Eliana Morielle

Variabilidade na Localização e na Atividade das Regiões Organizadoras de Nucléolos em Morcegos da Família Phyllostomidae (Mammalia, Chiroptera)

unesp

ELIANA MORIELLE

VARIABILIDADE NA LOCALIZAÇÃO E NA ATIVIDADE DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS EM MORCEGOS DA FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE (MAMMALIA, CHIROPTERA)

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Genética, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto
T- 391/88

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
1987

Orientador: Profa. Dra. Marileila Varella Garcia

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Comissão de Projetos Especiais (CPE-UNESP).

Dedico a

Décio e Santa, meus pais,
fonte de vida e amor.

"Na planta, a inteligência dormita; no animal sonha; só no homem acorda, conhece-se, possui-se e torna-se consciente".

Léon Denis

"Em todo o verdadeiro pesquisador da natureza mora uma espécie de reverência religiosa, pois ele se dá conta de que é impossível imaginar-se como sendo o primeiro a ter consciência da trama incomparavelmente delicada que une as suas percepções".

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marileila Varella Garcia, exemplo de pesquisador, pela confiança, amizade e orientação.

Ao Dr. Valdir Antonio Taddei, do Departamento de Zoologia, pela identificação dos animais analisados, pelo interesse e colaboração durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e pelas sugestões durante a análise criteriosa da pro forma.

À Dra. Yatiyo Yassuda, do Instituto de Biociências da USP, pela atenção e valiosas sugestões durante a análise da pro forma.

Aos Professores do Departamento de Biologia, pela transmissão de conhecimentos e experiências e pelo acolhimento e incentivos recebidos.

À Doutoranda Agnes Cristina Fett Conte, pelo apoio, amizade e carinho constantes.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e estagiários do Departamento, pela convivência agradável e pelas proveitosas trocas de idéias.

À mestranda Eny Maria Goloni e à Bióloga Ivana Marcondes de Rezende, pela colaboração e auxílio durante as coletas e processamento dos animais.

Ao amigo Josué Rodrigues dos Santos e demais funcionários, pela atenção e colaboração nos serviços laboratoriais e datilográficos.

Ao Dr. James Robert Coleman, pelo auxílio na revisão do Summary and Conclusions.

Ao Prof. Antonio José Manzato, pela assessoria na análise estatística.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Comissão de Projetos Especiais (CAPES-UNESP) pelo apoio financeiro.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disposição das condições financeiras.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO

I.1. Considerações gerais sobre a ordem Chiroptera..... 1
I.2. Mecanismos de evolução cromossômica 5
I.3. Estudos citogenéticos em quirópteros.....10
I.4. Regiões organizadoras de nucléolos 18
I.5. Objetivos 33

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Espécies 34
II.2. Coletas 37
II.3. Preparações cromossômicas 37
II.4. Técnicas de coloração e bandamento cromossômico 38
II.4.1. Coloração usual com Giemsa a 2%.....38
II.4.2. Técnica de bandamento G 39
II.4.3. Técnica de bandamento C 40
II.4.4. Técnica de marcação das RONs pela prata 40
II.5. Análise citogenética 41
II.6. Análise estatística 42

III. RESULTADOS

III.1. Número e localização das RONs e padrões de bandas G e C 43

III.1.1. Subfamília Phyllostominae..... 43
III.1.2. Subfamília Glossophaginae 44
III.1.3. Subfamília Carolliinae 45
III.1.4. Subfamília Stenodermatinae 46
III.1.5. Subfamília Desmodontinae 49

III.2. Freqüência de RONs marcadas por metáfase e de metáfases com associação de RONs 75
III.3. Freqüência de nucléolos interfásicos 79

IV. DISCUSSÃO

IV.1. Variação na localização e na intensidade de marcação das RONs 85
IV.2. Variação no número e posição dos nucléolos.... 90
IV.3. Variação cromossômica nas subfamílias, com ênfase para as RONs

IV.3.1. Subfamília Phyllostominae 94
IV.3.2. Subfamília Glossophaginae 96
IV.3.3. Subfamília Carolliinae 100
IV.3.4. Subfamília Stenodermatinae 101
IV.3.5. Subfamília Desmodontinae 106

V. RESUMO E CONCLUSÕES 109

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS 114

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 119

I. INTRODUÇÃO

I.1. Considerações gerais sobre a ordem Chiroptera

Os morcegos, animais pertencentes a ordem Chiroptera, apresentam características morfológicas e fisiológicas que os tornam aptos ao vôo verdadeiro e lhes permite explorar o meio aéreo, em que o número de predadores e competidores é relativamente menor. Essa condição e a diversidade que manifestam em relação aos hábitos alimentares devem ter sido fatores responsáveis pelo sucesso desse grupo de animais, que se expandiu por todos os continentes, só não sendo referido, de acordo com KOOPMAN (1970), nas regiões polares e ilhas bem afastadas.

Em muitas áreas tropicais e subtropicais os morcegos constituem a maior parte da fauna de mamíferos, sendo superados em número de espécies apenas pelos roedores (NOWAK & PARADISO, 1983).

A ordem Chiroptera engloba aproximadamente 900 espécies, agrupadas em 175 gêneros de 17 subfamílias e duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. A subordem Megachiroptera contém apenas uma família, a Pteropodidae, com 42 gêneros e cerca de 160 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da África, sudeste da Ásia, Austrália, Samoa e Ilhas Carolinas (KOOPMAN, 1970, 1984). A essa subordem pertencem as maiores formas de morcegos, denominadas "raposas voadoras", que podem alcançar até 1,70m de envergadura, como as espécies *Pteropus giganteus*, da India, e *Acerodon jubatus*, das Ilhas

Filipinas (WALKER, 1975).

A subordem Microchiroptera, cosmopolita, inclui 16 famílias, 9 das quais ocorrem nas Américas e têm representantes no Brasil: Emballonuridae, Noctilionidae, Mormoopidae, Phyllostomidae, Natalidae, Furipteridae, Thyropteridae, Vespertilionidae e Molossidae, sendo conhecidas no território brasileiro cerca de 150 espécies, inclusive a maior forma da subordem, *Vampyrum spectrum*, que pode atingir um metro de envergadura (TADDEI, 1983, para referências). Dessa subordem, a família Phyllostomidae, com uma distribuição geográfica bastante ampla, indo desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (JONES Jr. & CARTER, 1976), é a que possue o maior número de gêneros e espécies entre os Chiroptera neotropicais, estando subdividida em seis subfamílias: Phyllostominae, Glossophaginae, Brachyphyllinae, Carolliinae, Stenodermatinae e Desmodontinae. A subfamília Brachyphyllinae não tem representantes no Brasil.

O regime alimentar dos morcegos é diversificado, compreendendo partes florais, frutos, néctar, diversos artrópodes, pequenos vertebrados e, em alguns casos, exclusivamente sangue. Esses diferentes hábitos alimentares têm implicações variadas e são detalhados por TADDEI (1983). Na sua maioria, os quirópteros são insetívoros, desempenhando um importante papel na destruição dos insetos noturnos. Entre esses destacam-se principalmente as espécies de duas grandes famílias, Vespertilionidae e Molossidae. O hábito alimentar piscívoro é característico de três espécies de morcegos, das quais apenas uma, *Noctilio leporinus*, da subfamília Noctilionidae, ocorre no Brasil. Esses animais possuem as patas posteriores bem desenvolvidas e

munidas de fortes unhas, que os capacitam a apanhar pequenos peixes.

A família Phyllostomidae engloba animais com grande variabilidade de hábitos alimentares, como frugívoros, nectarívoros, carnívoros, onívoros e hematófagos (TADDEI, 1983, para referências). Os frugívoros assumem um importante papel na disseminação de sementes (quiropterocoria), por transportarem os frutos à distâncias variáveis a partir da fonte de alimento. Várias espécies de plantas nas regiões tropicais, algumas delas econômicas e ecologicamente importantes, têm uma participação significativa desses animais na sua dispersão. Embora seja importante o papel dos morcegos frugívoros na disseminação de sementes, muitas vezes eles podem causar danos à fruticultura, por atacarem frutos de interesse econômico. Os morcegos ncetarívoros alimentam-se de néctar, pólen e, até mesmo, partes florais. Estão representados por espécies pertencentes às subfamílias Glossophaginae e Brachyphyllinae e, em conseqüência dessa atividade alimentar, polinizam numerosas espécies de plantas. Os morcegos carnívoros predam geralmente pequenos vertebrados e são representados por quatro espécies, todas da subfamília Phyllostominae: *Trachops cirrhosus* e *Chrotopterus auritus*, que são considerados essencialmente carnívoros e *Vampyrum spectrum* e *Phyllostomus hastatus*, que são onívoros, alimentando-se de pequenos vertebrados, insetos, frutos, partes florais, néctar e pólen.

Diaemus youngi, *Diphylla ecaudata* e *Desmodus rotundus* são as três espécies atuais que representam os morcegos hematófagos. Eles incluem-se na subfamília Desmodontinae, são popularmente designados como vampiros e ocorrem exclusivamente

na região neotropical. As duas primeiras espécies alimentam-se preferencialmente do sangue de aves, enquanto que *Desmodus rotundus* tem preferência pelo sangue de mamíferos, alimentando-se em certas circunstâncias exclusivamente do sangue de gado. No entanto, pode também atacar outros organismos como aves ou mesmo o homem (TADDEI, 1983, para referências). A preferência alimentar desses animais constitui um sério obstáculo para o desenvolvimento da pecuária em muitas regiões, pois eles podem atuar como vetores da raiva paralítica em bovinos, equinos, suínos , caprinos e na espécie humana (VAN DER MERWE, 1982).

A transmissão da raiva, contudo, não está limitada às espécies hematófagas, pois outras espécies de morcegos são também susceptíveis de contaminação pelo vírus rábico, podendo transmití-lo por contato direto ou indireto, por exemplo, através do ar de cavernas onde existam animais contaminados(TADDEI, 1983, para referências).

Os morcegos podem ainda constituir-se em reservatórios naturais de outros agentes patogênicos e infecciosos, como o *Trypanosoma cruzi* (FUNAYAMA & BARRETO, 1973). Além disso, o acúmulo de suas excreções em locais úmidos e não ventilados, podem propiciar condições para a proliferação de certos fungos, como o *Histoplasma capsulatum*, responsável pela histoplasmose, uma infecção micótica respiratória (HOFF & BICLER, 1981), ou conter agentes alergênicos potentes, responsáveis pela indução de alergias respiratórias como asma e rinite (EL-ANSARY e col., 1987).

Essas características, pelas suas importantes aplicações ecológicas, econômicas e médico-sanitárias, justificam o interesse pelo estudo desses animais sob inúmeros enfo-

ques, que vem sendo desenvolvido atualmente.

I.2. Mecanismos de evolução cromossômica

Ao longo do processo de especiação os cariótipos apresentam inúmeras mudanças em relação ao número e às características dos cromossomos, e o reconhecimento dos mecanismos pelos quais essas mudanças ocorrem é de grande importância para a melhor compreensão do processo evolutivo.

A utilização de técnicas que permitem a identificação precisa e a caracterização de cada par de homólogos tem possibilitado determinar-se as diferenças ou semelhanças cromossômicas, bem como os possíveis rearranjos cromossômicos que ocorreram na diferenciação das espécies.

A descoberta de técnicas citológicas que permitissem diferenciar longitudinalmente os cromossomos e, consequentemente, melhor identificá-los, foi tentada por muito tempo sem bons resultados. Um dos primeiros tratamentos foi descrito por DARLINGTON & LA COUR (1940), que utilizaram choque frio para diferenciar zonas heterocromáticas em cromossomos de células da planta do gênero *Trillium*. A técnica de bandas Q fluorescentes, desenvolvida por CASPERSON e col. (1968), que conseguiu caracterizar os cromossomos da leguminosa *Vicia faba*, permitiu a identificação precisa de todos os cromossomos quando aplicada em células humanas, e abriu caminho para várias outras técnicas de bandamento cromossômico, que ampliaram significativamente as perspectivas de trabalho e aplicação no campo da citogenética .

A diferenciação longitudinal dos cromossomos pelas bandas Q, G ou R, juntamente com as informações sobre a localização da heterocromatina constitutiva (banda C) e das regiões organizadoras de nucléolos (banda Ag-NOR), têm permitido a identificação precisa de cada par de homólogos, a investigação da homologia dos segmentos cromossômicos entre diferentes espécies e a análise das relações evolutivas entre diversos gêneros e famílias, pela detecção dos rearranjos cromossômicos que diferenciam as espécies. A determinação das regiões cromossômicas de duplicação tardia de DNA, por incorporação de timidina tritiada ou 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU), a caracterização dos cromossomos sexuais e dos mecanismos de determinação sexual, o estudo dos cromossomos na meiose e a análise da quantidade total de DNA no complemento cromossômico, são também aspectos que estão sendo abordados na caracterização cromossômica das espécies.

O estudo citogenético sob esses diferentes enfoques é fundamental para o esclarecimento de várias questões, como as diferenças citotaxonômicas entre raças ou espécies relacionadas, a estrutura e a dinâmica das populações com variabilidade cromossômica, as variações geográficas do cariótipo e a sua evolução durante o processo de especiação. Possibilita,ainda, que se identifique a ocorrência, os mecanismos e as causas dos rearranjos cromossômicos, e que se discuta o significado adaptativo de um polimorfismo cromossômico, o papel da heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras de nucléolos na diferenciação das espécies, e a evolução dos mecanismos de determinação sexual, isolamento geográfico, etológico e citogenético.

IMAI (1978), revendo as alterações cromossômicas ocorrentes na evolução do cariótipo de mamíferos, cita como os três tipos de rearranjos mais importantes os rearranjos robertsonianos, a transposição da heterocromatina constitutiva e as inversões pericêntricas. Os rearranjos robertsonianos incluem dois tipos de alterações cromossômicas, a fusão e a fissão cêntrica, o primeiro dos quais é mais comum. A fusão cêntrica leva à transformação de números diplóides altos em números diplóides baixos, não alterando o número de braços cromossômicos, designado número fundamental, e o padrão geral de bandas.

Nesse processo, cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos não homólogos dão origem à cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos. O processo de fissão é o mecanismo inverso, isto é, leva à transformação de números diplóides baixos em números mais altos, pela formação de cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos a partir de cromossomos com dois braços.

Apesar do grande número de publicações abordando a ocorrência de fusão e fissão cromossômica, não está ainda bem estabelecido o sentido desses eventos. IMAI (1978) defende a hipótese de que no cariótipo dos mamíferos, o número de cromossomos tende a aumentar, ao longo da evolução, enquanto WHITE (1973) argumenta fortemente a favor de uma redução progressiva no número de cromossomos em todos os animais, ao longo do tempo.

O mecanismo de fusão robertsoniana é o mais conhecido e tem sido observado em populações naturais e em culturas de células normais e transformadas, podendo também ser induzida por certos agentes mutagênicos, como a mitomicina C (HSU e col., 1978). O predomínio desse rearranjo em alguns grupos de animais, tais como roedores (KOOP e col., 1983; ROBINSON e col.,

1983; SCHMID e col., 1986), bovinos (BUCKLAND & EVANS, 1978) e primatas (RUMPLER e col., 1983) favorece a idéia de WHITE (1973). No entanto, a fissão cromossômica, apesar de aparentemente rara, foi verificada, em algumas espécies de roedores (FREDGA-BERGSTRØM, 1970; NEVO & BAR-EL, 1976; YOSIDA e col., 1979) e na zebra africana *Equus burchelli* (WHITEHOUSE e col., 1984). Embora essa escassez de dados possa estar refletindo a ocorrência relativamente infrequente da fissão cêntrica quando comparada com a fusão, são necessárias investigações mais detalhadas para uma melhor compreensão do sentido dos eventos evolutivos.

O problema da organização do centrômero é fundamental quando se considera a natureza das mudanças robertsonianas. Na fusão, se ambos os centrômeros forem mantidos, poderão funcionar como uma unidade dependendo de sua proximidade (HSU e col., 1975a). O mecanismo do tipo fissão inclui quebra no centrômero, o que torna a sua compreensão e esclarecimento mais complexo.

Um outro tipo de rearranjo que ocorre no cariótipo de mamíferos envolvendo cromossomos inteiros ou braços cromossômicos é a chamada translocação em tandem, que consiste na fusão de centrômeros com telômeros e telômeros com telômeros, reduzindo desse modo os números diplóide e fundamental. Em cada um desses tipos de fusões pode ocorrer preservação de ambos ou dos vários centrômeros envolvidos, mas de forma inativada, permitindo a existência de apenas um centrômero funcional.

Na espécie humana foram referidos pacientes com translocações em tandem, nas quais um dos centrômeros era não

funcional, mas sua ocorrência podia ser inferida pela presença de uma banda C ao longo do braço do cromossomo com o rearranjo (DANIEL, 1979; MERRY e col., 1985). Em outros casos, como no veado indiano *Muntiacus*, parece haver uma situação diferente. A espécie *M. muntjak* apresenta um número diplóide igual a 6 na fêmea e 7 no macho, com cromossomos metacêntricos e acrocêntricos (WURSTER & BENIRSCHKE, 1970). A espécie *M. reevesi*, muito próxima à anterior, apresenta 46 cromossomos, todos acrocêntricos. HSU e col. (1975a) e LIMING e col. (1980) sugeriram, como explicação para a diferença cariotípica entre as duas espécies, que cada cromossomo de *M. muntjak* tenha evoluido presumivelmente de *M. reevesi* através de translocações em tandem e robertsonianas. No entanto, nos cromossomos de *M. muntjak* não foram encontradas várias bandas C como poderia se esperar. BRINKLEY e col. (1984), utilizando anticorpos específicos para centrômero, verificaram que os centrômeros funcionais de *M. muntjak* eram compostos de unidades centroméricas menores, possivelmente originadas de rearranjos e fusão linear dos centrômeros dos cromossomos de *M. reevesi* envolvidos nas fusões que deram origem aos grandes cromossomos de *M. muntjack*.

A transposição, adição ou perda de heterocromatina constitutiva, as inversões pericêntricas, e as fusões em tandem são as principais responsáveis pela alteração do número de braços cromossômicos.

Na evolução cromossômica de *Peromyscus*, um gênero de roedores com grande número de espécies, PATHAK e col. (1973a) verificaram a ocorrência de alterações no tamanho do genoma por adições ou perda de heterocromatina constitutiva.

A função da heterocromatina na evolução cariotípica não está ainda bem estabelecida; no entanto, entre as diferentes funções atribuídas a esse material está a de que grandes quantidades, associadas aos polimorfismos interespecíficos que podem atuar como barreira na fertilidade de híbridos devido ao seu possível papel no pareamento cromossômico, facilitariam os rearranjos cromossômicos e os processos de especiação (YUNIS & YASMINEH, 1971; HATCH e col., 1976; FREITAS e col., 1984; JOTTERAND-BELLOMO, 1986).

Em relação às inversões, embora não se tenha informações de que ocorram frequentemente na evolução cromossômica dos mamíferos, elas também apresentam um importante papel no processo de especiação, pois associadas às variações de heterocromatina são responsáveis pelo aparecimento de polimorfismos (YONENAGA, 1972; YOSIDA, 1977; YONENAGA-YASSUDA, 1979).

I.3. Estudos citogenéticos em quirópteros

Embora exista um considerável volume de informações sobre a biologia e ecologia dos membros da ordem Chiroptera, ainda há aspectos taxonômicos não resolvidos e as relações filogenéticas entre muitas famílias, gêneros e espécies são discutíveis.

As características básicas para a identificação dos quirópteros têm sido as medidas corporais externas e cranianas. A partir do final da década de 60, aumentou consideravelmente o interesse dos pesquisadores pelo estudo do cario-

tipo desses animais. Os caracteres métricos morfológicos podem ser afetados pela adaptação a diferentes nichos ecológicos, o que não deve acontecer com a morfologia cromossômica. Por isso, semelhanças ou diferenças nos cariótipos de morcegos são propostos como importantes subsídios na identificação de relações filogenéticas não suspeitadas ou no traçado de árvores filogenéticas mais precisas.

Mas há, ainda, muitas dificuldades na utilização das informações citogenéticas, e uma das causas é o fato de que os cromossomos, na maior parte dos casos, foram analisados por técnicas que subestimam grandemente a variação. HAIDUK e col. (1981) por exemplo, concluíram que a variação detectada pelas técnicas de coloração usual, em oito espécies de morcegos por eles analisadas, era pelo menos, 4,5 vezes menor do que a identificada pelas técnicas de bandamento cromossômico.

A quantidade de informações citogenéticas disponíveis varia entre as diferentes famílias da ordem Chiroptera. Na família Pteropodidae, da subordem Megachiroptera, são conhecidos os cariótipos de 16 gêneros e 25 espécies, dos 42 gêneros e 162 espécies existentes (CAPANNA & CIVITELLI, 1970; YONG & DHALIWAL, 1976; ANDÔ e col., 1980a; HAIDUK e col., 1981; YONG, 1984). Entretanto, a maioria das espécies americanas de morcegos que estão sendo investigadas pertencem a quatro grandes famílias de Microchiroptera: a Emballonuridae, a Phyllostomidae, a Vespertilionidae e a Molossidae, das quais se tem informações citogenéticas para 183 espécies, ou seja, cerca de 90% das espécies já foram cariotipadas (VARELLA-GARCIA & TADDEI, 1987, para referências).

De modo geral foi verificada considerável estabilidade cariotípica entre grupos de gêneros relacionados, bem como um notável conservacionismo nos padrões de bandas entre os membros de uma mesma família, mas poucas homologia entre os indivíduos de famílias diferentes. Da análise dos padrões de bandas G e C em muitas espécies, pode-se admitir que os mecanismos robertsonianos sejam os principais responsáveis pela variação intra-familial, enquanto outros processos estariam envolvidos na variação interfamilial (BICKHAM & BAKER, 1979).

Nessa ordem há exemplos de grande variação nos números diplóide e fundamental. O menor valor diplóide foi encontrado em exemplar de *Vampyressa melissa*, um Phyllostomidae que apresentou 14 cromossomos em seu cariótipo (GARDNER, 1977) e o maior valor verificou-se em *Rhinolophus m. monocerus*, um Rhinolophidae que apresentou 62 cromossomos (ANDO e col.,1980b). Os números fundamentais também variam de 20 em *Tonatia bidens* a 68 em *Micronycteris megalotis*, ambas pertencentes à família Phyllostomidae (HONEYCUTT e col., 1980).

A família Emballonuridae contém 13 gêneros e cerca de 50 espécies. Há descrições sobre o cariótipo de 17 espécies, das quais 7, representando 6 gêneros, tiveram os seus padrões de bandas G estabelecidos por HOOD & BAKER (1986), que detectaram uma considerável evolução cromossômica com pequena homologia entre os gêneros. Uma possível explicação para essa extensiva divergência cromossômica é que as linhagens representativas dos gêneros dessa família sejam muito antigas, reforçando a hipótese de que a família Emballonuridae seja das mais primitivas da ordem (HILL, 1974).

Na família Rhinolophidae há grande estabilidade do número fundamental nos diversos gêneros (ANDO e col., 1980b; HARADA e col., 1985). No gênero *Rhinolophus*, no qual ocorre variação no número diplóide, os caracteres externos mais primitivos estão associados às espécies que possuem maior número diplóide. O gênero *Hipposideros* (2n = 32 e NF = 60) parece ter originado de *Rhinolophus* principalmente por fusões cêntricas de vários autossomos (ANDO e col., 1980b).

As mudanças na família Mormoopidae também têm sido conservativas. Essa família possue apenas dois gêneros: *Pteronotus* e *Mormoops*. SITES e col. (1981) estudaram os cariótipos com banda G e C das seis espécies de *Pteronotus* conhecidas e nenhuma diferença específica foi detectada.

As espécies da família Phyllostomidae são anatomicamente diversas e complexas, existindo discordâncias nas afinidades sistemáticas e evolutivas nas subfamílias e em alguns gêneros (BAKER & BASS, 1979, para referências). Entretanto, apesar das extremas modificações morfológicas, os Phyllostomidae evidenciam relativa estabilidade cariotípica.

Nessa família só foi detectada extensa variabilidade intra-específica em relação aos gêneros *Uroderma* e *Vampyressa*, ambos pertencentes a subfamília Stenodermatinae. A espécie *Uroderma bilobatum* é muito interessante sob o ponto de vista de evolução cromossômica e tem sido extensivamente estudada, pois apresenta várias raças cromossômicas (BAKER e col.1972, 1975; BAKER, 1981; GREENBAUM, 1981), fornecendo assim uma fonte de estudos para verificação de possível diferenciação específica. Os números diplóides encontrados em *U. bilobatum* variam de

38 a 44, praticamente sem variação no número fundamental. Segundo BAKER (1979), as diferenças entre os tipos com 2n = 38 e 44 resultam de três eventos separados, dois envolvendo fusão ou fissão, dependendo da direção do evento, e um envolvendo uma translocação em tandem. Em *Vampyressa pusilla* foram descritas quatro raças cromossômicas, praticamente sem variação no número diplóide (BAKER & BICKHAM, 1980, para referências).

Na família Vespertilionidae, que possue o maior número de gênero entre os Microchiroptera, a maioria das espécies pertencentes a um mesmo gênero ou a grupos de gêneros relacionados apresenta extensa similaridade cariotípica, caracterizada pelos mesmos números diplóide e fundamental, ou mesmo número fundamental e número diplóide pouco diferenciado (BICKHAM & BAKER, 1979). Um interessante exemplo é o relativo ao gênero *Myotis* que tem o maior número de espécies entre os mamíferos e também é muito mais conservado cariotipicamente (BICKHAM e col., 1986).

