comparative analysis with representatives of two subfamilies of Phyllostomidae (Chiroptera).** *Comp Cytogen* 6:213–225. 2012.

GOMES, A.J.B.; NAGAMACHI, C.Y.; RODRIGUES, L.R.R.; FERGUSON-SMITH, M.A.; YANG, F.; O'BRIEN, P.C.M.; PIECZARKA, J.C. **Chromosomal evolution and phylogeny in the Nullicauda group (Chiroptera, Phyllostomidae): evidence from multidirectional chromosome painting.** *BMC Evol Biol* 18:62. 2018.

GREINER, S.; LEHWARK, P.; BOCK, R. **OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes.** *Nucleic Acids Res* 47:59-64. 2019.

HEBERT, P.D.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. **Biological identifications through DNA barcodes.** *Proc Biol Sci* 270:313–321. 2003.

HELM, M.; BRULE, H.; FRIEDE, D.; GIEGE, R.; PUTZ, D.; FLORENTZ, C. **Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs.** RNA 6:1356–1379. 2000.

HOFFMANN, F.G.; BAKER, R.J. **Systematics of bats of the genus *Glossophaga* (Chiroptera: Phyllostomidae) and phylogeography in *G. soricina* based on the cytochrome-*b* gene.** J Mammal 82:1092–1101. 2001.

HOFFMANN, F.G.; HOOVER, S.R.; BAKER, R.J. **Molecular dating of the diversification of Phyllostominae bats based on nuclear and mitochondrial DNA sequences.** Mol Phylogenet Evol 49:653–658. 2008.

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

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. **Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method.** Experientia 36:1014–1015. 1980.

HUMPHREY, S.R.; BONACCORSO, F.J.; ZINN T.L. **Guild structure of surface gleaning bats in Panama.** Ecology, v.64, Tempe, p.284–294. 1983.

HURTADO, N.; D'ELÍA, G. **Taxonomy of the genus *Gardnerycteris* (Chiroptera: Phyllostomidae).** Acta Chiropterol 20:99–115. 2018.

HURTADO-MIRANDA, N.E.; PACHECO-TORRES, V. **Análisis filogenético del género *Mimon* Gray, 1847 (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) con la descripción de un nuevo género.** Therya 5:751–791. 2014.

JONES, G.; TEELING, E.C. **The evolution of echolocation in bats.** Trends Ecol Evol 21:149–156. 2006.

KACPRZYK, J.; TEELING, E.C.; KELLEHER, C.; VOLLETH, M. **Wing membrane biopsies for bat cytogenetics: Finding of $2n = 54$ in Irish *Rhinolophus hipposideros* (Rhinolophidae, Chiroptera, Mammalia) supports two geographically separated chromosomal variants in Europe.** Cytogenet Genome Res 148:279–283. 2016.

KOOPMAN, K.F. **Zoogeography.** In: BAKER, R.J.; JONES, J.K.; CARTER, D.C. (eds) Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae. Part III. Spec Publi Mus Texas Tech Univ 16:1–441. 1976.

KULEMZINA, A.; NIE, W.; TRIFONOV, V.; STAROSELEC, Y.; VASENKOV, D.; VOLLETH, M.; YANG, F.; GRAPHODATSKY, A. **Comparative chromosome painting of four Siberian Vespertilionidae species with *Aselliscus stoliczkanus* and human probes.** Cytogenet Genome Res 134:200–205. 2011.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. **MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms**. Mol Biol Evol 35:1547–1549. 2018.

LEE-JR, T.E.; HOOFFER, S.R.; VAN DEN BUSSCHE, R.A. **Molecular phylogenetics and taxonomic revision of the genus *Tonatia* (Chiroptera: Phyllostomidae)**. J Mammal 83:49–57. 2002.

LÓPEZ-BAUCELLS, A.; ROCHA, R.; BOBROWIEC, P.; BERNARD, E.; PALMEIRIM, J.; MEYER, C. **Field Guide to Amazonian Bats**. Editora INPA, Manaus, 168 pp. 2016.

LÓPEZ-WILCHIS, R.; DEL RÍO-PORTILLA, M.A.; GUEVARA-CHUMACERO, L.M. **Mitochondrial genome of *Pteronotus personatus* (Chiroptera: Mormoopidae): comparison with selected bats and phylogenetic considerations**. Genetica 145:27–35. 2017.

LUKHTANOV, V.A.; IASHENKOVA, Y. **Linking karyotypes with DNA barcodes: proposal for a new standard in chromosomal analysis with an example based on the study of Neotropical Nymphalidae (Lepidoptera)**. Comp Cytogen 13:435-449. 2019.

LUO, S.; VALENCIA, C.A.; ZHANG, J.; LEE, N-C.; SLONE, J.; GUI, B.; WANG, X.; LI, Z.; DELL, S.; BROWN, J. *et al.* **Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans**. Proc Natl Acad Sci USA. 115:13039–13044. 2018.

MAO, X.; NIE, W.; WANG, J.; SU, W.; AO, L.; FENG, Q.; WANG, Y.; VOLLETH, M.; YANG, F. **Karyotype evolution in *Rhinolophus* bats (Rhinolophidae, Chiroptera) illuminated by cross-species chromosome painting and G-banding comparison**. Chromosom Res 15:835–848. 2007.

MARTINS, F.M.; MEYER, D.; DITCHFIELD, A.D.; MORGANTE, J.M. **Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae)**. J Zool Syst Evol Res 45:372-378. 2007.

MARTINS, F.M.; TEMPLETON, A.R.; PAVAN, A.C.; KOHLBACH, B.C.; MORGANTE, J.S. **Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers**. BMC Evol Biol 9:294. 2009.

MARTUSCELLI, P. **Avian Predation by the Round-Eared Bat (*Tonatia bidens*, Phyllostomidae) in the Brazilian Atlantic Forest**. J Trop Ecol. 11:461-464. 1995.

MEGANATHAN, P.R.; PAGAN, H.J.T.; MCCULLOCH, E.S.; STEVENS, R.D.; RAY, D.A. **Complete mitochondrial genome sequences of three bats species and whole genome mitochondrial analyses reveal patterns of codon bias and lend support to a basal split in Chiroptera**. Gene 492:121–129. 2012.

MEREDITH, R.W.; JANEČKA, J.E.; GATESY, J.; RYDER, O.A.; FISHER, C.A.; TEELING, E.C.; GOODBLA, A.; EIZIRIK, E.; SIMÃO, T.L.; STADLER, T. **Diversification among new world leaf-nosed bats: an evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence.** Science 334:521–524. 2011.

MORIELLE-VERSUTE, E.; TADDEI, V.A.; VARRELLA-GARCIA, M. **Chromosome banding studies of *Chrotopterus auritus* (Chiroptera, Phyllostomidae).** Rev Brasil Genet 15:569-573. 1992.

NOGUEIRA, M.R.; LIMA, I.P.; GARBINO, G.S.T.; MORATELLI, R.; TAVARES, V.C.; GREGORIN, R.; PERACCHI, A.L. **Updated checklist of Brazilian bats: version 2018.1.** Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. 2018. Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (Sbeq). <http://www.sbeq.net/updatelist> (20 de dezembro, 2019).

NOGUEIRA, M.R.; LIMA, I.P.; MORETELLI, R.; TAVARES, V.C.; GREGORIN, R.; PERACCHI, A.L. **Checklist of Brazilian bats, with comments on original records.** Check List 10:808-821. 2014.

O'BRIEN, S.J.; MENOTTI-RAYMOND, M.; MURPHY, W.J.; NASH, W.G.; WIENBERG, J.; STANYON, R.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; WOMACK, J.E.; GRAVES, J.A.M. **The Promise of Comparative Genomics in Mammals.** Science, New Series, 286:458-462. 1999.

PACA, R.C.; ACOSTA, L.H.; AGUANTA, F.S. **Primer registro de *Tonatia bidens* (Spix, 1823) (Chiroptera: Phyllostomidae), en Bolívia.** Chirop Neotrop 18: 1063-1066. 2012.

PAGLIA, A.P.; FONSECA, G.; RYLANDS, A.B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L.M.S.; CHIARELLO, A.G.; LEITE, Y.L.R.; COSTA, L.P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M.C.M. *et al.* **Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals.** 2ª Edição / 2nd Edition. Occasional Papers in Conservation Biology, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. 76p. 2012.