As cerca de 60 espécies do gênero *Myotis* apresentam o mesmo número diplóide (2n = 44) e quase que invariavelmente o mesmo número fundamental (NF = 50 e 52). No entanto, pequenas variações podem ser encontradas, como as descritas por HARADA & YOSIDA (1978) em quatro espécies japonesas do gênero *Myotis*. Os cariótipos, todos com 2n = 44, são idênticos na morfologia, tamanho e padrão de bandas G, com exceção de um par cromossômico pequeno, que os autores designaram como de número 5, que apresenta grande variabilidade em tamanho e forma. Em *M. nattereri* ele é um acrocêntrico minúsculo, idêntico ao menor par cromossômico do cariótipo estabelecido como padrão; em *M.*

frater kaguyae é um pequeno submetacêntrico e em *M. hosonoi* e *M. macrodactylus* é polimórfico, acrocêntrico ou metacêntrico na primeira e submetacêntrico ou metacêntrico na segunda. A análise desse cromossomo em bandamento C revelou a presença de heterocromatina centromérica em *M. hosonoi* e *M. nattereri*, enquanto este mesmo par, quando metacêntrico em *M. hosonoi*, apresenta um dos braços totalmente heterocromático. Em *M. frater kaguyae* e *M. macrodactylus* os braços longos são totalmente heterocromáticos. Os autores sugeriram, então, que os braços curtos eucromáticos dos submetacêntricos encontrados em *M. frater kaguyae* e *M. macrodactylus* sejam homólogos ao acrocêntrico presente em *M. nattereri* e *M. hosonoi* e que a diferenciação morfológica do cromossomo 5, nas quatro espécies, poderia ser interpretada por duplicação de heterocromatina constitutiva.

BICKHAM (1979) também detectou uma variação cromossômica morfológica nesse pequeno par, por ele designado de número 25, em onze espécies americanas de *Myotis*. Em *M. evotis*, *M. thysanodes* e *M. auriculus* ele era submetacêntrico, com o braço curto heterocromático, e nas outras espécies era acrocêntrico com heterocromatina apenas centromérica.

A comparação dos padrões de bandas G e C entre diferentes gêneros de Vespertilionidae, também tem mostrado conservacionismo cariotípico (BICKHAM & HAFNER, 1978; BICKHAM, 1979; VOLLETH, 1985) e quando são detectadas diferenças essas derivam de algumas fusões e pequenas inversões pericêntricas (STOCK, 1983). No entanto, dois gêneros não apresentam tal estabilidade cromossômica: *Rhogeessa*, cujo número diplóide varia de 30 a 52, com pequena variação no número fundamental (NF = 50 e 52) (BICKHAM & BAKER, 1977; HONEYCUTT e col., 1980) e *Pipistrellus*,

cujo número diplóide varia de 26 a 44 e o número fundamental de 44 a 56 (OBARA e col., 1976).

O complexo *Rhogeessa* constitui um problema interessante para a sistemática, refletindo uma história taxonômica com muita controvérsia. Os espécimes para os quais os cariótipos são conhecidos pertencem às espécies *R. parvula* e *R. tumida*. Nesse complexo (*Rhogeessa tumida-parvula*) existem sete citótipos descritos, envolvendo números diplóides de 30, 32, 34, 42, 44 e 52. *R. parvula*, reconhecida por estudos morfológicos clássicos, tem 2n = 44 e não apresenta variação cromossômica intraespecífica (BICKHAM & BAKER, 1977). Os demais citótipos foram identificados como *R. tumida* (BAKER e col., 1985), sendo que todos os rearranjos cromossômicos encontrados nos diferentes citótipos das diversas regiões podem ser explicados por fusões cêntricas e interpretados como indicadores de que dentro do complexo existem várias espécies. A ocorrência simpátrica dos citótipos 2n = 34 e 2n = 42, sem a verificação de híbridos, possibilitou a descrição da forma 2n = 42 como uma espécie distinta: *Rhogeessa genowaysi* (BAKER, 1984).

Os Verpertilionidae do gênero *Pipistrellus* mostram uma intensa variabilidade interespecífica, com uma grande heterogeneidade cariotípica (CAPANNA & CIVITELLI, 1970; OBARA e col., 1976; FEDYK & RUPRECHT, 1976). *Pipistrellus* é filogeneticamente uma forma especializada, derivada de um ancestral semelhante a *Myotis* (2n = 44 e NF = 50-52) (ANDÓ e col., 1980c). A análise da distribuição da heterocromatina constitutiva em duas espécies, *P. endoi* (2n = 36 e NF = 52) e *P. abramus* (2n = 26 e NF = 44), detectou diferenças acentuadas entre elas, tendo sido sugeridas duas hipóteses para explicá-las: *P. abramus*, forma

mais especializada que *P. endoi*, pode ter sido originada de *P. endoi* pela adição de heterocromatina, ou *P. endoi* e *P. abramus* evoluiram independentemente de um ancestral comum com um alto número diplóide e o processo de fusão cêntrica foi acompanhado de uma perda de heterocromatina em *P. endoi*, que em *P. abramus* foi conservada. Embora essas duas hipóteses possam ser corretas, fica claro que a perda ou adição de heterocromatina, ao lado de fusões cêntricas, têm tido importante papel na evolução dos Vespertilionidae, especialmente no grupo de *Pipistrellus* (ANDÔ e col., 1980c).

Em relação à família Molossidae, as análises citogenéticas basearam-se, até recentemente, na análise simples dos cromossomos corados usualmente, de cerca de 26% das espécies, os quais mostraram grande variação entre os membros da família (WARNER e col., 1974). BAKER e col. (1982) descreveram o padrão de bandas G para *Tadarida brasiliensis*, cujo cariótipo é semelhante ao padrão considerado representativo dos vários gêneros de Molossidae. Essa semelhança levou os autores a proporem o cariótipo de *T. brasiliensis* como um primeiro candidato à condição primitiva para a família. Recentemente uma outra espécie de Molossidae, *Eumops glaucinus*, teve os seus padrões de bandas G, C e NOR determinados (MORIELLE e col., 1987). O estabelecimento dos padrões de bandas em várias outras espécies possibilitará a comparação de seus cariótipos e possivelmente o estabelecimento das relações evolutivas entre as espécies e dos tipos de rearranjos responsáveis pela diversificação das mesmas.

Um aspecto que tem sido pouco analisado na ordem Chiroptera é o relativo ao número e localização das regiões organizadoras de nucléolos, que devido à sua constituição química

e comportamento durante o ciclo celular, pode assumir um importante papel na evolução cromossômica, principalmente nos grupos que se apresentam conservativos.

Foram encontradas informações sobre as regiões organizadoras de nucleólos em vinte espécies de quirópteros americanos, três pertencentes à família Mormoopidae (SITES e col., 1981), dezesseis à família Phyllostomidae (GOODPASTURE & BLOOM, 1975; KASAHARA & DUTRILLAUX, 1983; SOUZA & CORREA, 1984; SOUZA, 1985; VARELLA-GARCIA & TADDEI, 1985; MORIELLE e col., 1986a,b, 1987a; ARAUJO & SOUZA, 1987b) e uma à família Molossidae (MORIELLE e col., 1987b). Com exceção das três primeiras referências as demais consistem em resumos publicados em anais de reuniões científicas, com poucas informações. Verifica-se que compreendem cerca de 8% das espécies analisadas citogeneticamente, um número baixo considerada a importância da função das RONs e o interesse no esclarecimento de sua participação na evolução cromossômica.

I.4. Regiões organizadoras de nucléolos

HEITZ (1931) e MC CLINTOCK (1934) foram os primeiros pesquisadores a demonstrarem que os nucléolos são formados em regiões específicas dos cromossomos, às quais denominaram organizadores nucleolares. Essas regiões organizadoras de nucléolos (RONs) consistem em segmentos cromossômicos constituídos por um DNA de seqüências repetitivas, o DNA ribossômico (DNAr), que codifica o RNA ribossômico (RNAr), principal compo

nente dos ribossomos (RITOSSA & SPIEGELMAN, 1965; WALLACE & BIRNSTIEL, 1966; EVANS e col., 1974).

As seqüências ou unidades de repetição que caracterizam o DNA ribossômico, e são dispostas em tandem, consistem nos genes pré-RNA ribossômico formados pela unidade de transcrição e por um segmento espaçador. Nos vertebrados, o gene pré-RNA ribossômico inclue os cistrons que codificam os RNAsr 18S, 5,8S e 28S, separados por regiões que são degradadas no processo de maturação. Os cistrons 5,8S localizam-se entre os codificadores dos RNAs 18S e 28S (SPEIRS & BIRNSTIEL, 1974; MADEN, 1978). O segmento espaçador era considerado não transcrito, pois não se detectava RNA complementar à essa região. No entanto, recentemente LABHART & REEDER (1986) verificaram a ocorrência *in vitro* de transcrição no segmento espaçador em núcleos de *Xenopus laevis*. Segundo os autores, a molécula de RNA transcrita a partir da seqüência espaçadora apresenta-se muito instável e provavelmente sensível à ação de nucleases, sendo rapidamente clivada, de tal modo que não é detectada *in vivo*.

Em alguns casos, a unidade repetitiva codifica também o RNAr 5S presente nos ribossomos (MILLER Jr., 1981, para referências), mas nos eucariotos geralmente o gene de RNAr 5S não é codificado nesta unidade, isto é, os genes de pre-RNAr e RNAr 5S não estão ligados. PARDUE e col. (1973), por exemplo, concluiram que os genes ribossômicos 5S em *Xenopus laevis* distribuem-se nas extremidades dos braços longos de todos os cromossomos. Em humanos, os genes ribossômicos 18S, 5,8S e 28S foram mapeados nas regiões p12 dos cinco pares de acrocêntricos, os cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22 (EVANS e col.,1974), enquanto os genes ribossômicos 5S foram mapeados na região

q42 → q43 do cromossomo 1 (STEFFENSEN & DUFFEY, 1974).

No processo evolutivo existe um forte conservacionismo nas seqüências de DNAr que são transcritas, diferentemente do que ocorre com os segmentos espaçadores, que mostram maior divergência evolutiva, com grande heterogeneidade em tamanho e nas seqüências nucleotídicas (LONG & DAWID, 1980, para referências), tendo sido sugerido que os mecanismos evolutivos operam diferentemente nas duas regiões (SYLVESTER e col.,1986).

De maneira geral, o número de genes ribossômicos correlaciona-se com o tamanho do genoma; no entanto, pode existir uma grande variação no número de genes não só entre espécies intimamente relacionadas, mas também entre indivíduos de mesma espécie e intra-individualmente levando ao aparecimento de polimorfismos. Como exemplos pode ser referida a variabilidade em linhagens de *Drosophila melanogaster* (SPEAR & GALL, 1973) , em espécies de anfíbios (SINCLAIR e col., 1974), roedores (HENDERSON e col., 1976; SASAKI e col., 1986) e primatas (HENDERSON e col., 1977), assim como a variabilidade entre indivíduos, verificada em certas espécies de peixes (FORESTI e col.,1981; GOLD, 1984), anfíbios (MILLER & BROWN, 1969; WELLAUER e col., 1976; BUONGIORNO-NARDELLE e col., 1977; MAC GREGOR e col., 1977), camundongos (ARNHEIN & SOUTHERN, 1977) e na espécie humana (ARNHEIN & SOUTHERN, 1977; WELLAUER & DAWID, 1979; ERICKSON e col.,1981). Em humanos a quantidade de DNA ribossômico pode diferir não só entre os diferentes pares de cromossomos acrocêntricos de um mesmo indivíduo, como também entre os cromossomos homólogos (EVANS e col., 1974; DITTES e col., 1975; WARBURTON e col.,1976).

RITOSSA e col. (1966a) consideraram que, devido à redundância dos genes, as regiões de DNAr são mais susceptí-

veis a permutações desiguais, bem como a duplicações e deficiência, de tal maneira que a quantidade de DNAr presente nestas regiões poderia ser facilmente modificada. A tendência dos cromossomos nucleolares de se associarem, fenômeno comum na intérfase, pode facilitar a troca de segmentos de DNAr entre as RONs, contribuindo assim para a variabilidade numérica desses cistrons (RUIZ, 1982).

Além da característica de repetibilidade e variabilidade, os cistrons ribossômicos apresentam também amplificação gênica, fenômeno ocorrente no núcleo dos ovócitos de muitos insetos, anfíbios e outros animais, inclusive o homem (BROWN & DAWID, 1968; GALL, 1968; STAHL e col., 1975, para exemplos). Essa amplificação é aparentemente necessária para a intensa síntese de RNAr que se faz necessária à maturação dos ovócitos ou ao armazenamento para uso do embrião. A amplificação dos cistrons ribossômicos ocorre também como mecanismos compensatório em situação de deficiência parcial ou completa de um organizador nucleolar (RITOSSA e col., 1966b; HENDERSON & RITOSSA,1970, para exemplos).

A repetividade dos genes ribossômicos permite que a sua localização seja facilmente identificada por técnicas de hibridização "in situ", utilizando-se RNAr marcado com H^3, que hidriliza com as regiões de DNAr mostrando onde elas se localizam no genoma (RITOSSA & SPIEGELMAN, 1965; HSU e col., 1975), ou por técnicas citológicas, que empregam uma solução de nitrato de prata para a marcação das RONs (GOODPASTURE & BLOOM,1975, BLOOM & GOODPASTURE, 1976; HOWELL & BLACK, 1980).

Os estudos auto-radiográficos demonstraram que a síntese de RNAr nas células de mamíferos inicia-se muito pre-

cocemente, durante o final da telófase (HERNANDEZ-VERDUN e col., 1980), de tal forma que a visualização da atividade das RONs é possível tanto na intérfase pela presença dos nucléolos, como na metáfase, pela marcação dos cromossomos portadores dos genes ribossômicos que estiveram ativos na intérfase precedente (MILLER e col., 1976a, b; HOWELL, 1977).

Experimentos realizados com cromossomos de algumas espécies de animais com certas peculiaridades, como amplificação de DNAr, nos quais estes cromossomos são submetidos à digestão por RNases, DNases, proteases, bem como a tratamentos com ácidos e álcalis, têm sugerido que a afinidade pela prata, tanto nos nucléolos interfásicos como das RONs nos cromossomos metafásicos, é devida parcialmente à presença de proteínas acídicas (não-histônicas) que estão relacionadas com a atividade transcricional nucleolar (HOWELL, 1977; OLERT e col.,1979; BUYS & OSINGA, 1980; RAMAN & SPEARLING, 1981; ANGELIER e col.,1982). Nas células somáticas mitóticas, ao redor do DNAr inativo e condensado permanecem resíduos dessas proteínas, possibilitando a demonstração, na metáfase, dos cromossomos que tiveram suas RONs ativas na intérfase anterior. No entanto, não pode ser estabelecida uma correlação direta entre a intensidade de reação da prata e a atividade transcricional (FERNANDEZ-GOMES e col. , 1982; GOESSENS & LEPOINT, 1982).

As proteínas associadas com as RONs mais estudadas são as chamadas proteinas Ag-NOR. São proteínas argirofílicas, não-histônicas, cuja natureza bioquímica é ainda controversa (LISCHWE e col., 1979; BUYS & OSINGA, 1980, 1984; OLSON e col., 1983; OCHS e col., 1983; OCHS & BUSCH, 1984; PFEIFLE e col., 1986).

O papel essencial dos ribossomos na síntese proteíca determina, a todos os organismos e células, a necessidade da síntese de um mínimo de RNAr, esse mínimo podendo ser produzido por um número variável de genes em atividade. Inúmeras investigações tem objetivado esclarecer a natureza complexa da atividade das RONs, particularmente sua dependência de influências ambientais ao nível celular e a diferenciação em nucléolos, a maior parte delas desenvolvidas com células humanas.

O número e a posição das regiões organizadoras de nucléolos varia amplamente entre as espécies. A observação da associação entre nucléolos e a visualização dessas regiões como constrições secundárias nos cromossomos metafásicos fizeram com que elas passassem a ser conhecidas de longa data (HEITZ, 1931).

As constrições cromossômicas secundárias foram confirmadas como sítios de DNAr em muitos organismos, como em *Drosophila* (SCHAFER & KUNZ, 1975), no veado *Muntiacus* (PARDUE & HSU, 1975), no homem (HENDERSON e col., 1972) e vários outros mamíferos. Entretanto, nem todas regiões de constrições secundárias constituem organizadores nucleolares. Pode-se exemplificar com o hamster chinês *Cricetulus griseus*, no qual os genes ribossômicos estão localizados nas regiões teloméricas de vários autossomos e não na única constrição secundária localizada no cromossomo X (HSU e col., 1975b), e com a espécie humana, na qual não há RONs nas grandes constrições pericentroméricas dos cromossomos 1 e 9.

Na maioria dos mamíferos, as regiões organizadoras de nucléolos são encontradas nos autossomos, mas HSU e col. (1975b) e PARDUE & HSU (1975) demonstraram a presença de RONs

nos cromossomos sexuais de duas espécies de morcegos do gênero *Carollia: C. castanea* e *C. perspicillata*, e no veado *Muntiacus muntjak*. A preponderância de sítios ribossômicos nos autossomos foi atribuída a possíveis problemas que poderiam resultar da inativação do cromossomo X nas fêmeas, se esse cromossomo fosse o portador dos sítios ribossômicos.

Recentemente, foi demonstrada a presença de RONs em cromossomos Y de algumas espécies de mamíferos, como cães (PATHAK e col., 1982), marsupiais (HAYMAN & SHARP, 1981) e primatas (LEDBETTER, 1981), destacando-se,contudo, que nas espécies em que o cromossomo Y tem RON e o cromossomo X não, estas estão também presentes em um ou mais pares de autossomos.

As investigações realizadas com a finalidade de esclarecer a natureza da atividade das RONs têm revelado a ocorrência de variabilidade individual no número modal de cromossomos marcados (MIKELSAAR e col., 1977; HENDERSON & BRUÈRE, 1980; YONENAGA-YASSUDA e col., 1983), variabilidade inter e intra-individual na intensidade de marcação desses cromossomos (MIKELSAAR e col., 1977; SCHMID e col., 1982, entre outros) e variabilidade entre células de mesmo tecido e de tecidos diferentes (ARRIGHI e col., 1980; JOTTERAND-BELLOMO & VAN MELLE , 1981a; SCHMID e col., 1982; SOZANSKY & TEREKHOV, 1984; SOZANSKY e col., 1985).

A conclusão geral que se tem é que a atividade de cada uma das RONs, nos indivíduos normais, é característica e herdada como propriedade de um cromossomo particular (HENDERSON & BRUÈRE, 1980; FERRARO e col., 1981; ZAKHROV e col., 1982; WELTENS e col., 1985, entre outros), verificando-se em alguns

casos que a variabilidade individual está correlacionada com a quantidade de cistrons ribossômicos, com sua atividade em diferentes tecidos, ou com ambos (MILLER e col., 1976a, b;MIKELSAAR e col., 1977; WARBURTON & HENDERSON, 1979; DE CAPOA e col.,1985).

No entanto, a observação de que a atividade transcricional de cada RON é característica e herdada, não significa que ela não mude sob condições particulares do genótipo de uma célula, pois estudos realizados em células com certas peculiaridades revelaram variações nas atividades das RONs. Em híbridos vegetais e animais e híbridos celulares somáticos observa-se dominância da atividade organizadora nucleolár de uma das espécies (MILLER e col., 1976a, b; BICUDO & RICHARDSON, 1977; BICUDO, 1982; CERMEÑO e col., 1984a; WARD & COLE, 1986; PIJNACKER e col., 1987). Competição, supressão, inativação ou modulação na atividade dos genes ribossômicos também foram observadas em células animais e vegetais com diferentes ploidiais, havendo a diminuição do número esperado de RONs ativas (FLAVELL & O'DELL, 1979; CERMEÑO e col., 1984b, MAYR e col., 1986; SOLA e col., 1986).

Em células neoplásicas não pode ser estabelecido um padrão geral de atividade das RONs que se associasse com os processos de transformação nelas ocorrentes, pois foram encontrados comportamentos contraditórios em células de indivíduos com adenocarcinomas (LI & ZHOU, 1983; KIVI & MIKELSAAR, 1985) , leucemias (MAMAEV e col., 1985) e tumores sólidos (MURTY e col., 1985). No entanto, fenômenos como o aparecimento de RONs ectópicas, possivelmente originadas por rearranjos cromossômicos foi observado em células germinativas testiculares tumorais (DE LOZIER-BLANCHET e col., 1986), assim como a amplificação de se-

qüências ribossômicas também foi observada em células de melanoma humano e em células glia de rato transformadas (HOLDEN e col., 1985; KANO-TANAKA e col., 1986).

Na intérfase, os nucléolos constituem evidência direta da atividade dos cistrons ribossômicos. As variações nos níveis de redundância e ativação dos cistrons ribossômicos, levam à variações no tamanho, número e estrutura dos nucléolos, visto que estes contém as RONs e o material que se acumula ao seu redor, ou seja, o RNAr e seus precursores e proteínas específicas (WARNER, 1979).

Os nucléolos compõem-se de dois elementos distintos: o constituído pelo componente fibrilar, local da transcrição do RNAr e o constituído pelo componente granular, local de armazenamento do RNAr já processado. No componente fibrilar destacam-se duas regiões, uma mais densa e outra menos densa denominada centro fibrilar. Em células somáticas, o nucléolo é frequentemente circundado por uma camada densa de cromatina, denominada cromatina perinucleolar ou cromatina associada ao nucléolo (JORDAN, 1984). Esse material cromatínico, recentemente observado em núcleos de ovócitos humanos, provavelmente seja resultante da tendência espontânea de associação da heterocromatina constitutiva (VAGNER-CAPODANO e col., 1987).

De acordo com sua atividade e o arranjo de seus componentes, SCHWARZACHER & WACHTLER (1983), classificaram os nucléolos em três tipos principais: (a) nucléolos pequenos e arredondados, que têm atividade transcricional baixa e apresentam as regiões fibrilar e granular pouco densa; (b) nucléolos com nucleolonema, com região fibrilar densa e região granular

pequena, indicando o início de uma atividade transcricional elevada e (c) nucléolos compactos, com numerosos centros fibrilares e extensa região granular, indicando plena atividade de equilíbrio nas atividades de transcrição, processamento e transporte para o citoplasma do RNAr. Os três tipos de nucléolos podem ser encontrados em diferentes estágios do ciclo celular, pois eles refletem o estado de ativação metabólica da célula.

Mais recentemente, a maioria dos estudos realizados com nucléolos vem tentando estabelecer em qual componente nucleolar está localizado o DNAr. A afinidade de substâncias nucleolares pela prata tem possibilitado o emprego desta na marcação dos nucléolos interfásicos, assumindo em conseqüência um importante papel ao nível ultraestrutural, por revelar a disposição relativa e funcional, bem como o comportamento das subunidades nucleolares durante o ciclo celular.

Existem evidências suportando a hipótese de que durante a intérfase as RONs constituem as regiões fibrilares. Essas evidências são fornecidas por observações morfológicas na nucleologênese (LEPOINT & GOESSENS, 1978; MIRRE & STAHL, 1978; HERNANDEZ-VERDUN & BOUTEILLE, 1979), pela presença de proteínas exclusivas das RONs no componente fibrilar denso e nos centros fibrilares (BOURGEOIS e col., 1979; KNIBIEHLER e col., 1981; HERNANDEZ-VERDUN e col., 1982; ZAPECINA e col., 1984; MEDINA e col., 1986), por estudos de hibridização "in situ" (ARROUA e col., 1982) e pela análise ultraestrutural dos centros fibrilares em diferentes células (MIRRE & KNIBIEHLER, 1982, 1984; COUVE, 1985; LAFARGA e col., 1985; DUPUY-COIN e col., 1986). A

maior parte desses estudos demonstrou que o DNAr transcricionalmente ativo está localizado no componente fibrilar denso, enquanto que os filamentos inativos de DNAr reunem-se nos centros fibrilares.

O número de regiões organizadoras de nucléolos corresponde ao número máximo de nucléolos que podem ser encontrados nas células interfásicas; todavia, o número de RONs que são ativadas pode variar e, portanto, o número de nucléolos pode ou não corresponder ao número de RONs. A ativação diferencial de RONs conduz a uma variação no número e no tamanho dos nucléolos, porém não é a única responsável por essa variação, visto que observações cinemicrográficas do comportamento do nucléolo durante o ciclo celular mostraram que existe um padrão cíclico de mudanças morfológicas nos nucléolos (GONZALES & NARDONE, 1968; ANASTASSOVA-KRISTEVA, 1977), e que as variações no número, morfologia e tamanho devem-se, também, à fusão nucleolar resultante de movimento, crescimento e aproximação dos nucléolos, fato já destacado por OHNO e col. (1961). Estudos posteriores realizados em linfócitos humanos estimulados com fitohemaglutinina demonstraram que, em células metabolicamente ativas, os nucléolos apresentam variação em número durante o ciclo celular e tendem a se fundir (ARRIGHI e col., 1980; WACHTLER e col., 1980, 1982; POPP & WACHTLER, 1983), confirmando assim os dados anteriores.

A fusão nucleolar observada em células metabolicamente ativas é conseqüência da aproximação dos cromossomos organizadores nucleolares, ou seja, da participação de mais de um cromossomo na formação de um único nucléolo. Esses cromossomos podem permancer associados até a metáfase, o que em humanos é

denominado de associação de satélites (OHNO e col., 1961).

A associação de cromossomos organizadores nucleolares pode ocorrer tanto pela semelhança da atividade dessas regiões, como pela afinidade na constituição química. Em células mitóticas, a freqüência com que cada cromossomo participa de associações é uma função de seu conteúdo de DNAr, bem como do grau de atividade da RON (HENDERSON e col., 1973; WARBURTON e col., 1976; MILLER e col., 1977). Há também indicações de que as associações de satélites são menos freqüentes após interfases curtas e várias divisões sucessivas, presumivelmente por essas alterarem a posição original dos cromossomos (SIGMUND e col., 1979). Em células germinativas, como os espermatócitos, a freqüência de associação entre os bivalentes acrocêntricos não se correlaciona com a atividade dos cistrons ribossômicos, mas sim com a quantidade de DNA satélite presente no cromossomo (GUICHAOUA e col., 1986).

HENDERSON e col. (1973) demonstraram que os cromossomos vistos em associação são frequentemente conectados por filamentos nucleoprotêicos que se estendem das RONs. Mais recentemente, verificou-se, em microscopia eletrônica, que existe uma região de conexão entre o nucléolo e os cromossomos acrocêntricos humanos, que provavelmente consiste nos centros fibrilares (STAHL e col., 1983, para referências). Eletromicrografias de ovócitos e espermatócitos humanos, no estágio de paquíteno da meiose, também demonstraram que os genes ribossômicos pertencentes a vários cromossomos estavam reunidos no mesmo centro fibrilar nucleolar, onde se encontravam envoltos por proteínas argirofílicas. Este padrão apresentado para o arranjo das RONs predispõe ao aparecimento de alterações cromossômicas, pois fa-

cilita a ocorrência de falhas nas disjunções e de translocações (MIRRE e col., 1980; STAHL e col., 1983).