PARISH, D.; VISE, P.; WICHMAN, H.; BULL, J.; BAKER, R. **Distribution of LINEs and other repetitive elements in the karyotype of the bat *Carollia*: Implications for X-chromosome inactivation.** Cytogenet Genome Res 96:191–197. 2002.

PARLOS, J.A.; TIMM, R.M.; SWIER, V.J.; ZEBALLOS, H.; BAKER, R.J. **Evaluation of paraphyletic assemblages within Lonchophyllinae, with description of a new tribe and genus.** Lubbock, Texas, USA: Occas Pap Mus Texas Tech Univ 320:1–23. 2014.

PATTON, J.C.; BAKER, R.J. **Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoid bats.** Syst Zool 27:449–462. 1978.

PERNA, N.T.; KOCHER, T.D. **Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes.** J Mol Evol 41:353–358. 1995.

PIECZARKA, J.C.; GOMES, A.J.; NAGAMACHI, C.Y.; ROCHA, D.C.; RISSINO, J.D.; O'BRIEN, P.C.; YANG, F.; FERGUSON-SMITH, M.A. **A phylogenetic analysis using multidirectional chromosome painting of three species (*Uroderma magnirostrum*, *U. bilobatum* and *Artibeus obscurus*) of subfamily Stenodermatinae (Chiroptera-Phyllostomidae).** Chromosom Res 21:383–392. 2013.

PIECZARKA, J.C.; NAGAMACHI, C.Y.; O'BRIEN, P.C.; YANG, F.; RENS, W.; BARROS, R.M.S.; NORONHA, R.C.; RISSINO, J.; DE OLIVEIRA, E.H.; FERGUSON-SMITH, M.A. **Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera).** Chromosom Res 13:339–347. 2005.

PORTER, C.; HOOVER, S.; VAN DEN BUSSCHE, R.; LEE, T.; BAKER, R.; **Systematics of round-eared bats (*Tonatia* and *Lophostoma*) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences.** J Mammal 84:791–808. 2003.

PUMO, D.E.; FINAMORE, P.S.; FRANEK, W.R.; PHILLIPS, C.J.; TARZAMI, S.; BALZARANO, D. **Complete mitochondrial genome of a neotropical fruit bat, *Artibeus jamaicensis*, and a new hypothesis of the relationships of bats to other Eutherian mammals.** J Mol Evol 47:709–717. 1998.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L. **Quirópteros da região de Manaus, Amazonas, Brasil (Mammalia, Chiroptera).** Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Zoologia. v.3. Belém, p.161-182. 1987.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Morcegos do Brasil.** Londrina, pp 253. 2007.

RIBAS, T.; RODRIGUES, L.; NAGAMACHI, C.; GOMES, A.; RISSINO, J.; O'BRIEN, P.; YANG, F.; FERGUSON-SMITH, M.; PIECZARKA, J. **Phylogenetic reconstruction by cross-species chromosome painting and G-banding in four species of Phyllostomini tribe (Chiroptera, Phyllostomidae) in the Brazilian Amazon: An independent evidence for monophyly.** PLoS ONE 10:e0122845. 2015.

RIBAS, T.F.; RODRIGUES, L.R.; NAGAMACHI, C.Y.; GOMES, A.J.; BENATHAR, T.C.; YANG, F.; FERGUSON-SMITH, M.A.; PIECZARKA, J.C. **Two new cytotypes reinforce that *Micronycteris hirsuta* Peters, 1869 does not represent a monotypic taxon.** BMC Genet 14:119. 2013.

RIBEIRO, N.A.B.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C.; RISSINO, J.D.; NEVES, A.C.B.; GONÇALVES, A.C.O.; MARQUES-AGUIAR, S.; ASSIS, M.F.L.; BARROS, R.M.S. **Cytogenetic analysis in species of the subfamily Glossophaginae (Phyllostomidae-Chiroptera) supports a polyphyletic origin.** Caryologia 56:85–95. 2003.

- Richards, L.R.; Rambau, R.V.; Lamb, J.M.; Taylor, P.J.; Yang, F.; Schoeman, M.C.; Goodman, S.M. **Cross-species chromosome painting in bats from Madagascar: The contribution of Myzopodidae to revealing ancestral syntenies in Chiroptera.** *Chromosom Res* 18:635–653. 2010.
- Rivas-Pava, P.; Sánchez-Palomino, P.; Cadena, A. **Estructura trófica de la comunidad de quirópteros en bosques de galería de la serranía de La Macarena (Meta-Colombia).** *In: Contributions in Mammalogy: A memorial volume Honoring Dr. J. Knox Jones, Jr.* Austin: Mus Texas Tech Univ, Lubbock pp 237-248. 1996.
- RODRIGUES, L.R.R.; BARROS, R.M.S.; ASSIS, M.F.L.; MARQUES-AGUIAR, S.A.; PIECZARKA, J.C.; NAGAMACHI, C.Y. **Chromosome comparison between two species of *Phyllostomus* (Chiroptera – Phyllostomidae) from Eastern Amazonia, with some phylogenetic insights.** *Genet Mol Biol* 23:595-599. 2000.
- ROJAS, D.; VALE, A.; FERRERO, V.; NAVARRO, L. **When did plants become important to leaf-nosed bats? Diversification of feeding habits in the family Phyllostomidae.** *Mol Ecol* 20:2217–2228. 2011.
- ROJAS, D.; WARSI, O.M.; DAVALOS, L.M. **Bats (Chiroptera: Noctilionoidea) challenge a recent origin of extant Neotropical diversity.** *Syst Biol* 65:432-448. 2016.
- ROKAS, A.; HOLLAND, P.W.H. **Rare genomic changes as a tool for phylogenetics.** *Science* 15:454–459. 2000.
- SANTO, 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* 51:60. 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.
- SANTOS, N.; FAGUNDES, V.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; SOUZA, M.J. **Comparative karyology of brazilian vampire bats *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata* (Phyllostomidae, Chiroptera): Banding patterns, base-specific fluorochromes and FISH of ribosomal genes.** *Hereditas* 134:189–194. 2001.
- SANTOS, N.; FAGUNDES, V.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; SOUZA, M.J. **Localization of rRNA genes in Phyllostomidae bats reveals silent NORs in *Artibeus cinereus*.** *Hereditas* 136:137–143. 2002.
- SCHERTHAN, H.; CREMER, T.; ARNASON, U.; WEIER, H.U.; LIMA-DE-FARIA, A.; FRÖNICKE, L. **Comparative chromosome painting discloses homologous segments in distantly related mammals.** *Nature Genetics* 6:342-347. 1994.

- SILES, L.; RIOS, R.S. **Family Phyllostomidae Gray 1825 (Chiroptera): Summary 2000 to 2018.** In: BRADLEY, R.D.; GENOWAYS, H.H.; SCHMIDLY, D.J.; BRADLEY, L.C. (Eds) From Field to Laboratory: A Memorial Volume in Honor of Robert J. Baker. Number 71. Spec Publ Mus Texas Tech Univ, Lubbock, pp 131–147. 2019.
- SILVA, A.M.; MARQUES-AGUIAR, S.A.; BARROS, R.M.S.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C. **Comparative cytogenetic analysis in the species *Uroderma magnirostrum* and *U. bilobatum* (cytotype 2n = 42) (Phyllostomidae, Stenodermatinae) in the Brazilian Amazon.** Genet Mol Biol 28:248-253. 2005.
- SIMMONS, N.B.; GEISLER, J.H. **Phylogenetic relationships of *Icaronycteris*, *Archaeonycteris*, *Hassianycteris*, and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in Microchiroptera.** Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 235, 1–182. 1998.
- SIMMONS, N.B. **Order Chiroptera.** In: Wilson D and Reeder D (eds) Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. 3rd edition. Johns Hopkins Univ Press: Baltimore, pp 312–529. 2005.
- SOLARI, S.; MARTÍNEZ-ARIAS, V. **Cambios recientes en la sistemática y taxonomía de murciélagos neotropicales (Mammalia: Chiroptera).** Therya 5:167–196. 2014.
- SOLARI, S.; SOTERO-CAIO, C.G.; BAKER, R.J. **Advances in systematics of bats: towards a consensus on species delimitation and classifications through integrative taxonomy.** J Mammal 100:838-51. 2019.
- SOTERO-CAIO, C.G.; BAKER, R.J.; VOLLETH, M. **Chromosomal Evolution in Chiroptera.** Genes 8:272. 2017a.
- SOTERO-CAIO, C.G.; CABRAL-DE-MELLO, D.; CALIXTO, M.S.; VALENTE, G.T.; MARTINS, C.; LORETO, V.; SOUZA, M.J.; SANTOS, N. **Centromeric enrichment of LINE-1 retrotransposons and its significance for the chromosome evolution of phyllostomid bats.** Chromosom Res 25:313-325. 2017b.
- SOTERO-CAIO, C.G.; PIECZARKA, J.C.; NAGAMACHI, C.Y.; GOMES, A.J.B.; LIRA, T.C.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A.; SOUZA, M.J.; SANTOS, N. **Chromosomal homologies among vampire bats revealed by chromosome painting (Phyllostomidae, Chiroptera).** Cytogenet Genome Res 132:156–164. 2011.
- SOTERO-CAIO, C.G.; VOLLETH, M.; GOLLAHON, L.S.; FU, B.; CHENG W, NG, B.L.; YANG, F.; BAKER, R.J. **Chromosomal evolution among leaf-nosed nectarivorous bats—Evidence from cross-species chromosome painting (Phyllostomidae, Chiroptera).** BMC Evol Biol 13:276. 2013.
- SOTERO-CAIO, C.G.; VOLLETH, M.; HOFFMANN, F.G.; SCOTT, L.; WICHMAN, H.A.; YANG, F.; BAKER, R.J. **Integration of molecular cytogenetics, dated**