A associação das RONs na intérfase tem sido proposta como um fator predisponente de falhas na disjunção, levando ao aparecimento de gametas aneuplóides, responsáveis por muitas trissomias, entre as quáis a do cromossomo 21 humano conhecida como Síndrome de Down. As translocações que envolvem cromossomos acrocêntricos são também responsáveis por grande parte das aberrações cromossômicas humanas e, ao considerar-se os mamíferos de maneira geral, nota-se que as translocações assumiram um papel preponderante na evolução cromossômica e na diferenciação das espécies (MASCARELLO e col., 1974; ROBINSON, 1980; ELDER, 1980; BAKER e col., 1983).

Um outro aspecto interessante relativo às RONs e aos nuclélos trata-se de sua relação com a membrana nuclear e com as regiões de heterocromatina constitutiva. Há alguns anos tem sido acumuladas evidências de que os cromossomos não se distribuem ao acaso no núcleo interfásico, mas estão arranjados de uma forma ordenada (COMINGS, 1980, para referências) e os nucléolos associam-se de forma significativa à membrana nuclear (BOURGEOIS e col., 1983, para referências).

Os aspectos mais considerados quanto à organização cromossômica na intérfase são a estabilidade na posição dos cromossomos, a posição relativa de cada um deles em relação aos demais e o seu arranjo espacial em relação aos diferentes elementos nucleolares. A dificuldade de acompanhar o comportamento dos cromossomos individualmente durante a intérfase explica porque, até recentemente, não existiam evidências diretas em favor da estabilidade do arranjo espacial dos cromossomos. Entre

tanto, estudos recentes utilizando métodos específicos, como microirradiação por raios UV, sondas de DNA e cinemicrografia, têm confirmado a estabilidade da posição dos cromossomos durante a intérfase para a maioria das células em divisão (HUBERT & BOURGEOIS, 1986, para referências).

O uso dos nucléolos como marcadores dos cromossomos portadores das RONs possibilitou a determinação da posição desses no interior do núcleo. BOURGEOIS e col. (1981), acompanhando os cromossomos organizadores nucleolares em células vivas por meio de cinemicrografia, mostraram que eles permaneciam em posição estável durante a intérfase e que se ocorresse a fusão nucleolar o arranjo dos cromossomos tornava-se novamente estável no início de G_1, quando se completava a fusão nucleolar (GANI, 1978).

Organização dos cromossomos em áreas bem definidas é devida à ligação de determinadas regiões cromossômicas, como centrômeros, telômeros, segmentos heterocromáticos e RONs, à sítios específicos na membrana nuclear (HUBERT & BOURGEOIS, 1986, para referências), o que ajuda a delimitar o território ocupado por cada cromossomo na membrana nuclear e no interior do núcleo.

O cromossomo Y humano tem sido frequentemente observado em associação com o nucléolo (BOBROW e col., 1971; WYANDT & IORIO, 1973), assim como o cromossomo 9 (GAGNE e col., 1973) e o cromossomo 1 (STAHL e col., 1976). Em espermatócitos humanos, associação semelhante foi observada entre a vesícula sexual XY e o nucléolo (KNIBIEHLER e col., 1981; STAHL e col., 1984). Estes dados indicam uma tendência preferencial de cer-

tos cromossomos localizarem-se próximos ao nucléolo, tendência especialmente aparente em cromossomos portadores de grandes blocos heterocromáticos.

Não existe qualquer indicação da participação dos cromossomos 9 e Y na elaboração do nucléolo; contudo, STAHL e col. (1976) não excluem um possível papel para o cromossomo 1, visto que os genes para RNAr 5S estão localizados na extremidade distal do seu braço longo. Uma outra explicação para a associação desses cromossomos ao nucléolo surge dos estudos de SCHMID e col. (1975, 1983), que observaram a existência de uma atração não específica da heterocromatina constitutiva dos cromossomos 1, 9,16, Y e acrocêntricos, que são vistos em associação com relativa freqüência. Entre os acrocêntricos, o cromossomo 15, que é um organizador nucleolar, é preferencialmente envolvido em associações com aqueles cromossomos, explicando assim, a associação dos cromossomos 1, 9 e Y ao nucléolo.

A associação visualizada citologicamente entre os nucléolos e a heterocromatina assume uma maior importância nas células germinativas, pois pode levar à ocorrência de falhas nas disjunções, de translocações e de heteromorfismos, envolvendo as regiões heterocromáticas e de DNAr, e atuar como fator de evolução do cariótipo ao longo do processo de especiação.

I. 5. Objetivos

A família Phyllostomidae é a que apresenta maior número de gêneros e espécies entre os Chiroptera neotropicais. Apesar de existir um considerável volume de informações sobre a biologia e a ecologia dos membros dessa família, e ela ser uma das mais estudadas do ponto de vista cromossômico, as relações filogenéticas entre muitos dos gêneros e espécies ainda são discutíveis.

As regiões organizadoras de nucléolos, por sua constituição e arranjo, podem constituir-se em importante fonte de variabilidade cromossômica. Por isso, procurou-se identificar o número e a localização das RONs em treze espécies de morcegos encontradas na região noroeste do Estado de São Paulo, estimar as freqüências com que elas aparecem marcadas por células e associar a freqüência de nucléolos interfásicos com a de RONs marcadas. Pretende-se com os dados obtidos, verificar se há ocorrência de variabilidade intra e interespecífica e discutir, com o auxílio dos padrões de bandas G e C, a participação das RONs no processo de evolução cromossômica.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Espécies

Os espécimes analisados neste trabalho foram coletados em localidades de quinze municípios do Estado de São Paulo e em um do sudoeste do Estado de Minas Gerais, indicado na Figura 1.

A identificação taxonômica dos exemplares foi efetuada pelo Dr. Valdir Antonio Taddei, do Departamento de Zoologia do IBILCE, responsável pelo Centro de Referência para Identificação e Sistemática de Quirópteros Brasileiros.

Foram analisados citogeneticamente 72 animais, representantes de 13 espécies pertencentes à 5 subfamílias da família Phyllostomidae: *Phyllostomus discolor* (2), *Phyllostomus hastatus* (7), *Anoura caudifer* (7), *Glossophaga soricina* (7), *Carollia perspicillata* (7), *Artibeus lituratus* (7), *Artibeus planirostris* (7), *Chiroderma doriae* (4), *Chiroderma villosum* (2), *Sturnira liliun* (7), *Vampyrops lineatus* (7), *Desmodus rotundus* (7), *Diaemus youngi* (1).

A discriminação dos exemplares pelas espécies e respectivas subfamílias, e as informações sobre local de coleta, sexo do animal e o número de registro no Laboratório de Citogenética são apresentados na Tabela 1.

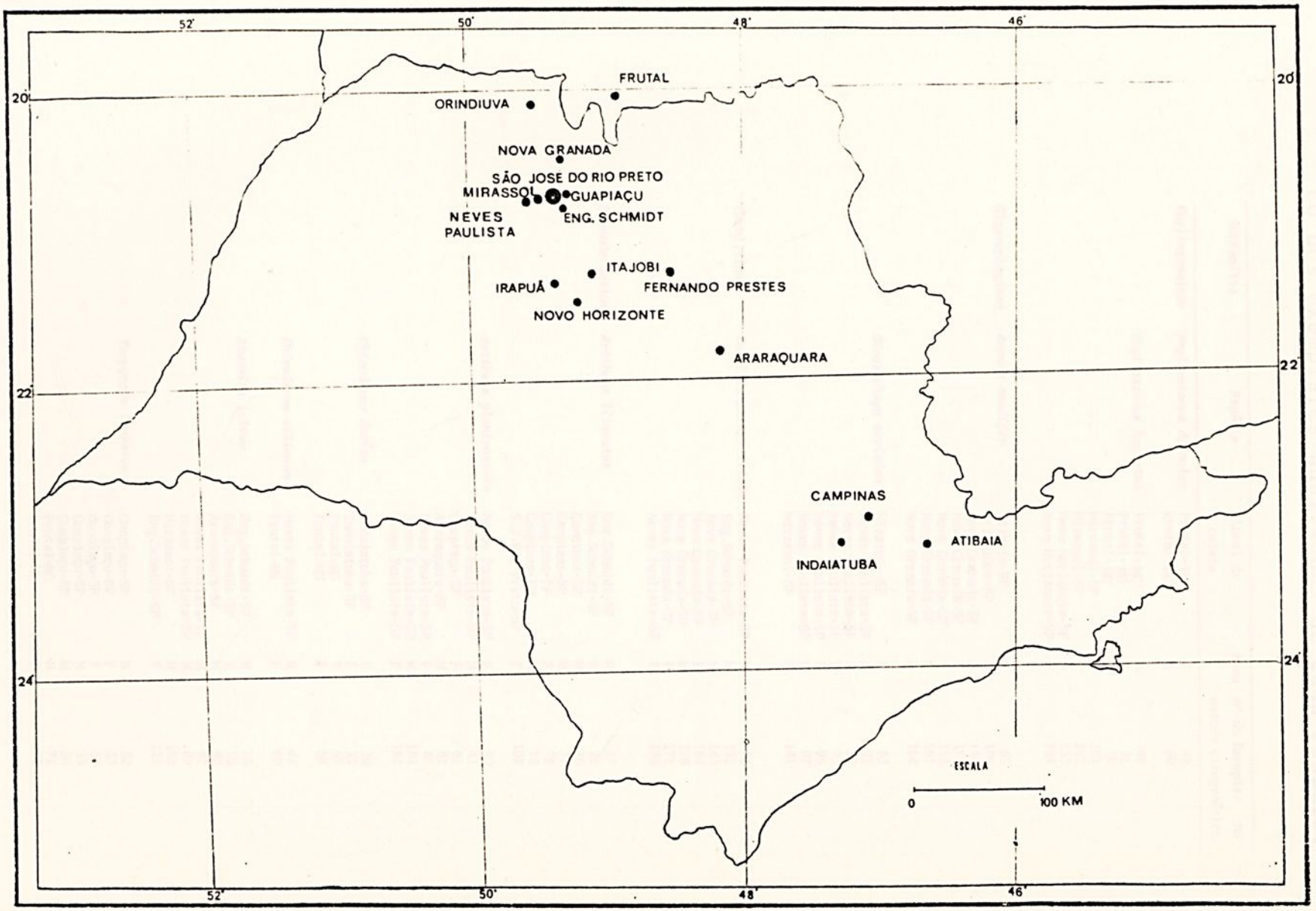


FIGURA 1. Municípios de procedência dos exemplares analisados.

TABELA 1. Local de coleta, sexo e número de registro no estudo citogenético dos exemplares analisados de cada espécie.

Subfamília	Espécie	Local de coleta	Sexo	Nº do Exemplar no estudo citogenético
Phyllostominae	*Phyllostomus discolor*	Frutal-MG	F	48
		Frutal-MG	M	50
	Phyllostomus hastatus	Frutal-MG	M	49
		Frutal-MG	F	51
		Frutal-MG	M	70
		Mirassol-SP	F	101
		Mirassol-SP	F	102
		Novo Horizonte-SP	M	153
		Novo Horizonte-SP	M	154
Glossophaginae	*Anoura caudifer*	Atibaia-SP	F	65
		Orindiuva-SP	F	106
		Nova Granada-SP	F	156
		Nova Granada-SP	F	160
		Nova Granada-SP	F	161
		Nova Granada-SP	M	167
		Nova Granada-SP	F	168
	Glossophaga soricina	Mirassol-SP	F	62
		Neves Paulista-SP	M	91
		Neves Paulista-SP	M	92
		Neves Paulista-SP	F	93
		Neves Paulista-SP	F	95
		Neves Paulista-SP	M	97
		Mirassol-SP	F	141
Carolliinae	*Carollia perspicillata*	Neves Paulista-SP	M	96
		Eng.Schmidt-SP	M	122
		Nova Granada-SP	M	163
		Nova Granada-SP	F	164
		Nova Granada-SP	M	170
		Nova Granada-SP	F	171
		Neves Paulista-SP	F	186
Stenodermatinae	*Artibeus lituratus*	Eng.Schmidt-SP	M	17
		Eng.Schmidt-SP	M	28
		Campinas-SP	M	76
		Campinas-SP	M	77
		Campinas-SP	F	78
		Campinas-SP	M	79
		S.J.Rio Preto-SP	F	108
	Artibeus planirostris	Neves Paulista-SP	F	40
		Neves Paulista-SP	M	41
		Guapiaçu-SP	F	61
		Araraquara-SP	M	81
		Neves Paulista-SP	F	84
		Neves Paulista-SP	M	184
		Neves Paulista-SP	F	185
	Chiroderma doriae	Indaiatuba-SP	F	20
		Indaiatuba-SP	F	22
		Frutal-MG	F	67
		Frutal-MG	F	68
	Chiroderma villosum	Neves Paulista-SP	M	44
		Frutal-MG	F	69
	Sturnira lilium	Eng.Schmidt-SP	M	15
		Eng.Schmidt-SP	F	16
		Araraquara-SP	M	80
		Neves Paulista-SP	M	82
		Neves Paulista-SP	M	83
		Mirassol-SP	M	100
		Eng.Schmidt-SP	F	121
	Vampyrops lineatus	Guapiaçu-SP	M	52
		Guapiaçu-SP	F	53
		Guapiaçu-SP	F	54
		Guapiaçu-SP	M	55
		Guapiaçu-SP	M	56
		Frutal-MG	M	71
		Frutal-MG	F	72
Desmodontinae	*Desmodus rotundus*	Atibaia-SP	M	63
		Irapuã-SP	M	114
		Eng.Schmidt-SP	F	123
		Fernando Prestes-SP	M	125
		Mirassol-SP	F	138
		Mirassol-SP	M	143
		Mirassol-SP	M	144
	Diaemus youngi	Itajobi-SP	M	103

II.2. Coletas

Os animais foram coletados em sua maioria à noite, visto que eles têm hábito crepusculares e noctívagos que facilitam a coleta noturna. Foram utilizadas redes de neblina ("mist nets"), geralmente com cerca de 2,5 m de largura por 7 a 9 m de comprimento, dispostas em áreas próximas às fontes de alimentos, interceptando as possíveis rotas de vôo. Essas redes são tecidas com fios de nylon preto, muito delicados e trançados obliquamente, com 4 a 5 estirantes mais fortes dispostos horizontalmente que permitem a formação de "bolsas" nas quais os animais ficam presos ao cair. Em ambientes fechados, onde não foi possível a utilização de redes, essas foram substituídas por puçás.

Os morcegos foram retirados das redes ou dos puçás com a utilização de luvas de raspa de couro e transportados ao laboratório em pequenas gaiolas. Todos os animais analisados neste trabalho estão depositados na Coleção do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - UNESP.

II.3. Preparações cromossômicas

As preparações cromossômicas foram feitas a partir de medula óssea, utilizando-se as técnicas de FORD & HAMERTON (1956) e LEE & ELDER (1980), com modificações.

No laboratório, no dia subsequente à coleta, o

animal foi pesado e injetou-se subcutâneamente, na região dorsal, 0,2 ml de solução de fermento glicosado para cada 25 g de peso corporal, como indutor mitótico. No segundo dia, no período da manhã, injetou-se intra-peritonialmente 0,2 ml de colquicina a 0,5% para cada 25 g de peso corporal, a fim de inibir o processo de divisão celular através da interferência na formação do fuso mitótico. Os animais foram, então, sacrificados após 40 a 60 minutos da injeção de colquicina, removendo-se os seus úmeros direito e esquerdo e, em alguns animais, também os fêmures. Esses ossos foram liberados dos feixes musculares e tendões e uma lasca das epífises foi retirada para que a medula ficasse exposta. Com o auxílio de uma seringa retirou-se a medula óssea com 4 a 6 ml de solução salina de Hanks, recolhendo-se o material em um tubo de centrífuga, onde ele foi ressuspendido vigorosamente para separar as massas celulares.

A suspensão celular foi então centrifugada, hipotonizada com KCl 0,075 M, fixada com metanol acético 3:1 e gotejada em lâminas geladas molhadas. O material assim preparado foi submetido às técnicas de coloração usual com Giemsa a 2%, bandamento G, bandamento C e marcação das RONs pela prata.

II.4. Técnicas de coloração e bandamento cromossômico

II.4.1. Coloração usual com Giemsa a 2%

O material foi previamente hidrolisado em HCl 1N a 60°C, por sete minutos, lavado pelo mesmo tempo em água

desionizada gelada para interromper a hidrólise, e por dez minutos, em água destilada corrente. Posteriormente, foi submetido a um banho rápido em solução tampão Sörensen, pH 6,8, corado com solução de Giemsa (MERCK) tamponado a 2%, por cerca de sete minutos, e lavado em água destilada.

II.4.2. Técnica de bandamento G

O bandamento G processou-se de acordo com a técnica de GROUCHY & TURLEAU (1977), com modificações. Lâminas com sete a quinze dias de fixação foram imersas em solução de álcool metílico 50%, por dez minutos. Após lavagem em água destilada, por dois minutos, foram transferidas para solução tampão Sörensen, pH 6,8, onde permaneceram por, no mínimo, trinta minutos. A seguir. as lâminas foram imersas em solução de tripsina (DIFCO) a 0,2%, tamponada com solução salina de PBS, por um tempo variável de cinco a vinte segundos, dependendo do período decorrido após a fixação do material. O excesso de tripsina foi retirado pela imersão em solução salina de PBS, sendo o material posteriormente corado com solução a 2% de Giemsa tamponada, por oito minutos e lavado em água destilada.

Em situações em que o matérial havia sido fixado há menos tempo foi necessário reduzir-se a concentração da tripsina para 0,1%.

II.4.3. Técnica de bandamento C

O bandamento C processou-se de acordo com a técnica de SUMNER (1972), também com modificações.

O material com 6 a 15 dias após a fixação foi submetido à hidrólise em HCl 0,2N, por quinze minutos. Completo o tempo, as lâminas foram lavadas em água desionizada gelada, secas e submetidas ao tratamento com solução de $Ba(OH)_2 . 2H_2O$ a 5%, sendo mantidas a 37ºC, por um tempo variável de 10 a 40 minutos, de acordo com o período decorrido após a fixação. A seguir, o material foi lavado em água destilada, banhado em água desionizada gelada e submetido a dois tratamentos com solução salina 2XSSC, pH 7,0, um à temperatura ambiente, por dez minutos e outro, por sessenta minutos à 60ºC. A seguir processou-se a desidratação, passando-se em duas séries de álcoois de concentrações 70% e 95%. Após a secagem, o material foi corado com solução a 2% de Giemsa tamponado, por vinte minutos.

II.4.4. Técnica de marcação das RONs pela prata

Para a marcação das RONs foi utilizada a técnica proposta por HOWELL & BLACK (1980) com modificações.

O material foi inicialmente hidrolizado em HCl 1N a 60ºC, por dez minutos, sendo a hidrólise interrompida por um banho em água gelada desionizada. Após a secagem das lâminas, uma gota de solução reveladora de gelatina formolizada a

1% e outra de solução aquosa de nitrato de prata (MERCK) a 50% foram depositadas em cada uma das extremidades da lâmina. Sobre as gotas misturadas foram colocadas duas lamínulas e as lâminas foram mantidas a 50º-60ºC, por cerca de 7 minutos, até que a mistura das soluções apresentasse uma coloração castanho dourada. A seguir, as lâminas foram lavadas em água destilada, secas e submetidas à coloração em solução a 2% de Giemsa tamponada, por oito minutos.

II.5. Análise citogenética

De cada espécime foram analisados os cariótipos nas preparações coradas classicamente e nas submetidas aos bandamentos G e C, sendo investigados os padrões representativos das espécies e as possíveis variações interindividuais.

Os cromossomos corados usualmente foram classificados segundo a morfologia e tamanho de acordo com LEVAN e col. (1964). Para montagem dos cariótipos, eles foram ordenados em ordem decrescente de tamanho, destacando-se os cromossomos sexuais.

No material marcado pela prata foram analisados os seguintes parâmetros: número de cromossomos com regiões organizadoras de nucléolos marcados por célula, freqüência de cromossomos metafásicos com RONs associadas e número e posição de nucléolos marcados por núcleos interfásicos. Procurou-se analisar, para cada animal, cerca de 50 metáfases submetidas a esse tratamento, selecionadas por terem os cromossomos sem superposições ou alterações produzidas pela técnica que dificultassem o estudo.

A contagem dos nucléolos marcados por núcleo interfásico procedeu-se nas mesmas lâminas em que foram analisadas as metáfases, sendo observados 150 núcleos para cada exemplar. Os nucléolos identificados foram distribuídos em classes de acordo com o número e posição que ocupavam no interior do núcleo, em relação à membrana nuclear.

II.6. Análise estatística

A homogeneidade das distribuições das freqüências de cromossomos com RONs marcadas por célula, entre os indivíduos de mesma espécie e entre as espécies, foi testada pelo Modelo Misto para Experimentos Hierárquicos (cf. PERES & SALDIVA, 1982), no qual o fator fixo foi a espécie e o fator aleatório foram os exemplares das espécies.

Para comparação das freqüências de cromossomos com RONs marcadas por célula e de nucleólos corados por núcleo interfásico, utilizou-se o teste de Qui-Quadrado. Nos dois testes fixou-se em 5% o nível crítico de rejeição da hipótese de nulidade.

III. RESULTADOS

III.1. Número e localização dos RONs e padrões de bandas G e C

III.1.1. Subfamília Phyllostominae

Da espécie *Phyllostomus discolor* foram analisados dois exemplares, um macho e uma fêmea. O número diplóide de cromossomos desta espécie é igual a 32 (2n = 32) e o número de braços do complemento autossômico, ou seja, o número fundamental (NF), é igual a 60 (NF = 60). Seu cariótipo, apresentado na Figura 2.A, constitui-se de quinze pares de autossomos metacêntricos e submetacêntricos, o menor dos quais apresenta em seus braços curtos uma constrição secundária subterminal e satélites, não visíveis na figura devido a contração cromossômica. O cromossomo X é um submetacêntrico de tamanho médio que não se diferencia morfologicamente dos autossomos, e o Y é acrocêntrico e pequeno. As regiões organizadoras de nucléolos (RONs), localizam-se na extremidade distal do braço curto do par 15, o menor do complemento (Figura 2.B-D) e, em algumas metáfases, mostram-se em associação (Figura 2.E e F).

Não foi possível a obtenção dos padrões de bandas G e C desta espécie.

Da espécie *Phyllostomus hastatus* foram analisados sete exemplares, sendo quatro machos e três fêmeas. Seu complemento cromossômico apresenta 2n = 32 e NF 2 58. Há quinze pares de autossomos, quatorze metacêntricos e submetacêntricos

e um, o menor deles, acrocêntrico com constrição secundária e satélites nos braços curtos (Figura 3.A). O cromossomo X é submetacêntrico de tamanho médio não diferenciável morfologicamente, e o cromossomo Y é acrocêntrico pequeno. As RONs localizam-se na extremidade distal do braço curto, no local da constrição secundária dos acrocêntricos pequenos (Figura 3.B-D), que também aparecem associados em algumas metáfases (Figura 3.E e F).

O padrão de bandas G de *Phyllostomus hastatus* é mostrado na Figura 4.A. A heterocromatina constitutiva, evidenciada pela banda C, restringe-se às regiões centroméricas de todos os autossomos e do cromossomo X, havendo alguns cromossomos com bandas mais fortes que outros. O cromossomo Y apresenta-se inteiramente heterocromático (Figura 4.B).

III.1.2. Subfamília Glossophaginae

Da subfamília Glossophaginae também foram analisadas duas espécies: *Anoura caudifer* e *Glossophaga soricina*. Da espécie *A. caudifer* analisaram-se sete exemplares, sendo um macho e seis fêmeas, todos com 2n = 30 e NF = 54. Seu cariótipo constitui-se de quatorze pares de cromossomos autossômicos, sendo onze pares metacêntricos e submetacêntricos (1 a 3 e 6 a 13), dois pares subtelocêntricos (5 e 6) e um par, o menor (14), acrocêntrico e com satélites nos braços curtos (Figura 5.A). O cromossomo X é submetacêntrico de tamanho médio e semelhante morfologicamente aos demais cromossomos e o Y é acrocêntrico pequeno. As RONs localizam-se na extremidade distal do braço curto do par 14, no local da constrição secundária (Figura 5.B) e também podem ser vistas em associação na metáfase (Figura 5.C e D).

A Figura 6 mostra os padrões de bandas G e C de *A. caudifer*. A heterocromatina constitutiva localiza-se nas regiões centroméricas, havendo cromossomos com blocos heterocromáticos maiores que outros. O cromossomo Y é inteiramente heterocromático.

Da espécie *Glossophaga soricina* analisaram-se sete exemplares, sendo três machos e quatro fêmeas. A espécie apresenta 2n = 32 e NF = 60. Há quinze pares de autossomos metacêntricos e submetacêntricos e um par de cromossomos sexuais, sendo o cromossomo X metacêntrico de tamanho médio sem nenhuma diferenciação morfológica, e o cromossomo Y acrocêntrico pequeno (Figura 7.A). No par autossômico de menor tamanho, que é submetacêntrico, encontra-se uma grande constrição secundária na região proximal do braço longo, onde localizam-se as RONs (Figura 7.B e C). Na Figura 7.D e E observam-se esses cromossomos em associação.

O padrão de bandamentos G de *G. soricina* é mostrado na Figura 8.A. A heterocromatina constitutiva aparece nas regiões centroméricas de todos os autossomos e por todo o braço longo do cromossomo 15, exceto na constrição secundária. O cromossomo X apresenta apenas heterocromatina centromérica e o cromossomo Y marca-se fracamente (Figura 8.B).

III.1.3. Subfamília Carolliinae

Analisaram-se desta subfamília, sete exemplares da espécie *Carollia perspicillata*, sendo quatro machos e três fêmeas. Esta espécie tem 2n = 20 na fêmea e 21 no macho e NF = 36. Os autossomos consistem em um par de cromossomos sub-

metacêntricos muito grandes (1), dois pares subtelocêntricos grandes (2 e 3) e seis pares de metacêntricos e submetacêntricos pequenos (4 a 9) (Figura 9.A). O sistema de determinação sexual é o do tipo XX/XY_1Y_2 e deriva de uma translocação entre o cromossomo X original e um autossomo, cujo homólogo livre nos machos é um cromossomo telocêntrico, designado Y_2. O cromossomo Y_1, o verdadeiro Y é acrocêntrico pequeno. A translocação X/autossomo, manifesta-se como um subtelocêntrico grande, com acentuada constrição secundária no braço longo onde se encontram as RONs, que não são observadas no cromossomo Y_2 (Figura 9.B).