molecular phylogeny, and model-based predictions to understand the extreme chromosome reorganization in the neotropical genus *Tonatia* (Chiroptera: Phyllostomidae). BMC Evol Biol 15:220. 2015.

SOUZA, E.M.S.; GROSS, M.C.; SILVA, C.E.F.; SOTERO-CAIO, C.G.; FELDBERG, E. **Heterochromatin variation and LINE-1 distribution in *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae) from central amazon, Brazil.** Comp Cytogenet 11:613-623. 2017.

TAVARES, J.R.; SOUSA, T.P.; SILVA, J.M.; VENERE, P.C.; FARIA, K.C. **Cytogenetics and DNA barcoding of the round eared bats, *Tonatia* (Chiroptera: Phyllostomidae): a new karyotype for *Tonatia bidens*.** Zoologia 32:371– 379. 2015.

TAVARES, V.C; WARSI, O.M.; BALSEIRO, F.; MANCINA, C.A.; DÁVALOS, L.M. **Out of the Antilles: Fossil phylogenies support reverse colonization of bats to South America.** J Biogeogr. 45:859–873. 2018.

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

TEELING, E.C.; VERNES, S.C.; DÁVALOS, L.M.; RAY, D.A.; GILBERT, M.T.P.; MYERS, E.; BAT1K CONSORTIUM. **Bat biology, genomes, and the Bat1K project: to generate chromosome-level genomes for all living bat species.** Annu Rev Anim Biosci 6:23-46. 2018.

TUCKER, P.K.; BICKHAM, J.W. **Sex chromosome-autosome translocations in the leaf-nosed bats family Phyllostomidae. II. Meiotic analyses of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae.** Cytogenet Cell Genet 43:28-37. 1986.

UPHAM, N.S.; ESSELSTYN, J.A.; JETZ, W. **Inferring the mammal tree: Species-level sets of phylogenies for questions in ecology, evolution, and conservation.** Plos Biol 17:e3000494. 2019.

VARELLA-GARCIA, M.; VERSUTE, E.M.; TADDEI, V.A. **A survey of cytogenetic data on Brazilian bats.** Rev Bras Genét 12:761–793. 1989.

VELAZCO, P.M.; CADENILLAS, R. **On the identity of *Lophostoma silvicolum occidentale* (Davis & Carter, 1978) (Chiroptera: Phyllostomidae).** Zootaxa, 2962:1–20. 2011.

VELAZCO, P.M.; GARDNER, A.L.; PATTERSON, B.D. **Systematics of the *Platyrrhinus helleri* species complex (Chiroptera: Phyllostomidae), with description of two new species.** Zool J Linnean Soc 159:785–812. 2010.

VOLLETH, M.; HELLER, K.G.; PFEIFFER, R.A.; HAMEISTER, H.A. **Comparative Zoo-FISH analysis in bats elucidates the phylogenetic relationships between**

Megachiroptera and five Microchiropteran families. Chromosom Res 10:477-497. 2002.

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

VOLLETH, M.; SON, N.T.; WU, Y.; LI, Y.; YU, W.; LIN, L.K.; ARAI, S.; TRIFONOV, V.; LIEHR, T.; HARADA, M. **Comparative chromosomal studies in *Rhinolophus formosae* and *R. luctus* from China and Vietnam: Elevation of *R. l. lanosus* to species rank.** Acta Chiropt 19:41–50. 2017.

WETTERER, A.L.; ROCKMAN, M.V.; SIMMONS, N.B. **Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes and restriction sites.** New York, NY, USA: Bull Am Mus Nat Hist 248:1–200. 2000.

White, M.J.D. **Chromosome repatterning-regularities and restrictions.** Genetics 79:63-72. 1975.

WIENBERG, J.; JAUCH, A.; STANYON, R.; CREMER, T. **Molecular cytotaxonomy of primates by chromosomal in situ suppression hybridization.** Genomics 8:347-350. 1990.

WILLIAMS, S.L.; WILLIG, M.R.; REID, F.A. **Review of the *Tonatia bidens* complex (Mammalia: Chiroptera), with descriptions of two new subspecies.** J Mammal 76:612- 626. 1995.

YANG, F.; CARTER, N.P.; SHI, L.; FERGUSON-SMITH, M.A. **A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting.** Chromosoma 103:642–652. 1995.

YANG, F.; GRAPHODATSKY, A.S.; LI, T.; FU, B.; DOBIGNY, G.; WANG, J.; PERELMAN, P.L.; SERDUKOVA, N.A.; SU, W.; O'BRIEN P.C.M. *et al.* **Comparative genome maps of the pangolin, hedgehog, sloth, anteater and human revealed by cross-species chromosome painting: further insight into the ancestral karyotype and genome evolution of eutherian mammals.** Chromosome Res 14:283-296. 2006.

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

Yonenaga-Yassuda, Y. **Contribuição da FISH à Citogenética de Mamíferos e Répteis.** In: GUERRA, M. (eds) FISH – Conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, pp 89-111. 2004.

ZIMA, J.; VOLLETH, M.; HORÁČEK, I.; CERVENY, J.; CERVENA, A.; PRUCHA, K.; MACHOLAN, M. **Comparative karyology of rhinolophid bats (Chiroptera:**

Rhinolophidae). *In:* HORÁČEK, I.; VOHRALIK, V. (eds) *Prague Studies in Mammal*. Charles Univ Press, Prague, pp 229–236. 1992.

APÊNDICE A - NÚMERO DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS DO GENE COI.

Espécies	Número de acesso GenBank					
<i>Tonatia saurophila</i>	JF449244	JF449240	JF449246	KR921590	JF455971	EU097052
<i>T. bidens</i>	M829	KR921585				
<i>Micronycteris nicefori</i>	JF447753	EF080785				
<i>Trachops cirrhosus</i>	JQ601202	HQ919699				
<i>Gardnerycteris crenulatum</i>	JF454999	JF455005				
<i>Phyllostomus hastatus</i>	JF459228	JF447430				
<i>P. discolor</i>	KR921293	KR921592	KR921591			
<i>Macrophyllum macrophyllum</i>	JF454932	JF454931				
<i>Phylloderma stenops</i>	HQ919735	HQ545674				
<i>Lophostoma brasiliense</i>	JF499025	JF499024				
<i>L. carrikeri</i>	JF454818	JF447661				
<i>L. schulzi</i>	EF080420	EU096769				
<i>L. evotis</i>	JF447263	JF446800				
<i>L. sivicolum</i>	KR921588	KR921589	KR921589	KR921587		
<i>Diphylla ecaudata</i>	JF448842	JF447244				
<i>Chrotopterus auritus</i>	HQ545685	HQ545442				
<i>Vampyrum spectrum</i>	EU097074	JF449362	JF449361			
<i>Desmodus rotundus</i>	HQ545487	JQ600003				
<i>Diaemus youngi</i>	JF447635	HQ545471				