O padrão de bandas G de *C. perspicillata* está apresentado na Figura 10.A, na qual pode-se verificar a homologia das bandas do braço longo do cromossomo X e do Y_2. Na Figura 10.B apresenta-se o cariótipo de *C. perspicillata*, após bandamento C. Há heterocromatina constitutiva centromérica em todos os autossomos e no cromossomo X. Uma banda intersticial é vista em um dos braços do maior par de autossomos e bandas teloméricas aparecem nos pares 2, 3, 5 e X, diferindo, porém, no tamanho do bloco corado. O cromossomo Y_1 apresenta-se quase que totalmente heterocromático.

III.1.4. Subfamília Stenodermatinae

Analisaram-se seis espécies pertencentes a quatro gêneros: *Artibeus*, *Chiroderma*, *Sturnira* e *Vampyrops*.

Do gênero *Artibeus* foram analisadas duas espécies: *A. lituratus*, sendo cinco machos e duas fêmeas, e *A. planirostris*, sendo quatro machos e três fêmeas. Ambas têm 2n = 30 nas fêmeas e 31 nos machos e NF = 56. Os complementos cromossô

micos dessas espécies são muito semelhantes, sendo constituídos por onze pares de cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos (1 a 4 e 8 a 14) e três pares de cromossomos subtelocêntricos (5 a 7) (Figuras 11.A e 12.A). Nessas espécies, o sistema de determinação sexual, à semalhança do encontrado em *C. perpicillata*, resulta de uma translocação X/autossomo. O cromossomo X resultante, que não se diferencia morfologicamente dos autossomos é um subtelocêntrico de tamanho médio, o cromossomo Y_1, o verdadeiro Y, é acrocêntrico pequeno e o Y_2, o homólogo livre do autossomo translocado no cromossomo X, é *acrocêntrico*, com cerca de o dobro do tamanho do Y_1. Constrições secundárias e satélites foram visualizadas nos braços curtos dos cromossomos subtelocêntricos, em número variável de um a quatro por metáfase. Em ambas as espécies esses pares de cromossomos apresentam RONs na região distal do braço curto (Figuras 11.B e 12.B). A associação de RONs em cromossomos metafásicos não foi encontrada em *A. planirostris* e é muito rara em *A. lituratus*.

Os padrões de bandas G e C de *A. lituratus* e *A. planirostris* são muito semelhantes e estão apresentados nas Figuras 13 e 14, respectivamente. Os pares 1, 2 e 3 apresentam heterocromatina constitutiva nos centrômeros e em uma banda intersticial no braço longo, os pares 5, 6, 7 e 9 a apresentam nos centrômeros e nos telômeros dos braços curtos e os pares 4, 8, 10, 11, 12, 13 e 14 a apresentam apenas nos centrômeros. O cromossomo X manifesta heterocromatina centromérica nos telômeros dos braços curtos e na região mediana do braço longo, o cromossomo Y_2 a apresenta na região terminal do braço longo e no centrômero, à semelhança do braço curto do X, e o cromossomo Y_1 é inteiramente heterocromático.

Do gênero *Chiroderma* foram analisadas duas espécies: *C. doriae*, com 4 fêmeas, e *C. villosum*, com um macho e uma fêmea. Ambas apresentam 2n = 26 e NF = 48 e seus complementos constituem-se por doze pares de autossomos, sendo nove metacêntricos ou submetacêntricos (1 a 5, 8, 10 a 12) e três subtelocêntricos (6, 7 e 9) (Figuras 15.A e 16.A). Os cromossomos X são subtelocêntricos médios e não apresentam diferenciação morfológica visível, e o cromossomo Y é submetacêntrico pequeno em *C. villosum*. Os cromossomos sexuais de *C.doriae* foram estabelecidos considerando-se a similaridade do padrão de bandas G desta espécie com o reverso do padrão de bandas R de *C. villosum* (TUCKER, 1986). Em *C. doriae* os três pares de cromossomos subtelocêntricos (pares 6, 7 e 9) tem RONs nas regiões distais dos braços curtos (Figura 15.B), enquanto em *C. villosum* só o maior par de cromossomos subtelocêntricos (6) as apresentam (Figura 16.B). As associações entre as RONs, nos cromossomos metafásicos, são raras em ambas as espécies.

Os padrões de bandas G e C de *C. doriae* e de bandas C de *C. villosum* são apresentados nas Figuras 17.A e B e 16.C, respectivamente. A heterocromatina constitutiva apresenta-se apenas nas regiões centroméricas dos cromossomos.

Da espécie *Sturnira lilium* foram analisados sete exemplares, sendo cinco machos e duas fêmeas. Seu cariótipo apresenta 2n = 30 e NF = 56 e assemelha-se morfologicamente ao de *Artibeus*, tendo onze pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (1 a 4 e 8 a 14) e três pares de subtelocêntricos (5 a 7). O cromossomo X é subtelocêntrico médio e o cromossomo Y é submetacêntrico pequeno (Figura 18.A). O menor par de cromossomos subtelocêntricos (7) apresenta uma constrição secundária em seus braços curtos (Figura 18.B), onde se localizam as RONs (Figura 18.C,D e F).

Há associação de RONs na metáfase (Figura 18.E), porém em frequência muito baixa.

Na Figura 19 mostram-se os padrões de bandas G e C de *S. lilium*. A heterocromatina constitutiva distribui-se pelos centrômeros de todos os cromossomos, nas regiões teloméricas dos braços curtos dos pares 5, 6, 7, 9 e X, e nos telômeros de ambos os braços do cromossomo Y.

Da espécie *Vampyrops lineatus* foram analisados sete exemplares, sendo quatro machos e três fêmeas. Seu cariótipo também assemelha-se morfologicamente aos de *Artibeus* e *Sturnira*, com 2n = 30 e NF = 56 (Figura 20.A). Da mesma forma que em *S. lilium*, em *V. lineatus* as RONs localizam-se na região de constrição secundária do braço curto do par 7 (Figura 20.B-D) e sua associação na metáfase (Figura 20.E) é bastante rara.

Na Figura 21.A está apresentado o cariótipo com o padrão de bandas G de *V. lineatus*, também similar ao de *Artibeus* e *Sturnira*. As regiões de heterocromatina constitutiva marcadas pela banda C, não se restringem apenas às regiões centroméricas, ocorrendo também heterocromatina intercalar em ambos os braços do maior par cromossômico e nos braços longos dos cromossomos 2, 3, 5, 6, 7, 8 e X, e terminal nos braços curtos dos pares 5, 6, 7 e X (Figura 21.B).

III.1.5. Subfamília Desmodontinae

Analisaram-se exemplares de duas espécies: *Desmodus rotundus*, sendo cinco machos e duas fêmeas, e *Diaemus*

youngi, um macho. A espécie *D. rotundus* apresenta 2n = 28 e NF = 52. Seu complemento cromossômico constitui-se de treze pares de cromossomos dos quais cinco são metacêntricos (1, 5, 7, 9 e 10) e oito submetacêntrico (2, 4, 5, 6, 8, 11, 12 e 13),com o par 8, apresentando evidente constrição secundária na região proximal do braço longo (Figura 22.A). O cromossomo X é metacêntrico de tamanho médio e morfologicamente semelhante aos demais autossomos e o Y é metacêntrico pequeno. As RONs localizam-se na constrição secundária do par 8 (Figura 22.B e C), e só raramente aparecem em associação.

Cariótipos com bandas G e C dessa espécie estão apresentados na Figura 23. A heterocromatina constitutiva é evidenciada nos centrômeros de todos os cromossomos, os pares 1, 4 e 5 apresentam também uma banda intersticial nos seus braços curtos e longos e o cromossomo Y apresenta-se fracamente marcado.

A espécie *Diaemus youngi* apresenta 2n = 32 e NF = 60. Seu cariótipo constitui-se de quinze pares de autossomos metacêntricos e submetacêntricos, o menor dos quais tem acentuada constrição secundária na região proximal do braço longo (Figura 24.A e C). O cromossomo X é submetacêntrico de tamanho médio e não apresenta nenhuma caracterização morfológica e o Y é acrocêntrico pequeno. As RONs dispõem-se no menor autossomo, no local da constrição secundária (Figura 24.B e D), e também associam-se muito raramente na metáfase. O padrão de bandas G de *D. youngi* está apresentado na Figura 25.A e o de banda C na Figura 25.B. Nos pares 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 a heterocromatina constitutiva é visualizada somente na região centromérica, nos pares 9, 10, 11 e 14 manifesta-se nas regiões centroméricas e nas regiões teloméricas dos braços curtos e nos pares



FIGURA 2. Cariótipo de *Phyllostomus discolor*. A: com coloração usual; B-D: localização das RONs; E,F: associação de RONs.

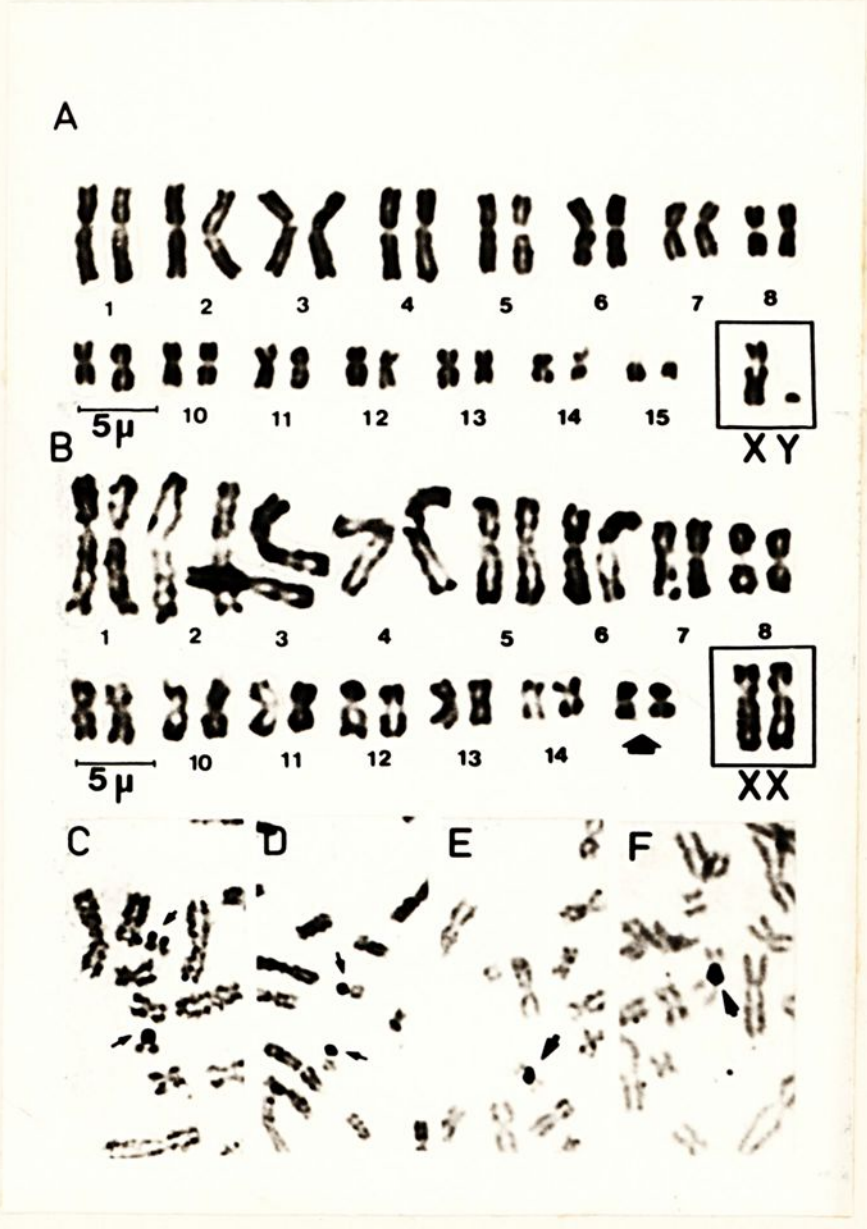


FIGURA 3. Cariótipo de *Phyllostomus hastatus*. A: com coloração usual; B-D: localização das RONs;E,F: associação de RONs.

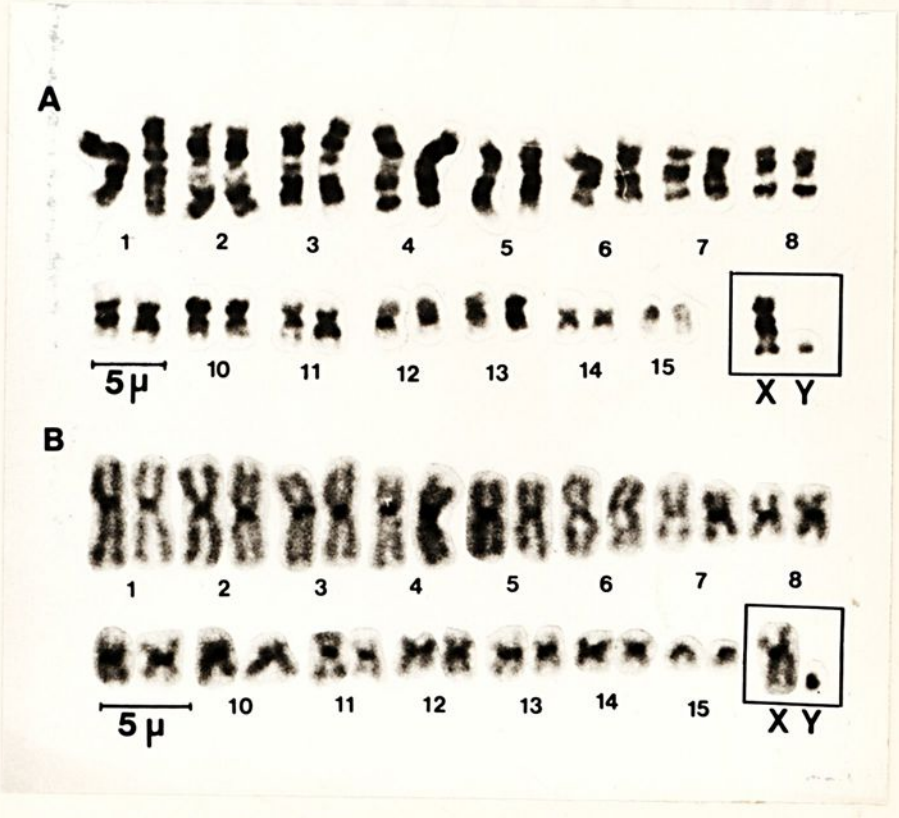


FIGURA 4. Cariótipo de *Phyllostomus hastatus*. A: com bandas G; B: com bandas C.

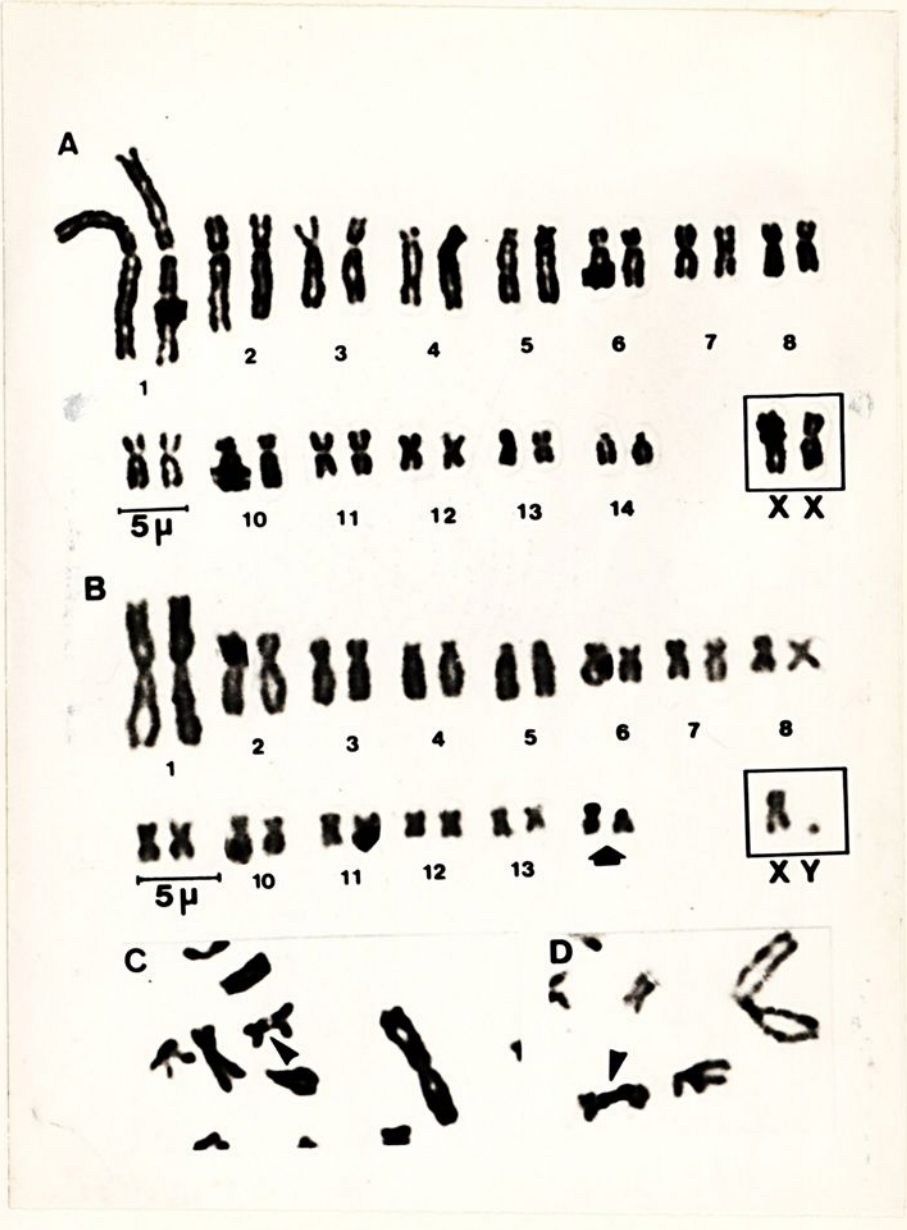


FIGURA 5. Cariótipo de *Anoura caudifer*. A: com coloração usual; B: localização das RONs; C,D: associação de RONs.

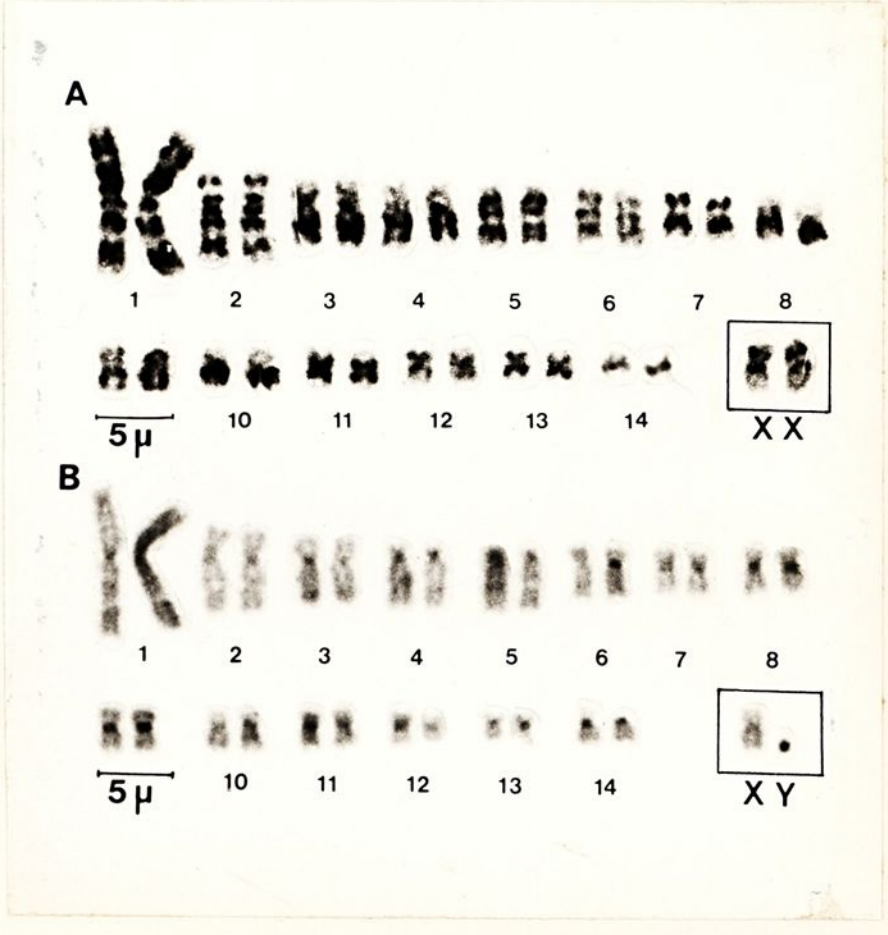


FIGURA 6. Cariótipo de *Anoura caudifer*. A: com bandas G, B: com bandas C.

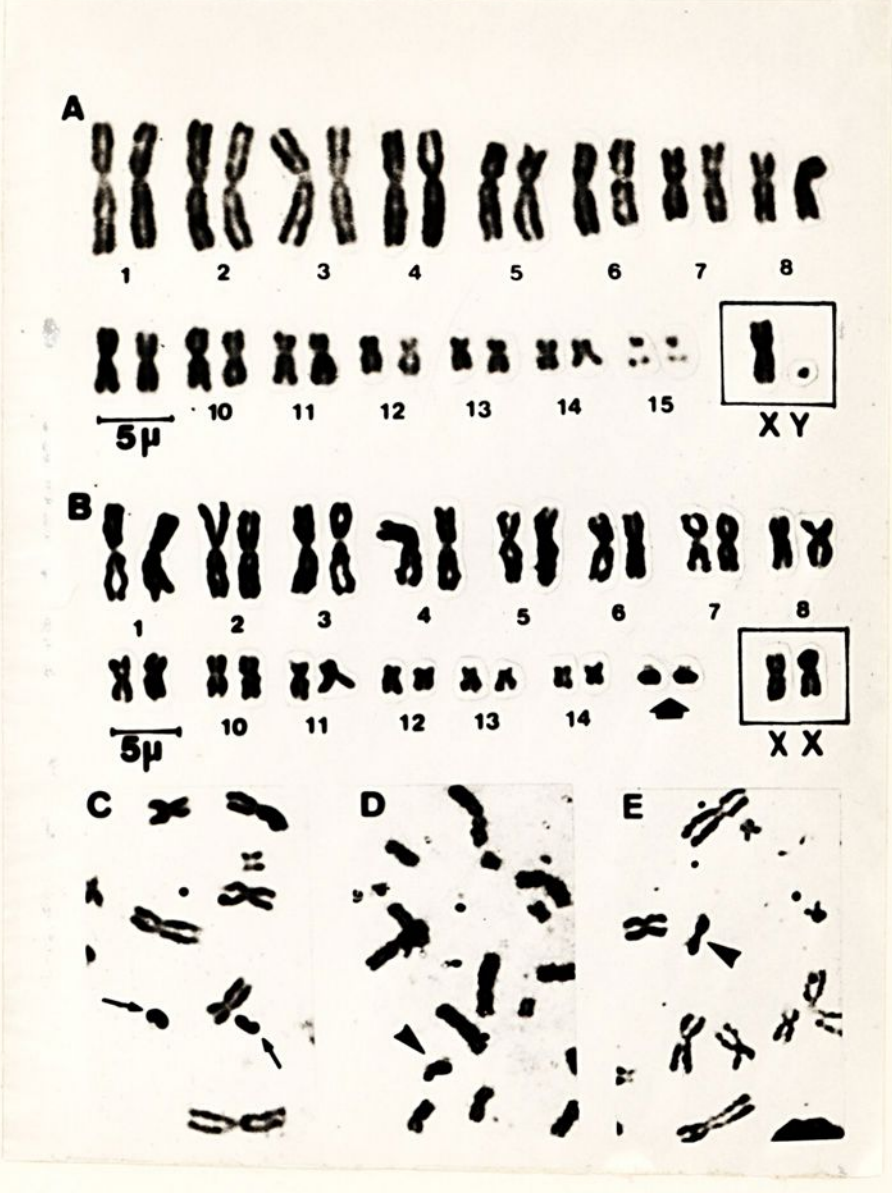


FIGURA 7. Cariótipo de *Glossophaga soricina*. A: com coloração usual; B,C: localização das RONs; D,E: associação de RONs.

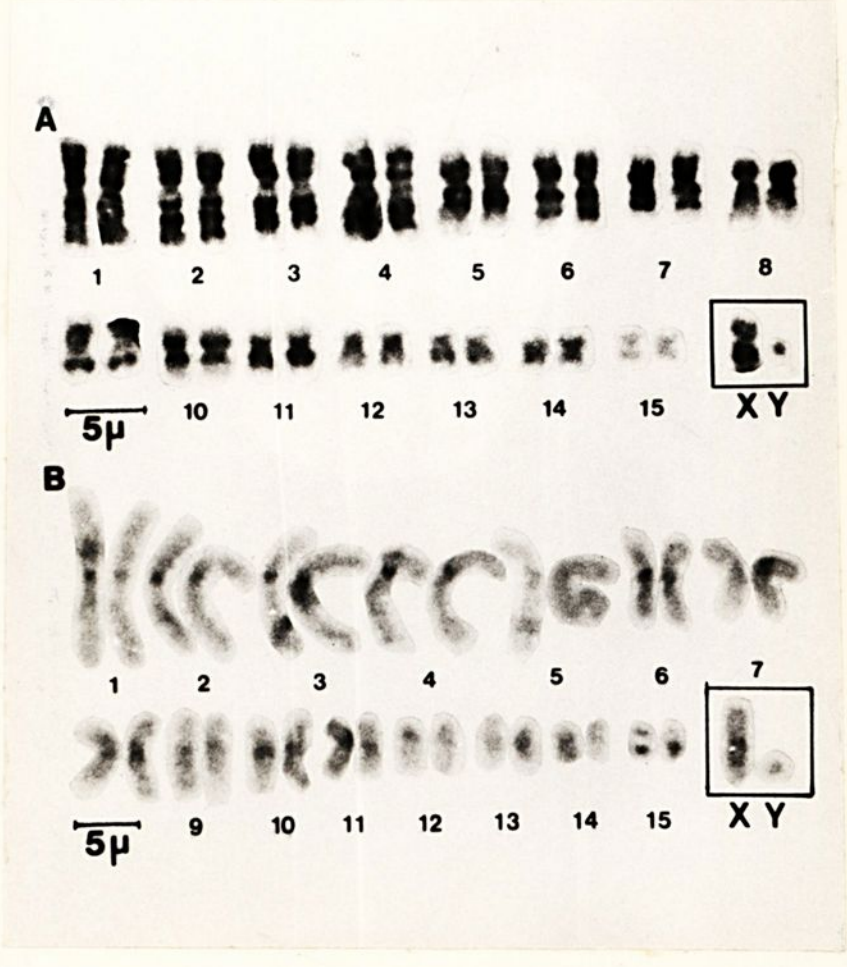


FIGURA 8. Cariótipo de *Glossophaga soricina*. A: com bandas G; B: com bandas C.