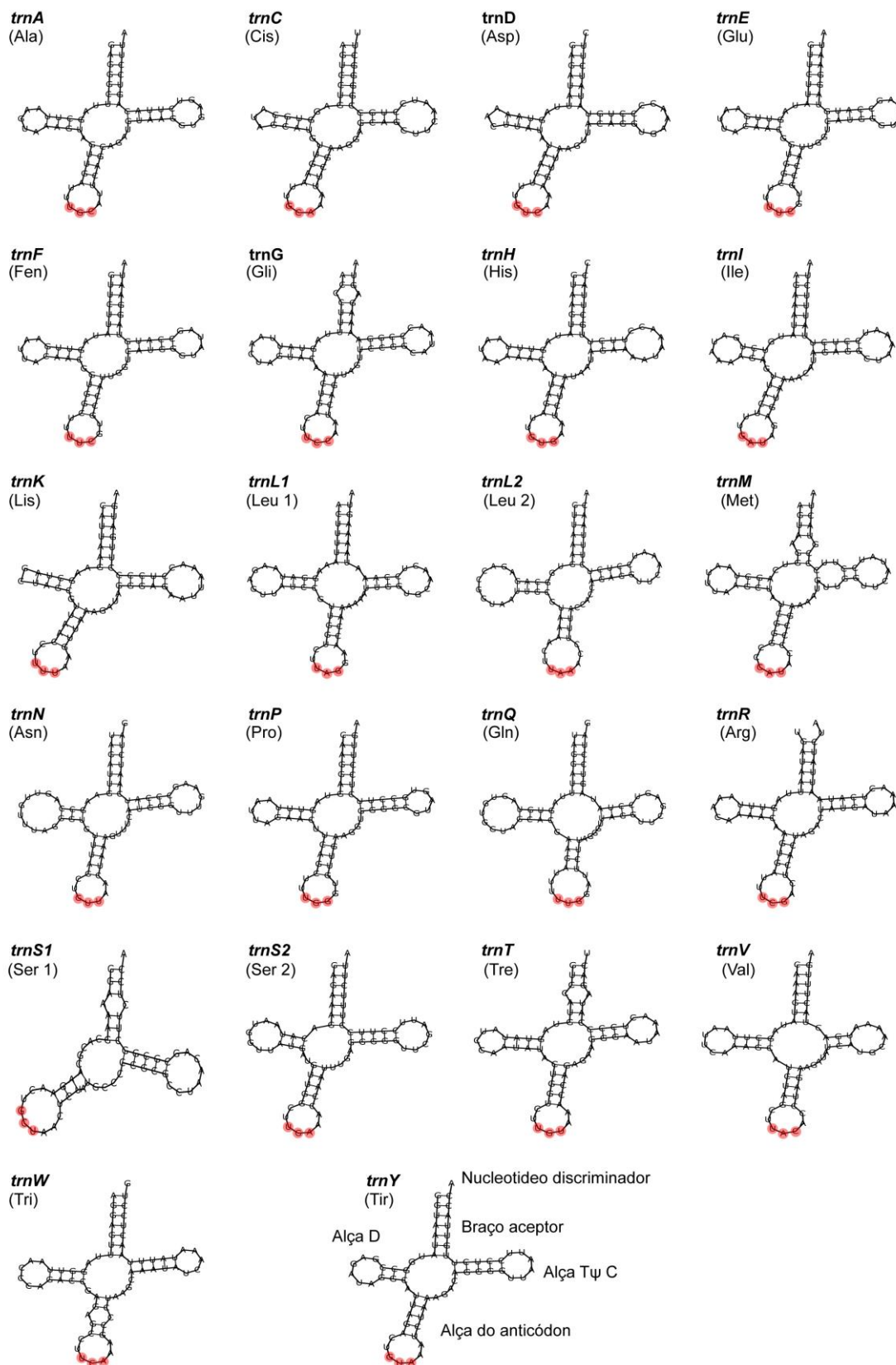
Nota: Amostras em negrito têm o cariótipo associado a sequência. Em verde sequência obtida no presente estudo.