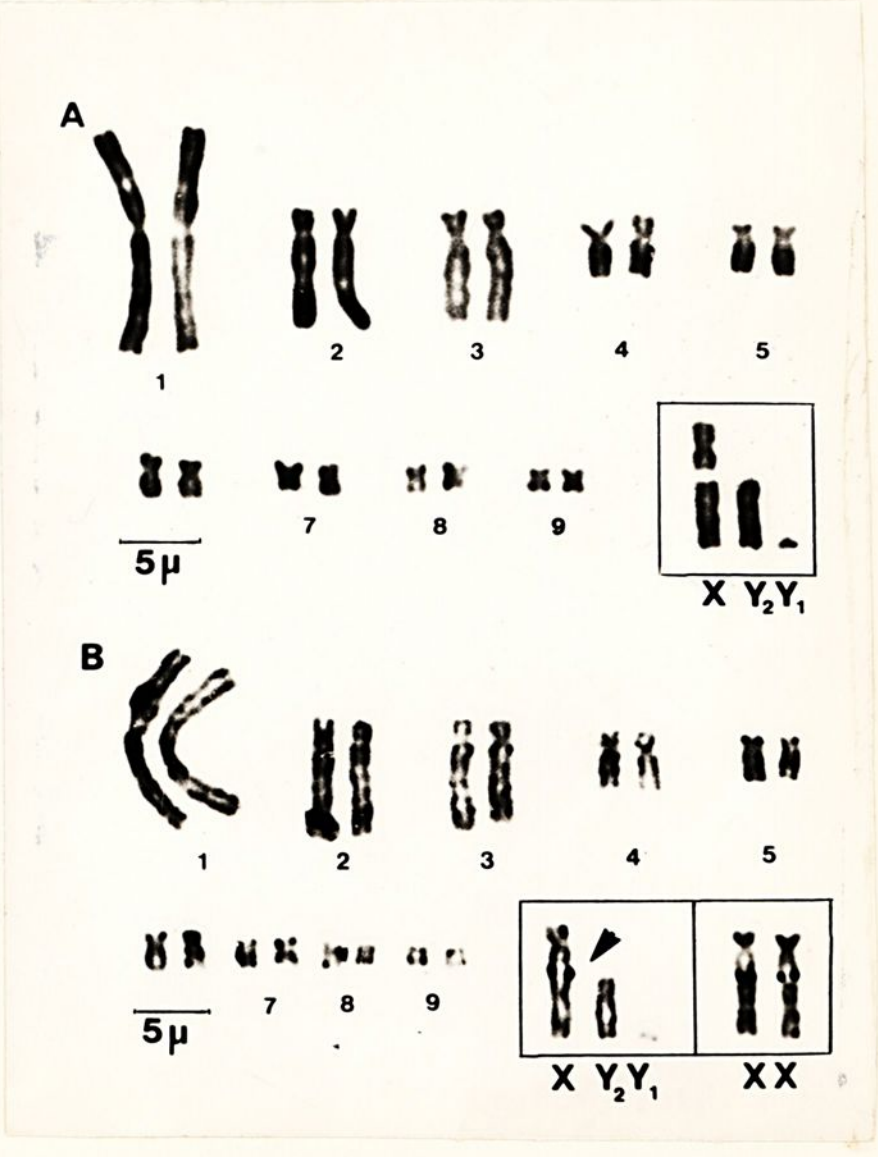


FIGURA 9. Cariótipo de *Carollia perspicillata*. A: com coloração usual; B: localização das RONs.

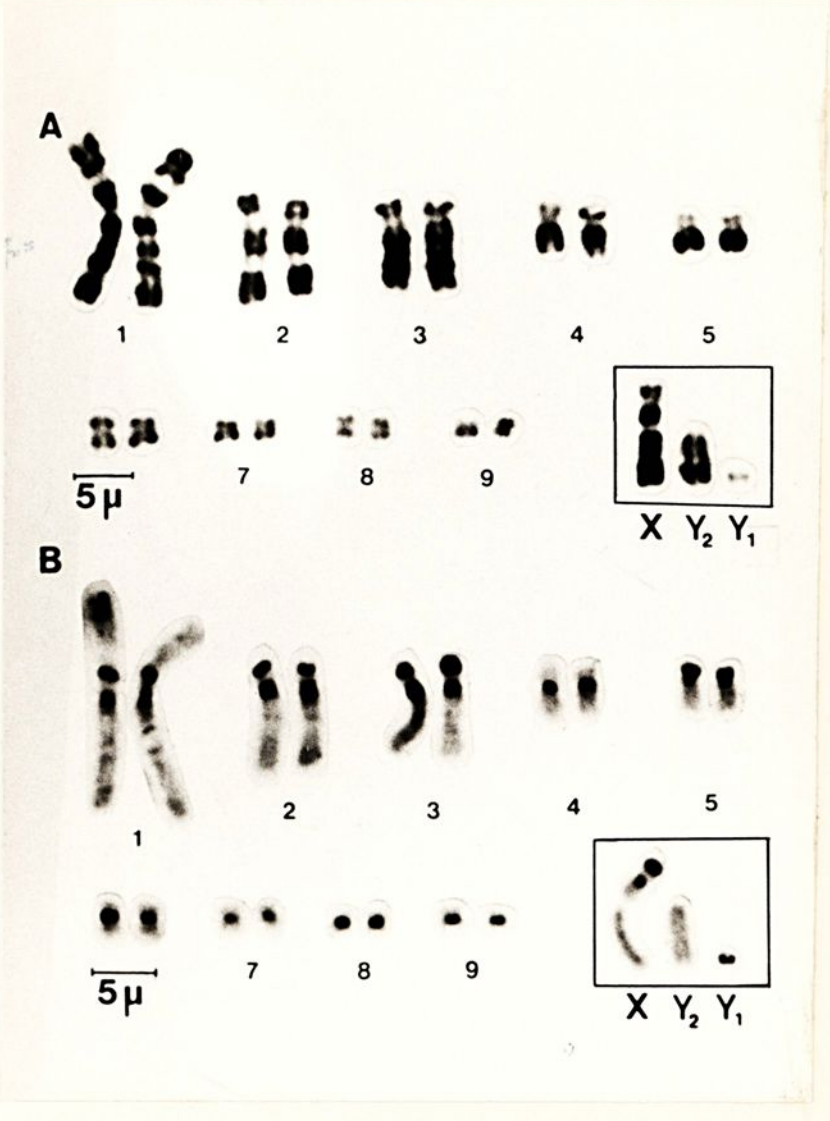


FIGURA 10. Cariótipo de *Carollia perspicillata*. A: com bandas G; B: com bandas C.

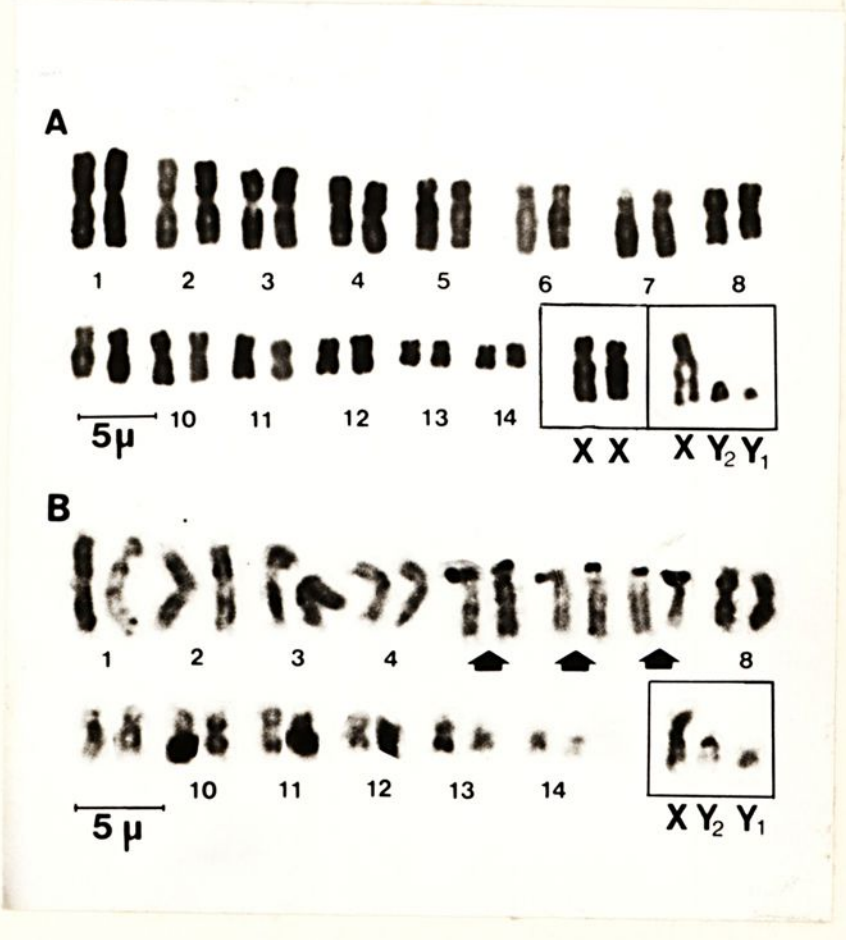


FIGURA 11. Cariótipo de *Artibeus lituratus*. A: com coloração usual; B: localização das RONs.

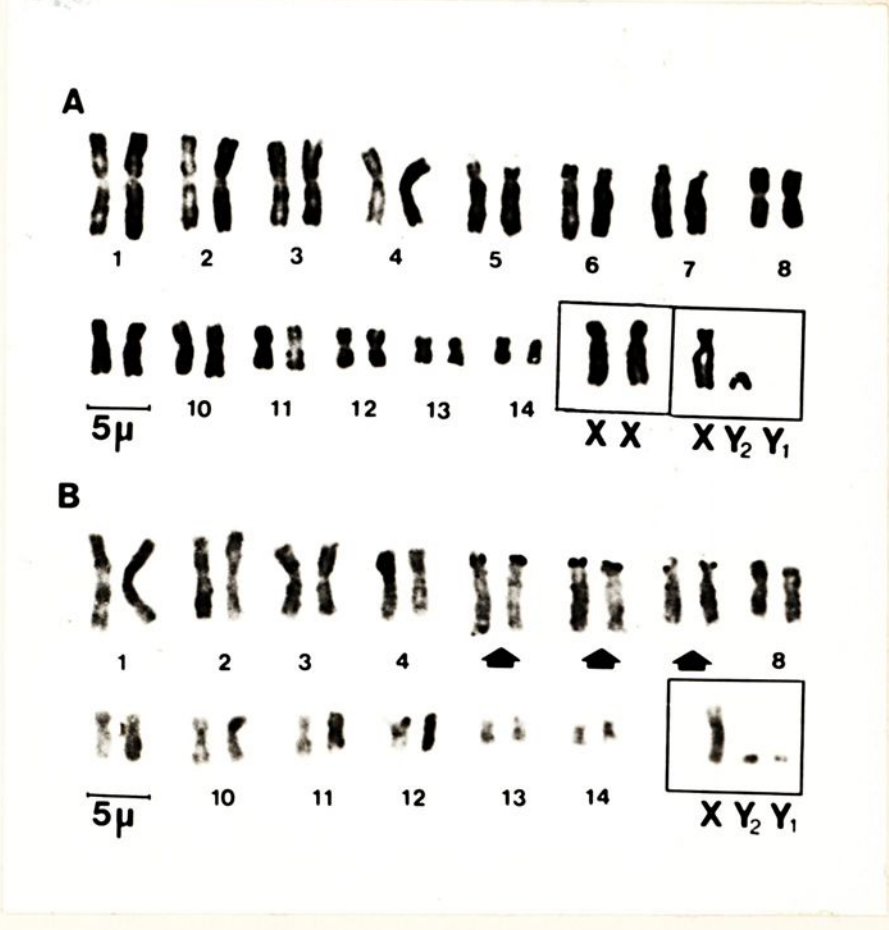


FIGURA 12. Cariótipo de *Artibeus planirostris*. A: com coloração usual; B: localização das RONs.

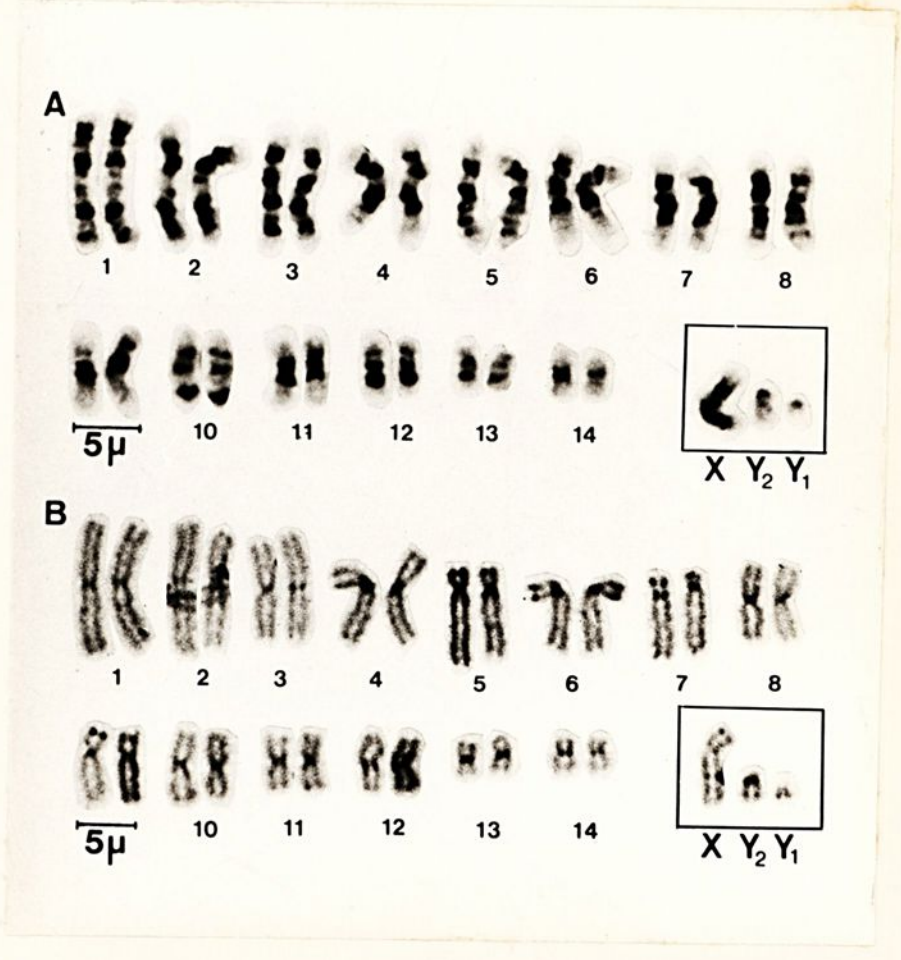


FIGURA 13. Cariótipo de *Artibeus lituratus*. A: com bandas G; B: com bandas C.



FIGURA 14. Cariótipo de *Artibeus planirostris*. A: com bandas G; B: com bandas C.

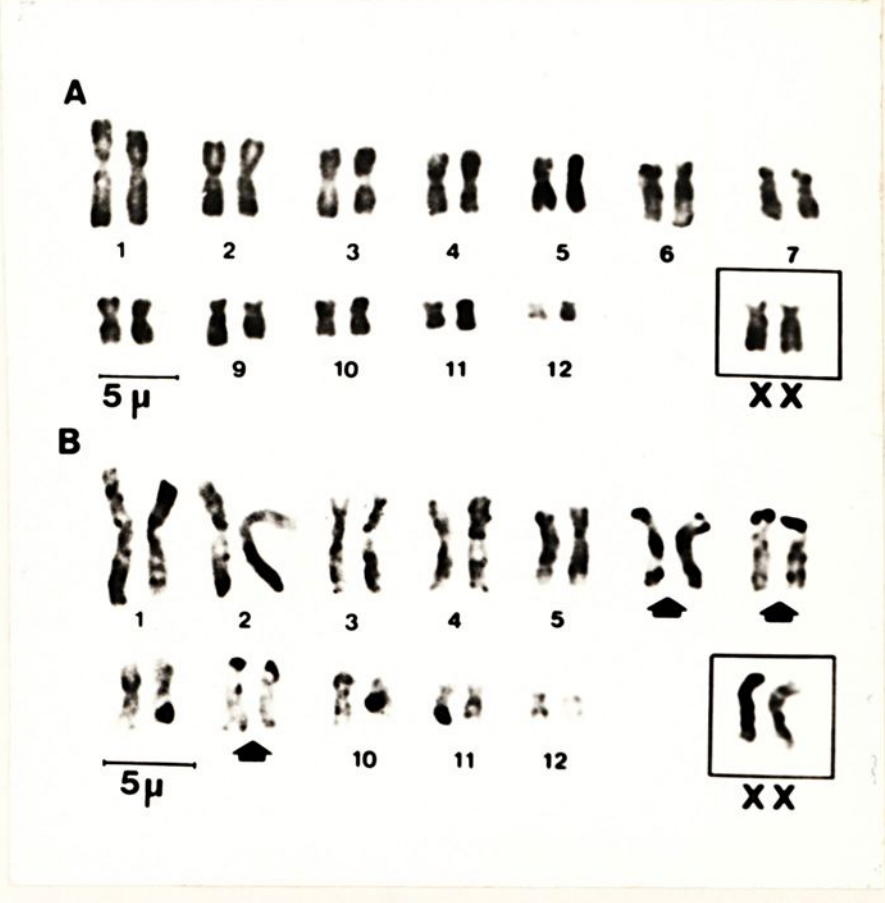


FIGURA 15. Cariótipo de *Chiroderma doriae*. A: com coloração usual; B: localização das RONs.

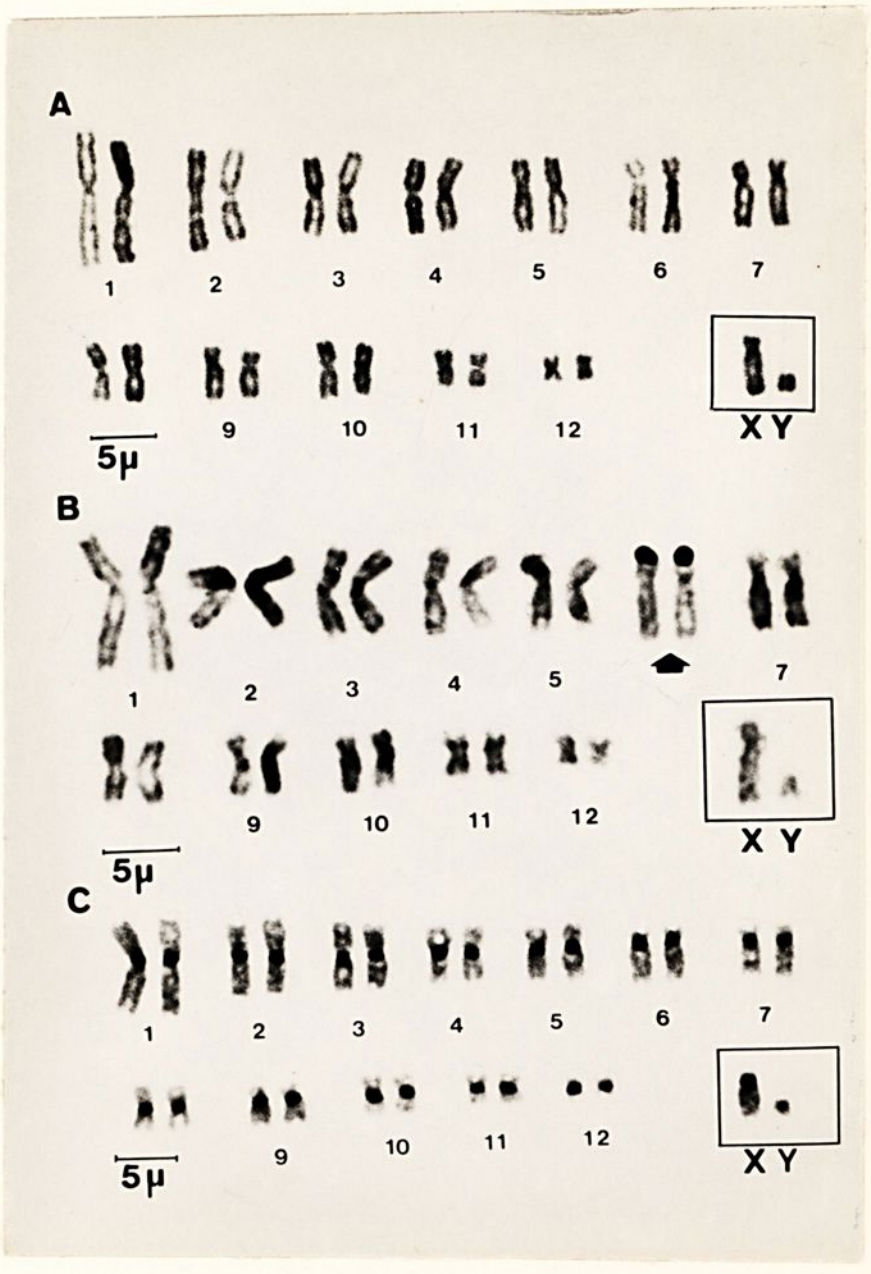


FIGURA 16. Cariótipo de *Chiroderma villosum*. A: com coloração usual; B: localização das RONs; C: com bandas C.

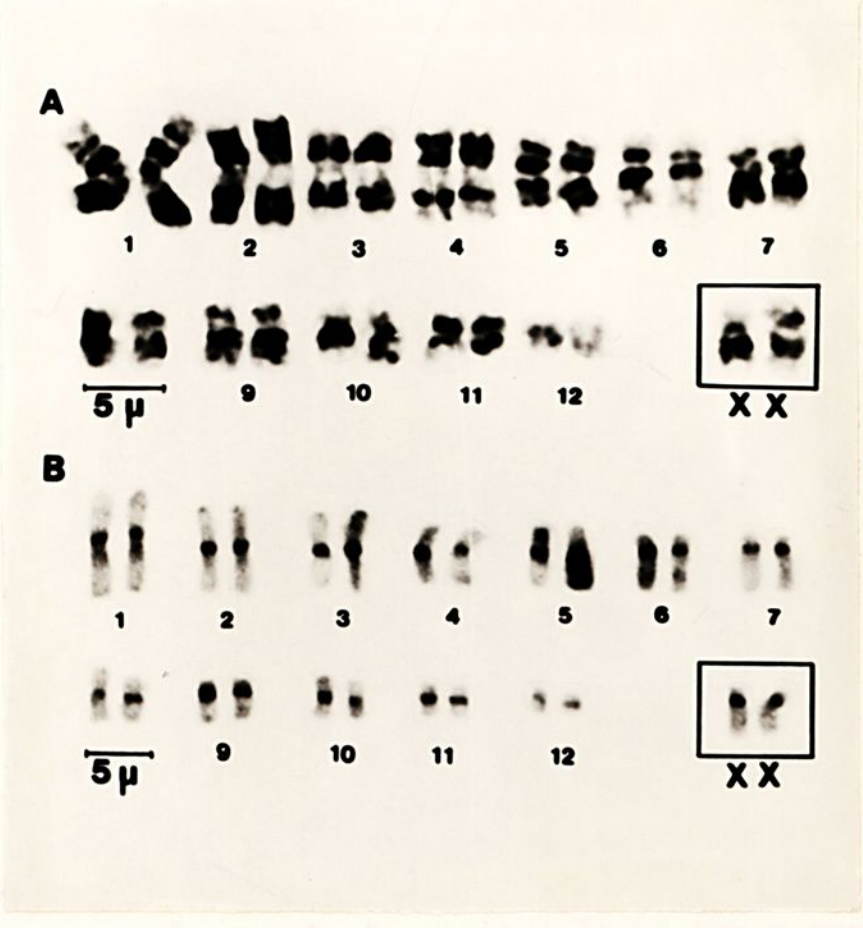


FIGURA 17. Cariótipo de *Chiroderma doriae*. A: com bandas G; B: com bandas C.

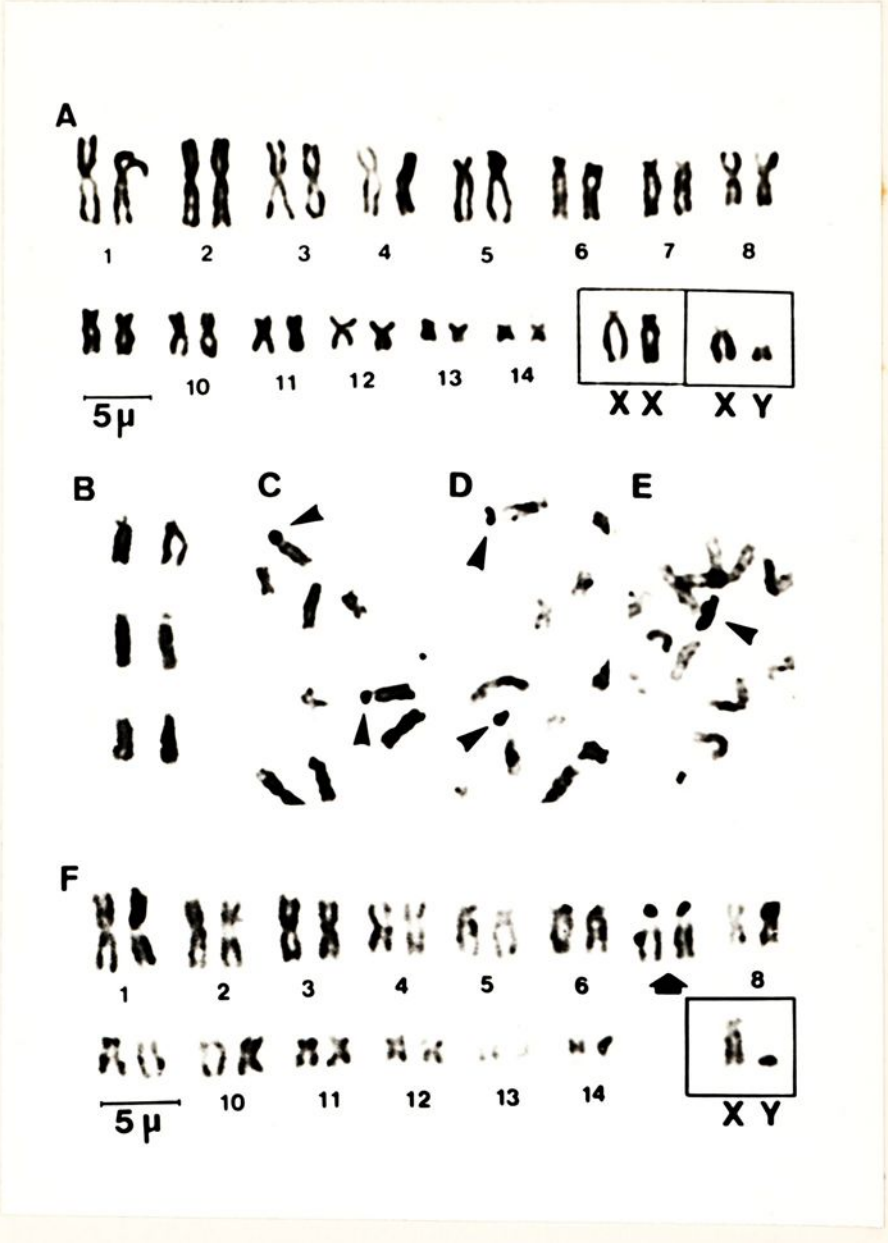


FIGURA 18. Cariótipo de *Sturnira lilium*. A: com coloração usual; B: constrição no braço curto do par 7 em três metáfases diferentes;C,D e F: localização das RONs; E: associação de RONs.

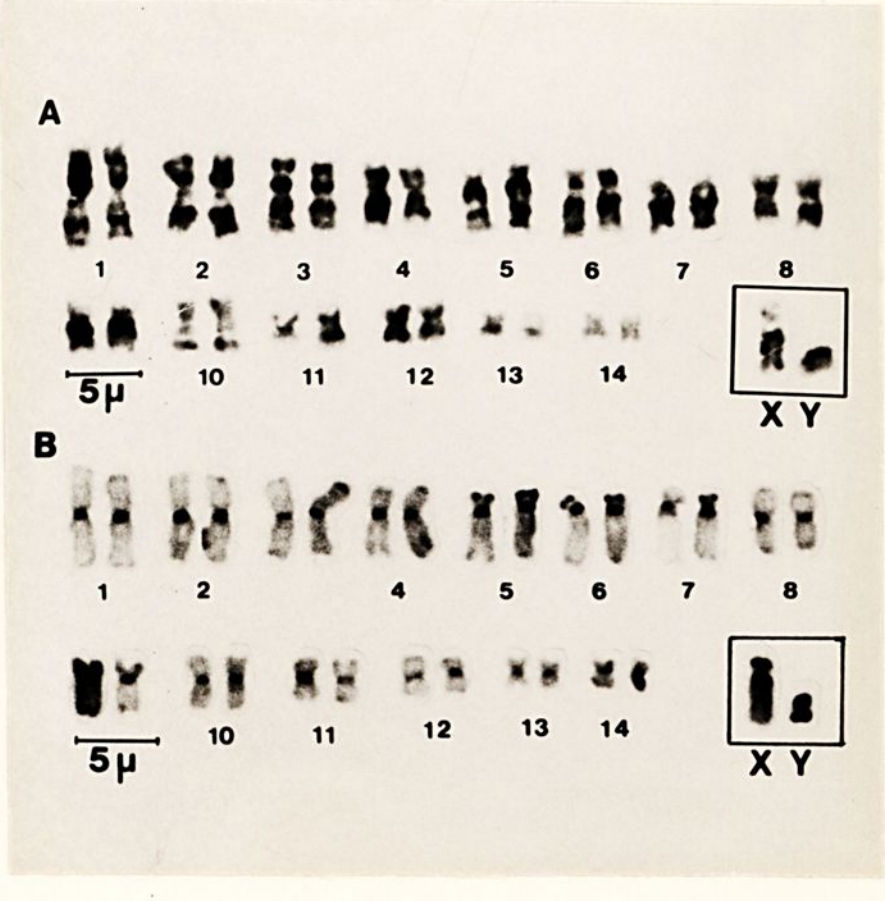


FIGURA 19. Cariótipo de *Sturnira lilium*. A: com bandas G; B: com bandas C.

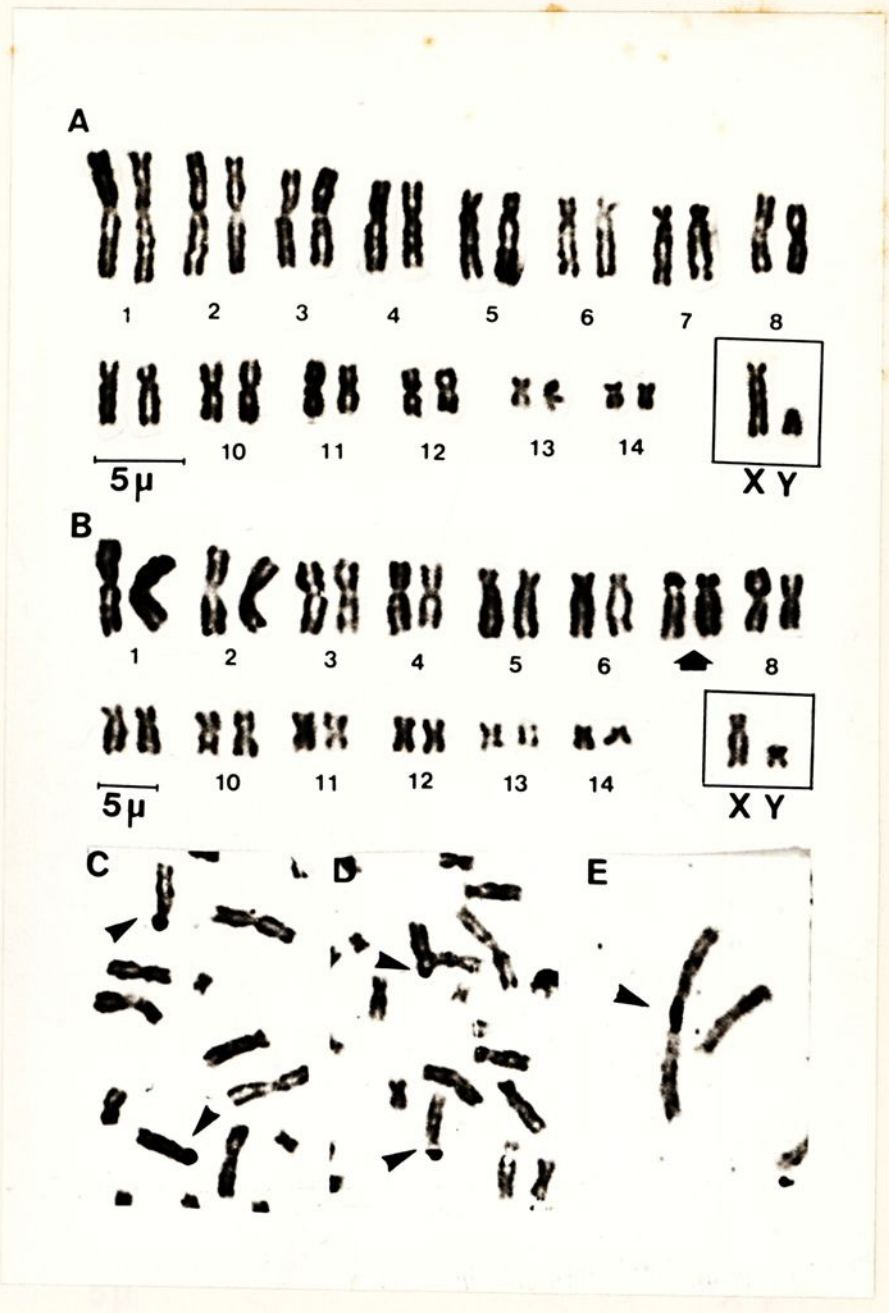


FIGURA 20. Cariótipo de *Vampyrops lineatus*. A: com coloração usual; B-D: localização das RONs; E: associação de RONs.

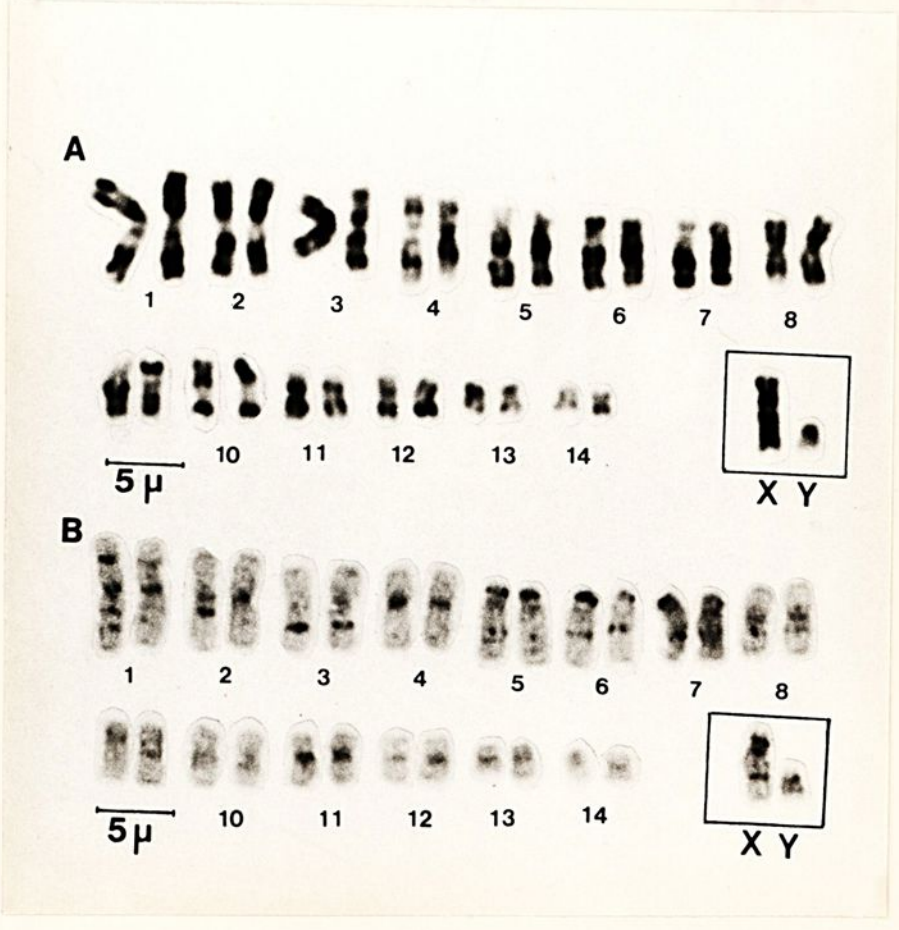


FIGURA 21. Cariótipo de *Vampyrops lineatus*. A: com bandas G; B: com bandas C.

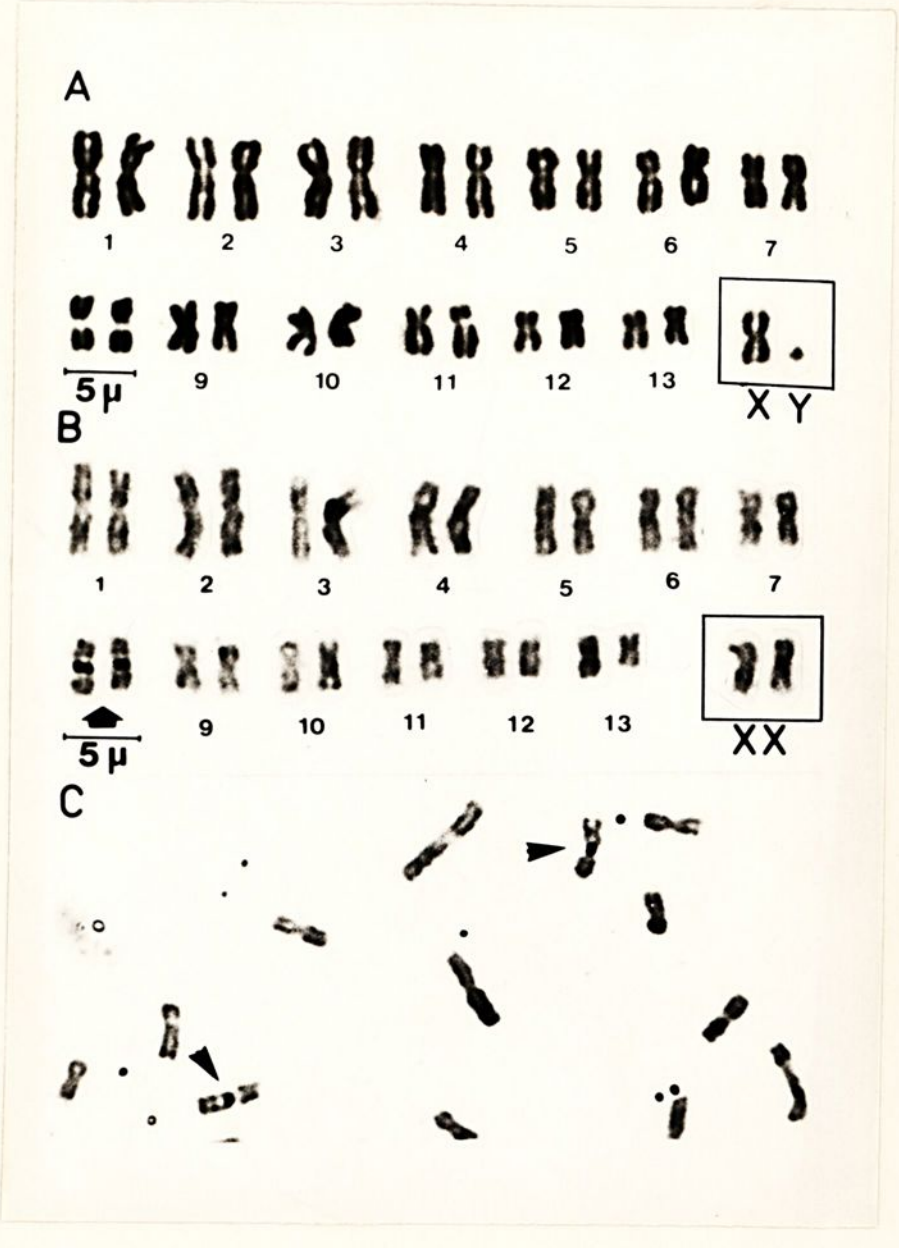


FIGURA 22. Cariótipo de *Desmodus rotundus*. A: com coloração usual; B,C: localização das RONs.



FIGURA 23. Cariótipo de *Desmodus rotundus*. A: com bandas G; B: com bandas C.

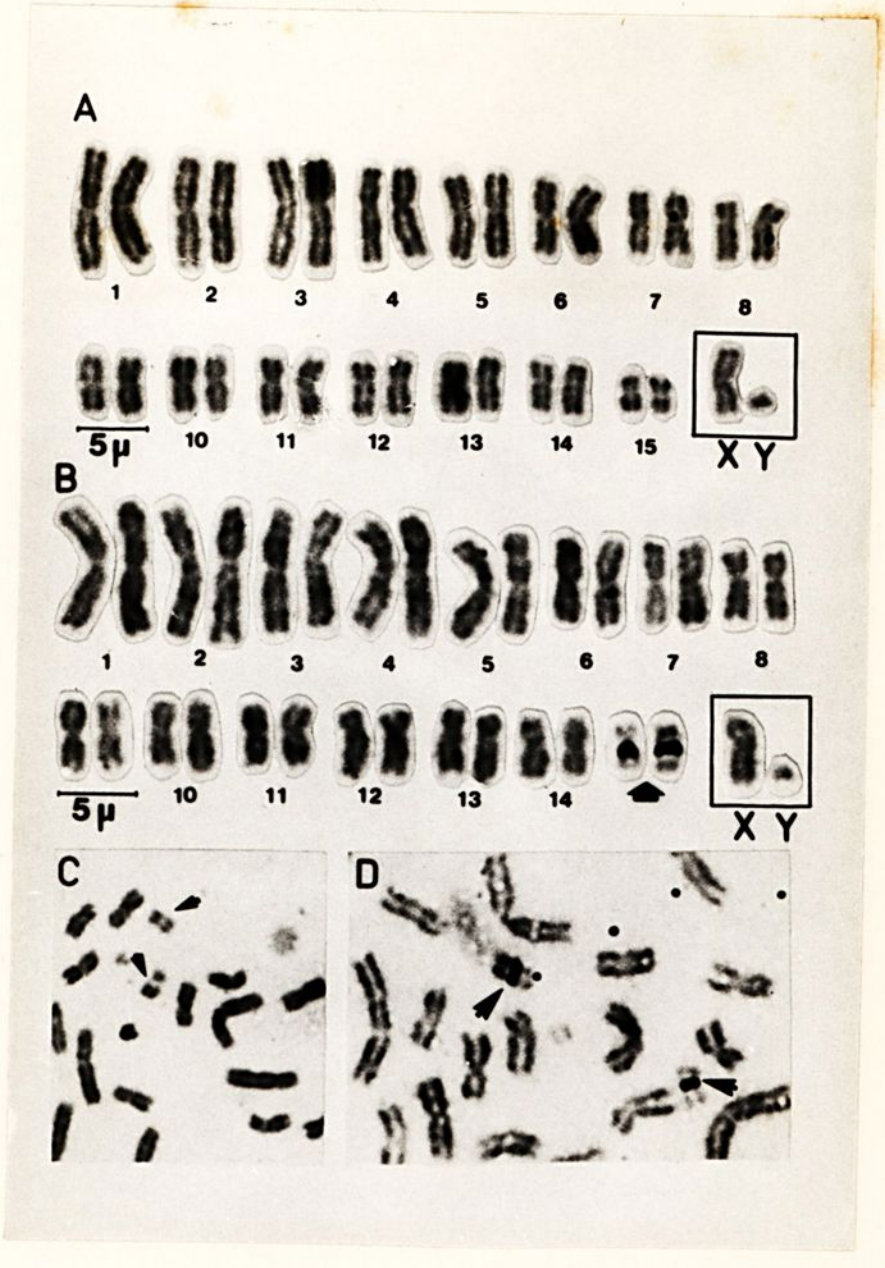


FIGURA 24. Cariótipo de *Diaemus youngi*. A: com coloração usual; B: localização das RONs; C: par 15 com constrição acentuada; D: RONs no par 15.

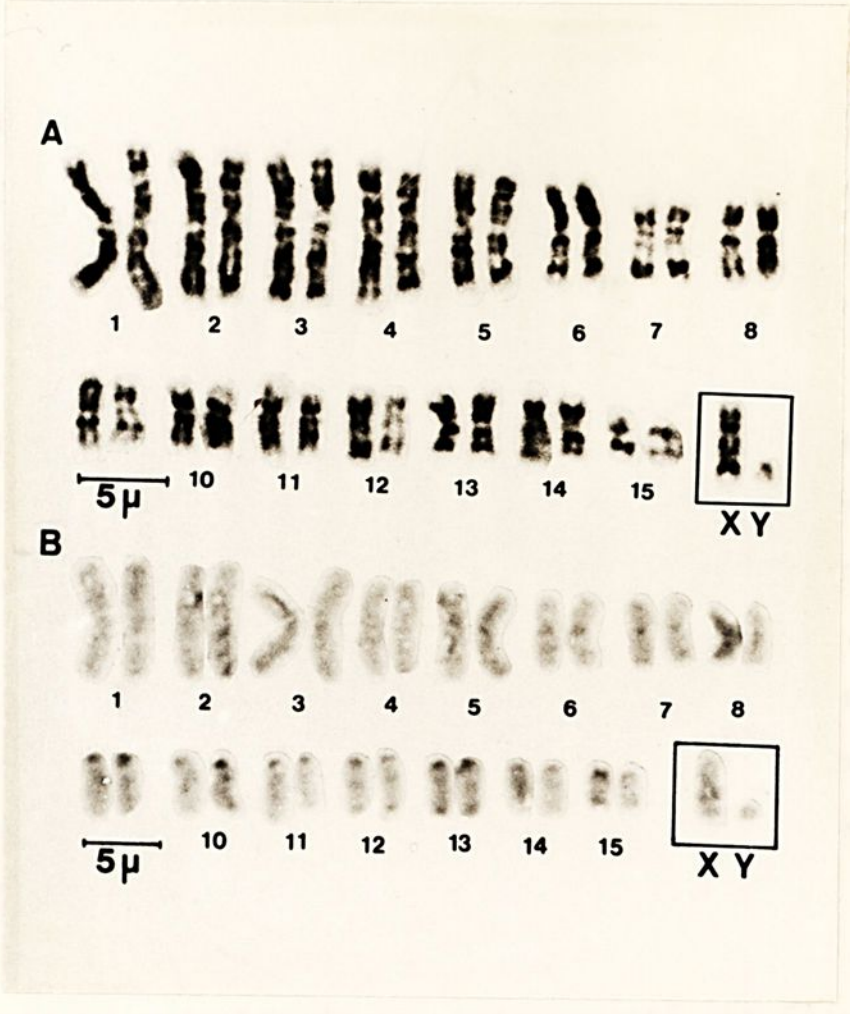


FIGURA 25. Cariótipo de *Diaemus youngi*. A: com bandas G; B: com bandas C.

12, 13 e 15 aparece nos centrômeros e nas regiões terminais dos braços curtos e longos. O cromossomo X tem uma banda centromérica e uma banda intersticial na região mediana do braço longo e, no cromossomo Y, a heterocromatina restringe-se aos telômeros dos braços longos.

III.2. Freqüência de RONs marcadas por metáfase e de metáfases com associação de RONs

Na Tabela 2 discriminam-se para os exemplares estudados o número de metáfases analisadas, as freqüências de RONs marcadas por célula e de metáfases com RONs associadas. Em nove espécies, *Phyllostomus discolor, P. hastatus, Anoura caudifer, Glossophaga soricina, Chiroderma villosum, Sturnira lilium, Vampyrops lineatus, Desmodus rotundus* e *Diaemus youngi*, há um único par de autossomos com RONs, e em *Carollia perspicillata* a RON localiza-se no cromossomo X. Nas espécies *Artibeus lituratus, A. planirostris* e *Chiroderma doriae* identificam-se três pares de autossomos com RONs.

Na maioria dos possuidores de duas RONs, ambas apresentam-se marcadas em todas as células, indicando terem estado em atividade na intérfase anterior. Porém nos exemplares 49 (*P. discolor*), 65 e 161 (*A. caudifer*), 62 (*G. soricina*), 15, 16 e 121 (*S. lilium*), 52, 53 e 71 (*V. lineatus*) e 63 e 114 (*D. rotundus*) algumas células têm um único cromossomo com RON marcadas enquanto no exemplar 69 (*C. villosum*) há uma única RON marcada em 64% das metáfases. Por outro lado, nos indivíduos 15, 16, 62, 70, 72 e 83 detecta-se ocorrência eventual de marcação pela prata em um número maior de cromossomos, geralmente 3, mas até 4 para o caso 16 e 5 para o caso 15. No espécime 62 (*G. soricina*), 9 metáfases apresentam uma leve marcação na região intersticial do braço de um cromossomo metacêntrico grande e, nos

TABELA 2. Freqüência de metáfases analisadas e com associação de RONs e freqüência de RONs marcadas por metáfase em cada exemplar.

Subfamília	Espécie	Nº do Exemplar	Número de Metáfases		RONs marcadas por metáfase					
			Analisadas	Com cromossomos associados	1	2	3	4	5	6
Phyllostominae	*P. discolor*	48	50	7		50				
	2n = 32	50	50	5		50				
	P. hastatus	49	50	2	5	45				
	2n = 32	51	50	2		50				
		70	50	2		48		1	1	
		101	50	2		50				
		102	50	8		50				
		153	50	2		50				
		154	50	3		50				
Glossophaginae	*A. caudifer*	65	50		3	47				
	2n = 30	106	50	1		50				
		156	50	4		50				
		160	50	3		50				
		161	50	2	2	48				
		167	50	2		50				
		168	50			50				
	G. soricina	62	50	1		40	9			
	2n = 32	91	50	1		50				
		92	50			50				
		93	50	1		50				
		95	50	3		50				
		97	50	4		50				
		141	50	9		50				
Carollinae	*C. perspicillata*	96	50		50					
	2n = 20/21	122	50		50					
		163	50		50					
		164	50			50				
		170	50		50					
		171	50			50				
		186	50			50				
Stenodermatinae	*A. lituratus*	17	50			7	12	21	6	4
	2n = 30/31	28	50			5	17	21	7	
		76	50		1	17	13	18	1	
		77	50	1		3	19	22	5	1
		78	50			10	15	21	3	1
		79	50				7	12	19	12
		108	50			33	8	8	1	
	A. planirostris	40	50		6	11	7	15	5	8
	2n = 30/31	41	50		7	20	8	13	1	1
		61	50		1	5	12	29	3	
		81	50				2	17	17	14
		84	50					1	7	42
		184	50			2	13	29	6	
		185	50			1	13	34	2	
	C. doriae	20	21			5	3	5	7	1
	2n = 26	22	50	5	1	7	11	25	5	5
		67	49		8	18	8	13	1	1
		68	49		8	18	10	9	4	
	C. villosum	44	50	1		50				
	2n = 26	69	43		29	14				
	S. lilium	15	50		3	31	7	6	3	
	2n = 30	16	50		5	39	5	1		
		80	50	4		50				
		82	50	2		50				
		83	50	2		48	2			
		100	50	1		50				
		121	50	1	1	49				
	V. lineatus	52	50	1	2	48				
	2n = 30	53	50	3	3	47				
		54	50			50				
		55	50	1		50				
		56	50			50				
		71	50		1	49				
		72	50	1		49				
Desmodontinae	*D. rotundus*	63	50		3	47				
	2n = 28	114	50		1	49				
		123	50			50				
		125	50			50				
		138	50			50				
		143	50	1		50				
		144	50			50				
	D. youngi	103	50	2		50				
	2n = 32									

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

espécimes 15 e 16 (*S. lilium*),outros cromossomos subtelocêntricos, além do portador usual das RONs, marcam-se pela prata na região distal do braço curto.