APÊNDICE B - NÚMERO DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS DO GENE CYT-B E DO FRAGMENTO CONCATENADO RNAr 12S-16S – RNAt^{Val} SEPARADOS POR TÁXON E LOCALIZAÇÃO.

Espécies	Localização	GenBank número de acesso	
		rRNA– tRNA	cyt-b
<i>Chrotopterus auritus</i>	Suriname: Para		FJ155481
	Peru: Cusco	AF411538	
	Não informado		KC783057
<i>Desmodus rotundus</i>	Honduras: Atlântida		FJ155477
	México: Guerrero	AF263228	
<i>Diaemus youngi</i>	El Salvador: La Paz*	AF411534	FJ155475
<i>Diphylla ecaudata</i>	México: Yucatan		FJ155476
	México: Yucatan	AF411533	
<i>Gardnerycteris crenulatum</i>	Trinidade e Tobago: Trinidad*	AF411543	FJ155478
<i>Lophostoma brasiliense</i>	Guiana: Alto Takutu- Alto Essequibo		FJ155486
	Guiana Francesa	AF411544	
	Panamá		JF923842
<i>L. carrikeri</i>	Guiana: Potaro–Siparuni		JF923843
	Guiana: Potaro–Siparuni		JF923844
	Não informado	AF411528	
<i>L. occidentalis</i>	Peru: Tumbes		JF923847
	Equador: Esmeraldas		JF923848
<i>L. evotis</i>	México		FJ155491
	México: Campeche	AF411529	
<i>L. schulzi</i>	Guiana Francesa: Paracou		FJ155485
	Guiana: Barima-Waini*	AF411532	JF923850
<i>L. silvicola</i>	Paraguai: San Pedro*	AF442092	FJ155493
<i>L. silvicola</i>	Suriname: Marowijne	AF263230	
<i>Macrophyllum macrophyllum</i>	Venezuela: Bolívar*	AF411540	FJ155484
<i>Phylloderma stenops</i>	Guiana: Distrito Berbice		FJ155480
	Suriname: Saramac	AF411542	
<i>Phyllostomus hastatus</i>	Venezuela: Bolívar		FJ155479
	Venezuela: Bolívar	AF411541	
<i>P. elongatus</i>	Não informado		KC783056
<i>Tonatia bidens</i>	Brasil: Paraíba*	M829	M829
	Brasil: São Paulo*	AF442091	FJ155490
	Brasil: São Paulo		JF923863
	Paraguai: Dpto. San Pedro*	AF442091	FJ155489
<i>T. saurophila</i>	Guiana: Alto Takutu- Alto Essequibo		FJ155488
	Equador: Napo	AF411531	
	Guiana: Alto Demerara-Berbice	AF411530	
	Guiana: Berbice		JF923864
	Panamá: Canal Zone		FJ155487
	Suriname	AF179288	
	Guiana Francesa*	NC_022428	NC_022428
<i>Trachops cirrhosus</i>	Venezuela: Bolívar		FJ155483
	Guiana Francesa: Paracou*	AF411539	DQ233669
<i>Vampyrum spectrum</i>	Honduras: Atlântida*	AF411537	FJ155482

Nota: Asterisco representa sequências de mesmo indivíduo. Em verde sequência obtida no presente estudo.

APÊNDICE C - ESTRUTURAS DOS 22 RNAts DO MITOGENOMA DE *Tonatia bidens*.



APÊNDICE D - FILOGENIA MOLECULAR DA SUBFAMÍLIA PHYLLOSTOMINAE, CONSTRUÍDA A PARTIR DO MÉTODO DE *MAXIMUM LIKELIHOOD* VALORES DE *BOOTSTRAP* NA PARTE SUPERIOR DE CADA CLADO. (A) FILOGENIA DO GENE *cyt-b*; E (B) DO FRAGMENTO MITOCONDRIAL CONCATENADO RNAr 12S-16S – RNAt^{Val}. LOCALIZAÇÃO DOS ESPÉCIMES DO GÊNERO *Tonatia* COM SIGLAS DOS PAÍSES DESCRITAS EM PARÊNTESES: BRA – BRASIL; EQU – EQUADOR; GUI – GUIANA; GUF – GUIANA FRANCESA E PAR – PARAGUAI.