Em animais de diferentes espécies como *G. soricina* (141),*C. perspicillata* (122), *V. lineatus* (53, 72) e *D. rotundus* (125, 129) observam-se, em freqüências menores do que 5%, metáfases com um ou dois cromossomos, geralmente metacêntricos bem distentidos, com leve marcação na região centromérica, presumivelmente decorrente da técnica de marcação pela prata.Observa-se em alguns animais de diversas espécies como *A. caudifer* (106, 161), *G. soricina* (95), *S. lilium* (82), *V. lineatus* (71) e *D. rotundus* (143) diferença entre os homólogos na intensidade de marcação das RONs. Tal diferença, porém, não é observada em todas as metáfases, nos casos 106 e 143 aparece em 50% e nos demais, em torno de 8% das metáfases.

As espécies *A. lituratus, A. planirostris* e *C. doriae* apresentam variação na distribuição das freqüências de RONs marcadas por metáfase, com um número modal de 4, mas há exemplares em que esse número é 2 (108, 41, 67, 68), 5 (79, 81) ou 6 (84). A comparação por análise de variância (dados da Tabela 3) mostra que essas espécies diferem significativamente entre si, assim como também diferem entre si os exemplares de cada espécie, isto é, há variabilidade inter e intra-específica quanto à freqüência de RONs ativas por célula.

A associação entre os cromossomos organizadores nucleolares na metáfase é bastante rara nessas espécies de morcegos, alcançando uma maior freqüência nas espécies *P.discolor, P. hastatus* e *G. soricina* com 12%, 6% e 5% de metáfases com RONs associadas, respectivamente, mas em geral ficando em torno de 1%.

TABELA 3. Análise de variância das freqüências médias de cromossomos com RONs marcadas em *Artibeus lituratus*, *A. planirostris* e *Chiroderma doriae* e nos exemplares de cada espécie. gl = graus de liberdade; *P < 0,05.

Fonte de Variação	gl	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Espécie (entre)	2	92,66	46,33	48,88*
Exemplar (dentro)	16	552,37	34,52	36,42*
Resíduo	850	805,66	0,95	
TOTAL	868	1.450,69		

III.3. Freqüência de nucléolos interfásicos

O número de nucléolos marcados por núcleo interfásico varia entre um e dois nas espécies com um par de RONs, exceto em *Chiroderma villosum* na qual são encontrados alguns núcleos com três nucléolos, um e cinco em *Chiroderma doriae* e um e seis em *Artibeus lituratus* e *Artibeus planirostris*, conforme dados da Tabela 4. Essas freqüências foram comparadas com as de RONs marcadas por metáfase, para cada um dos exemplares analisados (valores de qui-quadrado na Tabela 5), tendo-se rejeitado a hipótese de igualdade para praticamente todos os exemplares. Conclui-se, portanto, que na intérfase ocorre fusão de nucléolos em taxa elevada.

Os nucléolos foram classificados em ligados ou não à membrana nuclear, conforme ilustrado na Figura 26. As freqüências de núcleos com nucléolos de cada uma dessas classes, para cada espécie, são apresentados na Tabela 6 e, para facilitar a comparação entre as espécies, apresenta-se a Figura 27, com as proporções de núcleos de cada tipo. Algumas espécies, como *A. lituratus* e *D. youngi*, têm maior proporção de núcleos com nucléolos ligados à membrana; várias outras, como *P. hastatus*, *A. caudifer* e *A. planirostris* têm cerca de 50% dos núcleos com nucléolos ligados à membrana, mas a maior parte (*P. discolor*, *G. soricina*, *C. perspicillata*, *C. doriae*, *C. villosum*, *S.lilium*, *V. lineatus* e *D. rotundus*) apresenta mais de 60% dos núcleos sem nucléolos aparentemente ligados à membrana.

TABELA 4. Freqüência de nucléolos corados pela prata por núcleo interfásico.

Subfamília	Espécie	Exemplar	Nº de núcleos analisados	Nº de nucléolos corados por núcleo					
				1	2	3	4	5	6
Phyllostominae	*P. discolor*	48	150	104	46				
		50	150	103	47				
	P. hastatus	49	150	129	21				
		51	150	130	20				
		70	150	114	36				
		101	150	100	50				
		102	150	127	23				
		153	150	122	28				
		154	150	113	37				
Glossophaginae	*A. caudifer*	65	150	103	47				
		106	150	130	20				
		156	150	114	36				
		160	150	92	58				
		161	150	102	48				
		167	150	114	36				
		168	150	93	57				
	G. soricina	62	150	120	30				
		91	150	113	37				
		92	150	121	29				
		93	150	116	34				
		95	150	107	43				
		97	150	121	29				
		141	150	115	35				
Carolliinae	*C. perspicillata*	96	150	150					
		122	150	150					
		163	150	150					
		164	150	62	88				
		170	150	150					
		171	150	67	83				
		186	150	62	88				
Stenodermatinae	*A. lituratus*	17	150	26	46	42	28	6	2
		28	99	37	26	25	7	4	
		76	150	8	31	70	33	8	
		77	150	5	38	76	30	1	
		78	150	20	27	67	36		
		79	150	8	8	19	56	42	17
		108	150	41	64	34	11		
	A. planirostris	40	140	13	20	59	36	10	2
		41	150	88	33	26	3		
		61	150	33	46	42	28	1	
		81	150	35	29	35	35	14	2
		84	150	57	45	28	11	5	4
		184	150	31	61	39	18	1	
		185	150	43	47	37	23		
	C. doriae	20	68	35	18	10	5		
		22	150	64	50	29	6	1	
		67	150	77	40	26	5	2	
		68	150	72	44	29	5		
	C. villosum	44	150	89	58	3			
		69	68	48	18	2			
	S. lilium	15	150	41	109				
		16	125	38	87				
		80	150	100	50				
		82	150	107	43				
		83	150	86	64				
		100	150	91	59				
		121	150	105	45				
	V. limatum	52	150	74	76				
		53	150	81	69				
		54	150	34	116				
		55	150	51	99				
		56	150	30	120				
		71	150	34	116				
		72	150	54	96				
Desmodontinae	*D. rotundus*	63	150	89	61				
		114	150	96	54				
		123	150	86	64				
		125	150	114	36				
		138	150	103	47				
		143	150	118	32				
		144	150	92	58				
	D. youngi	103	150	92	58				

TABELA 5. Valores de qui-quadrado para comparação das distribuições das freqüências de RONs marcadas por metáfase e de nucléolos marcados por núcleo interfásico; NS: P > 0,05; *P < 0,05.

Subfamília	Espécie	Exemplar	X^2	
Phyllostominae	*P. discolor*	48	72,23	*
		50	72,21	*
	P. hastatus	49	97,41	*
		51	128,84	*
		70	88,57	*
		101	66,66	*
		102	129,07	*
		153	106,75	*
		154	84,92	*
Glossophaginae	*A. caudifer*	65	99,34	*
		106	89,65	*
		156	90,10	*
		160	56,89	*
		161	61,53	*
		167	97,45	*
		168	56,86	*
	G. soricina	62	154,81	*
		91	84,92	*
		92	100,14	*
		93	92,03	*
		95	72,21	*
		97	100,14	*
		141	92,97	*
	C. perspicillata (fêmeas)	164	29,78	*
		171	32,67	*
		186	29,78	*
Stenodermatinae	*A. lituratus*	17	35,31	*
		28	49,20	*
		76	16,59	*
		77	30,32	*
		78	19,46	*
		79	11,33	NS
		108	30,24	*
	A. planirostris	40	40,49	*
		41	52,11	*
		61	40,51	*
		81	70,85	*
		84	166,15	*
		184	70,74	*
		185	68,19	*
	C. doriae	20	35,50	*
		22	96,96	*
		67	40,23	*
		68	37,66	*
	C. villosum	44	56,84	*
		69	0,05	NS
	S. lilium	15	103,80	*
		16	29,13	*
		80	66,66	*
		82	78,21	*
		83	50,70	*
		100	56,82	*
		121	70,75	*
	V. lineatus	52	31,05	*
		53	37,67	*
		54	13,08	*
		55	23,53	*
		56	11,15	*
		71	13,36	*
		72	24,34	*
Desmodontinae	*D. rotundus*	63	61,44	*
		114	62,34	*
		123	50,70	*
		125	90,11	*
		138	135,16	*
		143	97,97	*
		144	56,79	*
	D. youngi	103	56,79	*

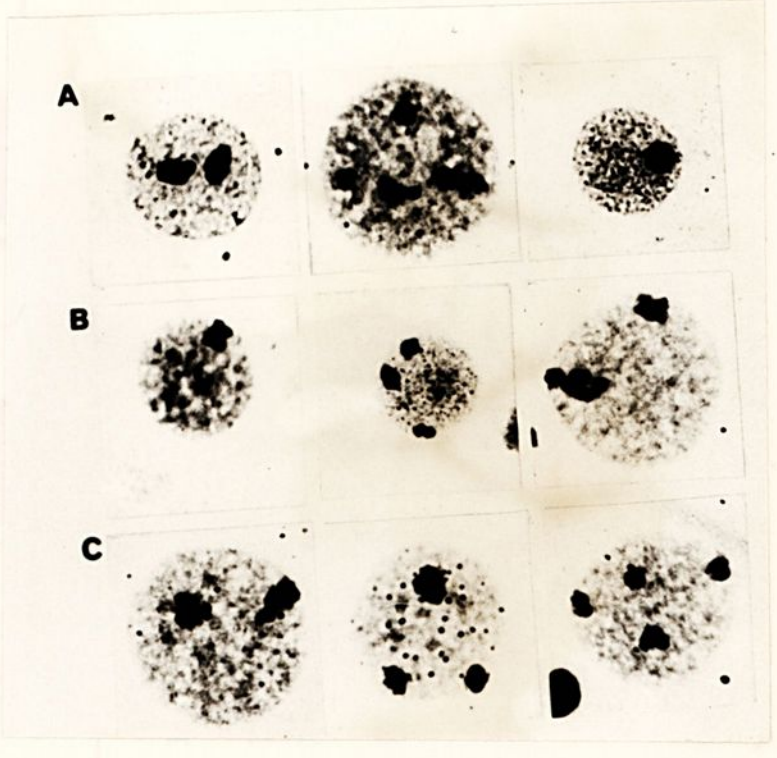


FIGURA 26. Tipos de núcleos. A: com nucléolos não ligados à membrana nuclear; B: nucléolos ligados à membrana nuclear e C: nucleólos ligados e não ligados à membrana nuclear.

TABELA 6. Freqüências de núcleos para cada uma das classes consideradas.

Subfamília	Espécie	Nº núcleos analisados	Posição dos nucléolos em relação à membrana nuclear					
			todos ligados à membrana		ligados e não ligados à membrana		nenhum ligado à membrana	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%
Phyllostaminae	*P. discolor*	300	29	9,7	31	10,3	240	80,0
	P. hastatus	1050	388	37,0	97	9,2	565	53,8
Glossophaginae	*A. caudifer*	1050	363	34,6	115	10,9	572	54,5
	G. soricina	1050	159	15,1	88	8,4	803	76,5
Carolliinae	*C.perspicillata*	1050	330	31,4	85	8,1	635	60,5
Stenodermatinae	*A. lituratus*	999	38	3,8	616	61,7	345	34,5
	A. planirostris	1040	46	4,4	473	45,5	521	50,1
	C. doriae	518	17	3,3	137	26,4	364	70,3
	C. villosum	218	19	8,7	28	12,8	171	78,5
	S. lilium	1025	63	6,2	112	10,9	850	82,9
	V. lineatus	1050	106	10,1	191	18,2	753	71,7
Desmodontinae	*D. rotundus*	1050	165	15,7	108	10,3	777	74,0
	D. youngi	150	92	61,3	2	1,3	56	37,4

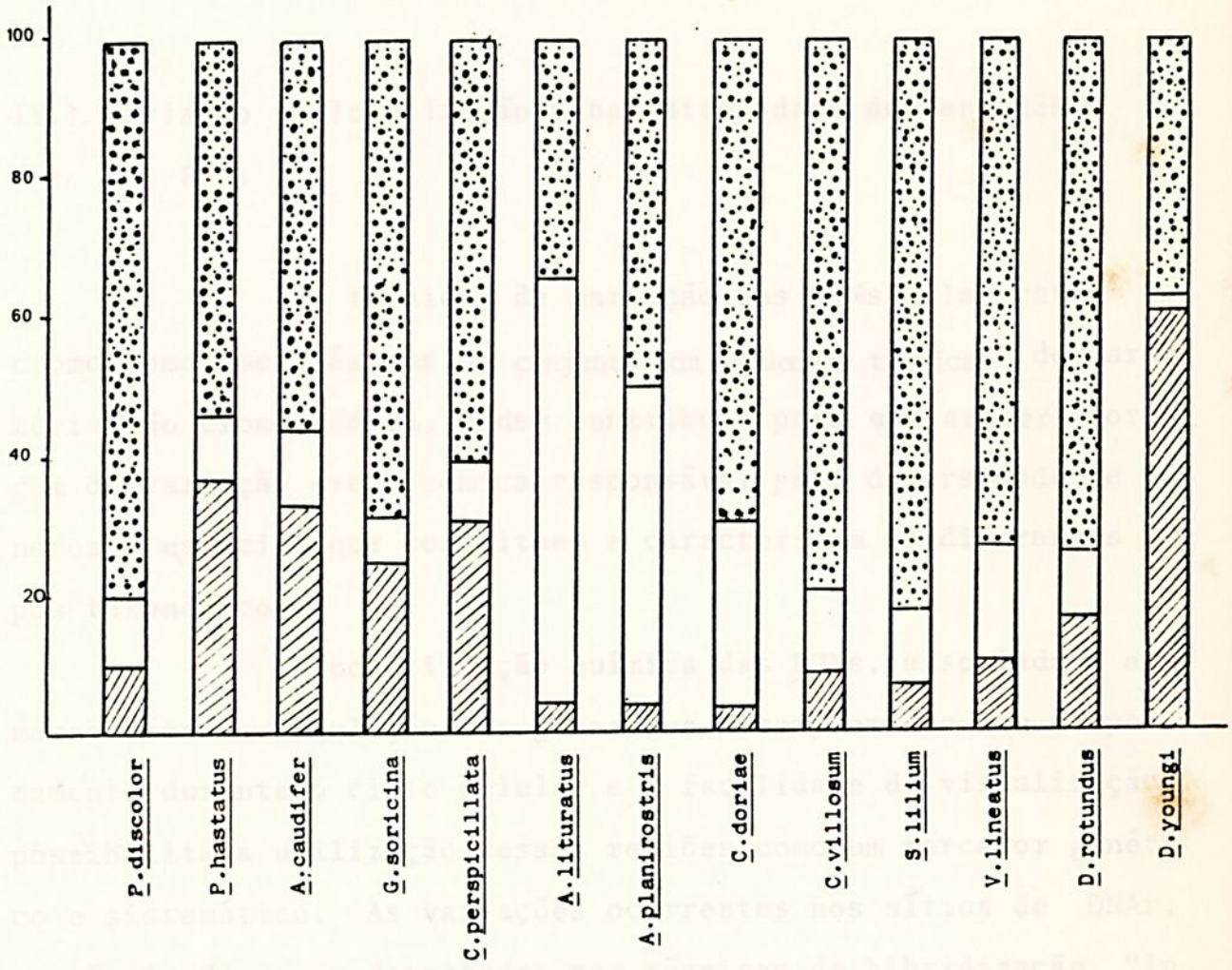


FIGURA 27. Proporção de núcleos com todos nucléolos ligados à membrana nuclear (▨), com nucléolos ligados e não ligados à membrana nuclear (▭) e sem nucléolos ligados à membrana nuclear (⁘).

IV. DISCUSSÃO

IV.1. Variação na localização e na intensidade de marcação das RONs

As técnicas de marcação das RONs pela prata em cromossomos metafásicos, em conjunto com as demais técnicas de caracterização cromossômica, podem contribuir para esclarecer a origem da variação cromossômica responsável pela diversidade de gêneros e espécies que constituem e caracterizam os diferentes grupos taxonômicos.

A constituição química das RONs, associada aos mecanismos de regulação dos genes que a compõem, ao seu comportamento durante o ciclo celular e a facilidade de visualização, possibilita a utilização dessas regiões como um marcador genético e sistemático. As variações ocorrentes nos sítios de DNAr, passíveis de serem detectadas por técnicas de hibridização "in situ" ou técnicas específicas de coloração, são responsáveis pelos grandes heteromorfismos que caracterizam as regiões organizadoras de nucléolos nos diversos grupos de vertebrados. Esse heteromorfismo, manifestado em diferentes categorias como no número e na localização das RONs presentes ou ativas, no tamanho relativo das RONs e no número e morfologia dos nucléolos, é responsável pela grande variabilidade das RONs, cuja ocorrência e detecção possibilita a diferenciação de espécies, linhagens, indivíduos de mesma linhagem e células de um mesmo indivíduo.

Em onze das treze espécies estudadas no presente tra

balho pode ser constatado que as RONs localizam-se em regiões de constrição secundária, e em duas, *Chiroderma doriae* e *C. villosum* tal definição não foi possível. A localização das RONs em constrições secundárias parece predominar no cariótipo de vertebrados (para exemplos: SOUZA & YONENAGA-YASSUDA, 1982, 1984; AKINORI & OJIMA, 1982; KRISHNA e col., 1983; PHILLIPS & IHSSEN, 1985; BICKHAM & ROGERS, 1985; KASAHARA e col., 1987, entre outros), mas essas também tem sido referidas sem relação aparente com constrições secundárias em peixes (BIRNSTEIN & VASILIEV, 1987), roedores (WINKING e col., 1980; SOUZA, 1981; PATHAK e col.,1982; YONENAGA-YASSUDA e col., 1987a, b; MAIA & LANGGUTH, 1987, para exemplos) e, inclusive, em morcegos da família Mormoopidae (SITES e col., 1981).

Nos exemplos ora estudados não se observa variação intra-específica na localização ou no número de RONs, mesmo nos animais procedentes de localidades diferentes o que pode ser considerado para todas as espécies, com exceção de *P. discolor* e *D. youngi*, cujos espécimes foram coletados em um único local. Tais variações tem se mostrado raras em mamíferos, todavia foram detectadas em outros animais, como peixes (FORESTI e col., 1981; GOLD, 1984; ALMEIDA-TOLEDO & FORESTI, 1985). Nesses casos, o heteromorfismo é atribuído possivelmente a rearranjos cromossômicos, como inversões (GOLD, 1984; ALMEIDA-TOLEDO & FORESTI, 1985), ou a cariótipos híbridos entre duas raças cromossômicas (FORESTI e col., 1981).

Algumas das espécies aqui analisadas já tinham o número e a localização das regiões organizadoras de nucléolos determinados por outros autores: *Artibeus lituratus* (KASAHARA & DUTRILLAUX, 1983; SOUZA & CORREA, 1984), *Phyllostomus discolor, P. hastatus, Glos*

sophaga soricina, Sturnira lilium, Vampyrops lineatus e *Desmodus rotundus* (SOUZA, 1985) e *Carollia perspicillata* (GOODPASTURE & BLOOM, 1975). Em relação a todas, os resultados quanto ao número e localização das RONs são idênticos, com exceção de *Glossophaga soricina*, cuja localização das RONs, identificada por SOUZA (1985) em três espécimes coletados no estado de Pernambuco, não coincidiu com a dos coletados na região noroeste do estado de São Paulo. Enquanto naqueles espécimes elas se dispõem em um par de cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos de tamanho médio, nos exemplares ora analisados elas aparecem na região da constrição secundária no menor par de autossomos, o que sugere a ocorrência de heteromorfismos de posição na espécie. Além disso, a disposição das RONs em região de constrição secundária só foi referida por GOODPASTURE & BLOOM (1975) para *C. perspicillata*, por KASAHARA & DUTRILLAUX (1983) para *A. lituratus* e por SOUZA (1985) para *D. rotundus*.

Em relação à marcação pela prata de outros locais, além dos usualmente marcados, nos espécimes 70,72 e 83, poderia tratar-se de artefato de técnica, pois somente uma ou duas células apresentam a marcação extra. No entanto, tal explicação não se aplica aos casos 15, 16 e 62, em que várias metáfases apresentam de 3 a 5 cromossomos marcados, e neles as RONs extras geralmente localizam-se nos mesmos sítios cromossômicos.

A ocorrência eventual de RONs extras, já descrita na espécie *Artibeus lituratus* por KASAHARA & DUTRILLAUX (1983), que também encontraram uma variabilidade no número de RONs ativas por metáfase, foi citada em anfíbios (BIRSTEIN, 1984) e em roedores (WINKING e col., 1980). Todavia, em nenhum desses estudos a natureza dessas regiões foi investigada, de modo

que não se sabe se elas contêm DNAr extra ou se resultam de rearranjos cromossômicos.

Diversos autores têm referido a marcação preferencial pela prata das regiões centroméricas de todos os cromossomos (HOWELL & DENTON, 1974; DENTON e col., 1977; BUYS & OSINGA, 1980; RUIZ e col., 1981; NANYA, 1986) e ao longo das cromátides de alguns cromossomos (BUYS & OSINGA, 1984). Em algumas das células ora analisadas verifica-se leve marcação centromérica, porém não em todos os cromossomos. Segundo BUYS & OSINGA (1984), o mecanismo de marcação pela prata das regiões centroméricas deve ser semelhante ao mecanismo de marcação das RONs, dada a similaridade na constituição protêica dessas duas regiões.

A variabilidade das RONs também pôde ser verificada quanto ao número de RONs ativas e sua intensidade de marcação. Em humanos está bem documentada a variabilidade do número de RONs ativas entre os diferentes indivíduos e entre células de mesmo indivíduo. De forma similar, o número modal de RONs coradas por célula e as freqüências de marcação de cada cromossomo podem variar de um indivíduo para outro (referências na INTRODUÇÃO). A utilização de bandamento sequencial após a coloração pela prata tem mostrado que em uma dada população celular cada cromossomo portador da RON pode ser marcado em diferentes freqüências (FERRARO e col., 1981, para referências).

As espécies *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus* e *Chiroderma doriae*, que possuem três pares de RONs, e um exemplar de *Chiroderma villosum* (69) manifestam ampla variabilidade interespecífica, inter e intra-individual no número de cromossomos com RONs ativas. Fenômeno semelhante já foi verifi

cado em outros animais, como peixes (GOLD, 1984), roedores (SOUZA, 1981; KASAHARA & YONENAGA-YASSUDA, 1983; SASAKI e col.,1986) e ovelhas (HENDERSON & BRUÈRE, 1980) e parece não ocorrer por acaso, pois nestes últimos, a semelhança do que ocorre nas células humanas, a atividade de cada RON é hereditária e, portanto, característica de um cromossomo particular. Por outro lado, YONENAGA-YASSUDA e col. (1983) sugeriram que em roedores a variabilidade intra-individual das RONs é limitada, de modo que a atividade de uma RON particular não se expressa em todas as células de um indivíduo e está positivamente correlacionada com a de seu homólogo.

Isto pode estar ocorrendo nas espécies de morcegos possuidoras de duas RONs, nas quais ambas muito frequentemente estão ativas. Cabe ressaltar, todavia, que em *C. perspicillata* as RONs localizam-se no cromossomo X e sempre aparecem marcadas nas fêmeas ao invés de manifestarem mecanismos de compensação de dose, responsáveis pela equivalência de atividade entre machos e fêmeas. Este é um fenômeno interessante que merece estudo mais detalhado.

Nos indivíduos em que os cromossomos portadores das RONs apresentam variação na intensidade de marcação, ou seja, no seu tamanho, em alguns casos uma alcançando até duas vezes o tamanho da de seu homólogo, não se detecta variação no tamanho das constrições secundárias entre os homólogos. Contudo, esses achados não podem ser associados com a quantidade de DNAr, à semelhança do que já foi encontrado em humanos por WARBURTON & HENDERSON (1979), pois diferenças entre homólogos no tamanho das RONs são frequentemente encontradas nos cariótipos de vertebra-

dos, como peixes (FORESTI e col., 1981; MOREIRA-FILHO e col., 1984), anfíbios (RUIZ e col., 1981; SCHMID, 1982) e mamíferos, principalmente em humanos (GOODPASTURE & BLOOM, 1975; MILLER e col., 1977; VARLEY, 1977) e têm sido atribuídas a ativação diferencial dos genes ribossômicos. Segundo JOTTERAND-BELLOMO & VAN MELLE (1981b) o padrão de marcação dos homólogos é o mesmo em cada célula, o que pode ser verificado se eles forem polimórficos.

Neste trabalho só foram analisadas células de medula óssea. No entanto, em humanos há autores que referem certa especificidade tissular no número de RONs marcadas por metáfase. DE CAPOA e col. (1985) encontraram maior número de RONs marcadas em fibroblastos que em leucócitos e REEVES e col.(1980, cf. SCHWARZACHER & WACHTLER, 1983) encontraram uma média menor e uma variabilidade maior em medula óssea, que em linfócitos. Tais resultados podem ser devidos ao fato de que as células de medula óssea constituem uma população com alguns tipos celulares diferenciados, as quais poderiam diferir em suas taxas de produção de RNAr.

IV.2. Variação no número e posição dos nucléolos

Os nucléolos são organizados no final da telófase, assim que tem início a síntese de RNAr pelos cromossomos portadores das RONs. Os produtos da atividade dos genes ribossômicos, associados às proteínas envolvidas na síntese e processa-

mento do RNAr, acumulam-se em torno dos filamentos descondensados de DNAr constituindo, dessa forma, os nucléolos. Algumas das proteínas envolvidas na síntese de RNAr reagem especificamente com a prata, possibilitando assim a visualização dos nucléolos nos núcleos interfásicos. A partir do momento em que cessa a atividade dos genes ribossômicos, o material acumulado ao redor das RONs é gradualmente removido para o citoplasma, de forma que somente pequenas quantidades permanecem ligadas às RONs. Esse material remanescente, quando corado pela prata, possibilita a identificação na metáfase da localização e do número de RONs que estiveram ativas na intérfase precedente (HOWELL, 1977 ; WARNER, 1979; FERNANDEZ-GOMES e col., 1982).

O número de RONs em cada célula determina o seu número máximo de nucléolos, pois cada cromossomo portador de RON é potencialmente apto para formar um nucléolo na intérfase, de tal forma que o número de cromossomos metafásicos marcados pela prata pode refletir o número de nucléolos interfásicos. Nas espécies analisadas, portadoras de duas RONs no cariótipo, são encontrados núcleos com um ou dois nucléolos, o primeiro tipo mais frequentemente em todos os casos. A comparação entre o número de cromossomos com RONs marcadas e o número de nucléolos por núcleo interfásico indica a ocorrência usual de fusão das RONs ativas na formação de um único nucléolo.

No entanto, em *Chiroderma villosum* encontram-se núcleos com três nucléolos claramente individualizados. Essa situação pode ser devida à subdivisão de um nucléolo lobulado por um artefato técnico, ou à tetraploidia, eventualmente observada em algumas espécies de peixes, nas quais o mecanismo parece tomar parte na evolução do grupo (BIRSTEIN & VASILIEV, 1987, para

exemplo), e também em morcegos, nesse caso quando o tempo de exposição ao bloqueador mitótico (colquicina) ultrapassa 50 minutos.

Nas espécies com seis RONs, o número de nucléolos varia nos diversos núcleos analisados, e só em *Artibeus planirostris* (40, 81 e 84) e *Artibeus lituratus* (17 e 79) observam se núcleos com 6 nucléolos. Em todos os casos porém, a fusão de RONs é frequente. A tendência à fusão das RONs em células metabolicamente ativas é destacada na literatura (POPP & WACHTLER, 1983) e variabilidade quanto ao número de nucléolos por núcleo interfásico também foi encontrada em outros animais, como *Drosophila* (NANYA, 1986) e peixes (PHILLIPS & IHSSEN, 1985). Convém ressaltar que o tamanho dos nucléolos de cada célula correlacionam se inversamente com o seu número, ou seja, quanto maior o número de nucléolos menor o volume de cada um deles e vice-versa, dessa forma reforçando a ocorrência da fusão nucleolar.

Os cromossomos envolvidos na organização dos nucléolos durante a intérfase podem permanecer associados na metáfase e, portanto, funcionarem como evidência da fusão nucleolar. GANI (1978) atribui a persistência da fusão das RONs até à metáfase às cadeias de ribonucleoproteínas que ficam na superfície de cada nucléolo, mais do que a fusão dos próprios nucléolos. Apesar da alta incidência da fusão de nucléolos, quando se observa a freqüência de metáfases com RONs associadas verifica-se que ela é extremamente baixa, nem sendo observada em um grande número de exemplares. Há indicações de que as associações de satélites são menos frequentes após intérfases curtas (SIGMUND e col., 1979), o que poderia ser aplicado a esse

material por se tratar de medula óssea, ficando evidente que o processo de desorganização da fusão dos nucléolos, de modo geral, se completa antes da metáfase seguinte.

A localização das RONs em posição distal ou intersticial nos braços cromossômicos não parece interferir na freqüência com que elas se associam nos cromossômicos metafásicos o que pode ser concluido tanto pela baixa freqüência de cromossomos associados em *Artibeus, Chiroderma, Vampyrops* e *Desmodus,* como pela alta freqüência em *Glossophaga Anoura.* Em relação à *Glossophaga,* no entanto, não se pode deixar de ressaltar que como os braços cromossômicos distais às RONs são inteiramente heterocromáticos e os cromossomos com grandes blocos heterocromáticos tendem a ficar próximos, pela afinidade não específica da heterocromatina constitutiva conforme já citado na INTRODUÇÃO, isso pode também estar contribuindo para a alta freqüência de manutenção da associação de suas RONs.

Em células somáticas já está bem caracterizada a existência de um esqueleto nuclear que pode ser isolado sob condições especiais (HUBERT & BOURGEOIS, 1986). Esse esqueleto compõe-se de um complexo poro-lâmina, que é a sua porção externa, uma matriz fibrosa e um resíduo nucleolar denso. A análise do resíduo nucleolar revelou a existência de um outro esqueleto nucleolar protéico, que aparece aderido à lâmina. HUBERT e col. (1984), analisando o núcleo de hepatócitos de rato, mostraram que os nucléolos estão aderidos à membrana nuclear por um pedículo e que a remoção da cromatina interna ao núcleo os deixam aderidos à membrana. Este pedículo é parte do esqueleto nucleolar.

BUREAU e col. (1986) verificaram que a molécula

de DNA dos cromossomos organizadores nucleolares está ligada à esse esqueleto nucleolar em diversos sítios, fixando-se nestes tanto o DNAr ativo como o inativo. Portanto, é esse curto pedículo protéico ligado à lâmina periférica nuclear, que por sua vez possue sítios de ligação com o DNAr, que justifica a localização dos nucléolos próximos à membrana nuclear nas células somáticas, de acordo com HUBERT & BOURGEOIS (1986).

No material ora analisado, a ligação dos nucléolos com a membrana nuclear é frequentemente observada nas espécies *P. hastatus, A. caudifer, A. lituratus, A. planirostris* e *D. youngi,* e não é tão evidente nas demais, podendo ter ocorrido falhas na avaliação pelos limites técnicos.

IV.3. Variação cromossômica nas subfamílias, com ênfase para as RONs

IV.3.1. Subfamília Phyllostominae

O cariótipo usual encontrado para *Phyllostomus discolor* é semelhante ao descrito na literatura (BAKER, 1967, 1979; CAPANNA & CIVITELLI, 1970; TOLEDO, 1973; LOPES, 1978), assim como o de *P. hastatus* (YONENAGA e col., 1969; TOLEDO, 1973; LOPES, 1978; BAKER, 1979).

Os padrões de bandas G e C de *P. hastatus* são muito semelhantes aos descritos por PATTON & BAKER (1978), sendo a banda C somente centromérica. Esses autores referem padrões de bandas similares para *P. discolor*, o que também é con

firmado por LOPES (1978) em relação às bandas C. A única diferença entre essas espécies é o par 15, que é metacêntrico em *P. discolor* e acrocêntrico em *P. hastatus*, devido a uma inversão pericêntrica que, todavia, não incluiu as RONs, pois essas são distais em ambas as espécies.

A determinação dos padrões de bandas G e C em dez espécies de Phyllostominae: *Macrotus waterhousii*, *Micronycteris nicefori*, *M. brachyotis*, *M. minuta*, *M. megalogis*, *Tonatia minuta*, *T. bidens*, *Mimon crenulatum*, *Phyllostomus discolor* e *P. hastatus*, possibilitou a PATTON & BAKER (1978) verificarem que alguns gêneros como *Macrotus*, *Mimon* e *Phyllostomus*, tiveram uma taxa de evolução cromossômica mais conservativa, enquanto os demais mostraram maior divergência cromossômica. Entre os rearranjos eucromáticos observados incluiam-se as mudanças robertsonianas, com predomínio quase que exclusivo das fusões, das translocações recíprocas e terminais (em tandem) e das inversões pericêntricas, todas combinadas de modo a reduzirem os grupos de ligação e reterem os padrões de bandas e os números de braços cromossômicos do cariótipo ancestral. A quantidade e a posição da heterocromatina constitutiva, cujas alterações provavelmente causam um grau mais baixo de problemas meióticos no heterozigoto, não parecem ter contribuído substancialmente para os rearranjos observados entre os gêneros.

O cariótipo de *Macrotus waterhousii*, um Phyllostominae que apresenta 2n = 46 e NF = 60, foi proposto por PATTON & BAKER (1978) como o mais primitivo para a família Phyllostomidae. Todos os seus cromossomos podem ser identificados nos cariótipos de *P. discolor* e *P. hastatus*, que provavelmente deriva

ram de *M. waterhousii* por sete fusões (cromossomos 1, 2, 3, 5, 6, 12 e 15) e uma inversão pericêntrica (cromossomo 7). O cromossomo 15 metacêntrico de *P. discolor* parece originado da fusão de dois acrocêntricos de *M. waterhousii* e está presente também na espécie *Mimon crenulatum*, um Phyllostominae com 2n = 32 e NF = 60. A ocorrência subsequente de uma inversão pericêntrica provavelmente deu origem ao acrocêntrico de *P. hastatus*. Todavia, considerando-se que *P. hastatus* é um animal generalista e onívoro, enquanto *P. discolor* é mais especializado, com hábito alimentar frugívoro e nectarívoro (TADDEI, 1973, para referências), do ponto de vista ecológico ficaria mais simples explicar a evolução em sentido inverso.

Desta subfamília só se tem informações sobre a localização das RONs nas duas espécies ora analisadas e o único rearranjo identificado entre elas ocorreu no cromossomo portador das RONs, em região contígua a elas.

IV. 3.2. Subfamília Glossophaginae

O cariótipo usual de *Anoura caudifer* assemelha-se ao descrito por TOLEDO (1973) em espécimes coletados nas cidades de Botucatu e São Manoel (SP), no entanto esse autor não cita a constrição secundária do menor par de autossomos. O padrão de bandas G é semelhante ao apresentado por HAIDUK & BAKER (1982) e a banda C, não referida na literatura, restringe-se às regiões centroméricas e varia na intensidade de marcação entre os diferentes cromossomos. As RONs ficam na região distal do braço curto do menor par de autossomos (nº 14), onde

YONENAGA (1968) refere haver satélites, como o observado nesse material.

Glossophaga soricina, o outro representante dessa subfamília analisado, tem cariótipo usual similar ao encontrado na literatura. Embora nas figuras das publicações seja observada uma constrição secundária na região proximal do braço longo em um pequeno par de autossomos, o número 15 em BAKER (1967) e número 14 em TOLEDO (1973), tais autores não a destacam. As RONs localizam-se nessa região, do par que é considerado como o número 15 no presente trabalho.

O padrão de bandas G de *Glossophaga soricina* é similar ao apresentado em BAKER & BASS (1979) e o padrão de bandas C ao referido por BAKER & BASS (1979), excetuando-se a banda da porção distal do cromossomo 15, que esses autores não descrevem.

A evolução cariotípica na subfamília Glossophaginae é difícil de interpretar. As propostas de relações evolutivas têm sido altamente contestadas devido à falta de congruência entre os dados (HAIDUK & BAKER, 1982). Baseado no cariótipo usual, BAKER (1967) propôs uma origem difilética para a subfamília Glossophaginae. Um dos grupos caracterizado por 2n próximo a 32 e NF próximo a 60, estaria intimamente relacionado aos Phyllostominae, e outro grupo, com valores de 2n e NF baixos, estaria mais intimamente relacionado aos Carolliinae que às outras espécies de Glossophaginae. STOCK (1975), entretanto, não encontrou homologia no padrão de bandas entre *Choeroniscus*, um Glossophaginae desse último grupo, e *Carollia*, de modo que a origem difilética proposta por BAKER (1967) tornou-se pouco provável.

Posteriormente, BAKER & BASS (1979), comparando

o cariótipo de *Macrotus waterhousii* proposto como o mais primitivo para a família Phyllostomidae com os cariótipos de algumas espécies de Glossophaginae (*G. soricina* e *Monophyllus redmani*) e Brachyphyllinae (*Phyllonycteris aphylla, Erophylla sesekorni Brachyphylla nana*). verificaram que todos eram semelhantes e os braços cromossômicos de *Macrotus* podiam ser identificados no cariótipo das demais espécies e que o cariótipo de *G. soricina* diferia do de *Macrotus* por treze rearranjos (5 inversões pericêntricas, uma fissão e sete fusões cêntricas). Esses achados levaram os autores a prǫporem o cariótipo de *G. soricina* como o mais primitivo dos Glossophaginae.

O padrão de bandas G de *Anoura caudifer* não parece ter qualquer homologia com *Macrotus* e *Glossophaga*, assim como o das espécies *Lonchophylla tomasi* e *Lionycteris spurrelli* (HAIDUK & BAKER, 1982). Todavia, *Choeroniscus*, gênero que BAKER (1967) relacionou aos Carolliinae, partilha alguns braços cromossômicos com *Macrotus*, fornecendo suporte para a origem monofilética da subfamília (HAIDUK & BAKER, 1982). Esses dados mostram que a evolução cromossômica nos Glossophaginae têm procedido em taxas altamente diferenciadas. Alguns gêneros, como *Glossophaga, Monophyllus* e *Leptonycteris*, praticamente não são diferenciados por rearranjos cromossômicos mas em outros, como *Lonchophylla, Anoura* e *Lyonycteris*, a diversidade requer um mínimo de trinta rearranjos individuais para diferenciá-los em relação aos demais, cujos cariótipos assemelham-se ao primitivo.

A identificação dos braços cromossômicos de *Macrotus* em *Glossophaga soricina* (BAKER & BASS, 1979) e *Phyllostomus hastatus* (PATTON & BAKER, 1978) permite a comparação dos cariótipos dessas duas espécies, que mostra extensa homologia

de bandas. Verifica-se que quatro pares cromossômicos (1, 7, 8 e 14 nas Figuras 4.A e 8.A) são homólogos nas duas espécies. Os pares 10 e 11 de *P. hastatus* parecem corresponder, respectivamente, ao 11 e ao 10 de *G. soricina*. Os demais pares apresentam alguns braços homólogos, como por exemplo, os braços longos dos pares 2, 5 e 6. As diferenças entre as duas espécies residem na combinação diferencial dos cromossomos primitivos e em possíveis rearranjos envolvendo os braços cromossômicos de *Macrotus*, de forma que o cariótipo de *P. hastatus* parece diferir do de *G. soricina* por dezenove rearranjos: sete fissões, seis fusões e seis inversões pericêntricas.

Essa similaridade entre *G. soricina* e *P. hastatus*, da subfamília Phyllostominae, que é considerada em termos de dentição a mais primitiva dos Phyllostomidae (SMITH, 1976), vem constituir-se em mais um ponto a favor da proposta levantada por BAKER & BASS (1979), de que o cariótipo de *G. soricina* represente o mais primitivo para a subfamília.

O braço cromossômico nº 30 de *Macrotus* (numeração conforme PATTON & BAKER, 1978 e BAKER & BASS, 1979), que aparece na constituição do cromossomo 15 de *P. hastatus*, o portador da RON, não foi identificado no complemento de *G. soricina*. O cromossomo 15 de *G. soricina*, que é o portador da RON, constitui-se pelo braço cromossômico de nº 29 de *Macrotus* que em *P. hastatus* está presente constituindo o braço curto do cromossomo 12. Isso indica a ocorrência de alterações na localização do DNAr na evolução dessas duas espécies.

Em relação a *Anoura caudifer*, fica difícil identificar as alterações relativas às RONs. Assim como em *G. soricina*, nela as RONs estão em regiões de constrição secundária no

menor par autossômico, porém no braço curto na primeira espécie e no braço longo da segunda espécie, o que exige a ocorrência de, no mínimo, uma inversão pericêntrica alterando a posição das RONs entre as duas espécies.

IV.3.3. Subfamília Carolliinae

A subfamília Carolliinae constitui-se de apenas dois gêneros, *Carollia* e *Rhinophylla*, sendo as espécies do primeiro mais estudadas. O cariótipo de *C. perspicillata* apresentado nesse trabalho é idêntico ao descrito por BAKER (1967) e por outros autores, como YONENAGA e col. (1969), TOLEDO (1973)e LOPES (1978). O padrão de bandas G coincide com os já descritos por PATHAK e col. (1973b) e STOCK (1975), os quais referiram que o sistema de determinação sexual do tipo XX/XY_1Y_2 deriva de uma translocação entre o cromossomo X original, um pequeno metacêntrico, e a extremidade centromérica de um autossomo provavelmente telocêntrico.

Essa mesma translocação foi encontrada em *C. brevicauda* e *C. subrufa* por PATTON & GARDNER (1971), mas em *C. castanea* verificou-se que espécimes da América Central e Colômbia apresentavam a translocação X-autossomo e espécimes do Peru não a apresentavam (BAKER & BLEIR, 1971). A ausência da translocação X-autossomo em populações de *C. castanea* foi proposta por PATTON & GARDNER (1971) como a condição primitiva. PINE (1972, cf. em BAKER, 1979), em um estudo baseado em características morfológicas, concluiu que *C. brevicauda*, *C. subrufa* e *C. perspicillata* relacionam-se mais entre si que a espécie *C. castanea*, o que foi evidenciado também por STOCK (1975), ao comparar os padrões de bandas G e C das espécies *C. brevicauda*, *C. pers*

picillata e *C. castanea*.

BAKER (1979) associando os achados dos estudos morfológicos e citogenéticos considerou que a proposição de PATTON & GARDNER (1971) provavelmente estava correta; entretanto, apoiado na limitação dos dados disponíveis, argumenta não ser possível a exclusão da explicação alternativa de que a ausência do cromossomo com a translocação seja derivada de fissão de um único elemento ancestral.

HSU e col.(1975b), por hibridização *in situ*, identificaram as RONs em *C. perspicillata* na constrição secundária do cromossomo X, local da junção X-autossomo, e em *C. castanea*, na extremidade telomérica do braço longo do X não translocado. Dos dados disponíveis de literatura quanto à localização das RONs em quirópteros, somente essas duas espécies possuem as RONs localizadas no cromossomo X. Esses dados sugerem a ocorrência de mudanças na localização do DNAr durante a evolução dessas espécies, à partir do ancestral primitivo.

IV.3.4. Subfamília Stenodermatinae

Os cariótipos de *Artibeus lituratus* e *A. planirostris* são semelhantes entre si e semelhantes aos descritos por TOLEDO (1973) e LOPES (1978). No entanto, somente LOPES (1978) refere a presença de constrição secundária e apenas no maior par de subtelocêntricos, sendo que nos exemplares ora analisados tal constrição foi observada em pelo menos dois pares de subtelocêntricos. O padrão de bandas G de *A. lituratus* é compatível com o reverso do padrão de bandas R descrito por

KASAHARA & DUTRILLAUX (1983), mas o padrão de bandas C não coincide com o referido por esses autores, que dizem que o cromossomo X só tem banda centromérica e o cromossomo Y_2 não tem banda C, e por ARAUJO & SOUZA (1987a), que não referem a heterocromatina intersticial dos pares 1, 2, 3 e X.

O padrão de bandas G de *A. planirostris* é semelhante ao apresentado por BAKER e col. (1979, 1982) para *A. jamaicensis* e compatível com o reverso do padrão de banda R descrito por KASAHARA & DUTRILLAUX (1983) para *A. lituratus*. O padrão de bandas C é igual ao de *A. lituratus*. As RONs localizam-se nos braços curtos dos três pares de subtelocêntricos (5, 6 e 7) nessas duas espécies de *Artibeus*.

No cariótipo de *S. lilium* os padrões de bandas G são correspondentes aos descritos por LOPES (1978) e BAKER e col. (1979) e aos de *A. lituratus* e *A. planirostris*. A distribuição da heterocromatina constitutiva assemelha-se à de *Artibeus*, todavia em *S. lilium* não estão presentes as bandas intersticiais. O cromossomo Y de *S. lilium* é submetacêntrico pequeno, apresentando banda C nos centrômeros e nos telômeros dos braços curtos e longos, à semelhança do referido por TUCKER (1986). A RON aparece no menor par de subtelocêntricos, no qual é frequentemente visualizada uma constrição secundária, não referida por BAKER (1967), TOLEDO (1973) e LOPES (1978).

O padrão de bandas G de *Vampyrops lineatus* é similar ao de *Artibeus* e *Sturnira* e o de bandas C ao de *Artibeus*, porém a heterocromatina intersticial aparece também nos cromossomos 5, 6, 7 e 8. As RONs, à semelhança de *Sturnira*, aparecem só no menor par de subtelocêntricos, que também tem constrição secundária no braço curto.

O padrão de bandas G de *Chiroderma doriae* é compatível com o reverso do padrão de bandas R apresentado para *C. villosum* por TUCKER (1986). Os cromossomos de *C. villosum* assemelham-se morfologicamente aos descritos por BAKER (1967) e CAPANNA & CIVITELLI (1970) e só há bandas C centroméricas, conforme também descrito por TUCKER (1986).

Os dados citogenéticos permitem a diferenciação de dois grupos nessas seis espécies de Sternodermatinae: um constituído pelas quatro espécies *A. lituratus*, *A.planirostris*, *S. lilium* e *V. lineatus* (grupo I) e outro constituído pelas duas espécies *C. doriae* e *C. villosum* (grupo II).

As espécies do grupo I tem 2n = 30 ou 30/31 e entre elas há grande similaridade na morfologia dos cromossomos e extensa homologia no padrão de bandas G de praticamente todos os pares autossômicos, com exceção do par 7, que se diferencia por uma inversão paracêntrica entre as espécies de *Artibeus* e as de *Sturnira* e *Vampyrops*. A distribuição da heterocromatina constitutiva apresenta pequenas variações, havendo aumento na quantidade de regiões marcadas de *Sturnira* para *Artibeus* e desse para *Vampyrops*. As regiões organizadoras de nucléolos localizam-se nos três pares de cromossomos subtelocêntricos grandes em *Artibeus* e somente no menor deles em *Sturnira* e *Vampyrops*.

No grupo II, em que as espécies possuem 2n = 26, há grande similaridade na morfologia dos cromossomos e no padrão de bandas G e C. Esses resultados não confirmam a hipótese de BAKER & GENOWAYS (1976) de que tenha havido evolução convergente no gênero *Chiroderma*.

A comparação das espécies do grupo I com as do grupo II mostra que, apesar dos números diplóides distintos, há

extensa homologia cariotípica. Os padrões de bandas G da maioria dos cromossomos (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13 e X) são similares e uma inversão pericêntrica no cromossomo 5 subtelocêntrico das espécies do grupo I originaria o cromossomo 5 metacêntrico de *Chiroderma*. O cromossomo 12 do grupo I parece duplicação do cromossomo 11 e não está presente no grupo II, assim também como neste não aparece o cromossomo 14. Essas similaridades reforçam a hipótese de evolução das espécies dos dois grupos a partir de um ancestral primitivo comum.

Artibeus jamaicensis (2n = 30/31 e NF = 56) foi proposto por BAKER (1979) como o táxon de base para a subfamília Stenodermatinae, o que é compatível com os resultados de estudos bioquímicos em várias espécies de Phyllostomidae(KOOP & BAKER, 1983, para referências). O padrão de bandas G dessa espécie (BAKER e col., 1979; 1982) é semelhante ao de *A. lituratus* e *A. planirostris* e cinco dos quinze pares cromossômicos de *Artibeus* têm homologia completa com cromossomos de *Macrotus*.

Considerando-se as evidências da ancestralidade do cariótipo de *Artibeus*, a proposição de GARDNER (1977) de que o cariótipo de *Chiroderma* tenha derivado de um ancestral desse tipo por rearranjos reducionais e as similaridades nos padrões de bandas G entre *Artibeus* e *Chiroderma*, poder-se-ia pensar que esse tenha derivado de *Artibeus*. No entanto, a presença dos cromossomos 12 e 14 nas espécies do grupo I e as demais diferenças nos padrões de bandas entre as espécies do grupo I e II, permitem sugerir que *Artibeus* e *Chiroderma* tenham derivado de um ancestral comum, principalmente por duplicação cromossômica e adição de heterocromatina constitutiva no primeiro, e pela deficiência do cromossomo 14 e translocação do

DNAr do cromossomo 5, que sofreu a inversão pericêntrica, para o cromossomo 9, no segundo. A evolução cromossômica de *Sturnira* e *Vampyrops* se processaria a partir de *Artibeus*, pela inversão paracêntrica do cromossomo 7, por adição, perda ou translocação de blocos heterocromáticos e por redução no número de RONs funcionais, que passaram de seis a duas.

Outro aspecto interessante referente aos Stenodermatinae trata-se da evolução dos cromossomos sexuais. KASAHARA & DUTRILLAUX (1983) e TUCKER (1986) demonstraram que o atual cromossomo X de *Artibeus* deriva de translocações X- autossomo. Em *Sturnira*, *Vampyrops* e *Chiroderma*, TUCKER (1986) e TUCKER & BICKHAM (1986) demonstraram que a translocação foi dupla, ou seja, um autossomo translocou-se para o cromossomo X e o seu homólogo para o cromossomo Y. Os resultados de bandamento C encontrados neste trabalho são compatíveis com a proposição de TUCKER (1986) e TUCKER & BICKHAM (1986).

TUCKER (1986) verificou a presença de uma banda intersticial de duplicação tardia, no braço longo do cromossomo X de espécies de Stenodermatinae e Phyllostominae, sugerindo que possa ter ocorrido uma segunda translocação de material autossômico para esse cromossomo, no entanto, ele não detectou bandas C nesse local. Neste trabalho são observadas bandas C intersticiais no cromossomo X em ambas as espécies de *Artibeus* e em *Vampyrops* (Figuras 13.B, 14.B e 21.B), na mesma região que TUCKER (1986) assinala como de duplicação tardia, o que reforça a sua sugestão.

IV.3.5. Subfamília Desmodontinae

A subfamília Desmodontinae constitui-se por três espécies: *Desmodus rotundus*, *Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*.

As características morfológicas dos cromossomos de *Desmodus rotundus* são concordantes com as descritas por FORMAN e col. (1968), YONENAGA e col. (1969), TOLEDO (1973) e LOPES (1978), mas o padrão de bandas G não pôde ser comparado com o apresentado por este último autor pela dificuldade na análise da sua fotografia. A determinação do padrão de bandas G permite caracterizar os cromossomos sexuais da espécie, e as bandas C diferem das obtidas por ARAUJO & SOUZA (1987b), que referem a presença de bandas intersticiais em somente dois pares cromossômicos.

As RONs localizam-se na grande constrição secundária do par 8, classificado como 9 por LOPES (1978). SOUZA (1985) e ARAUJO & SOUZA (1987b) também assinalam a presença das RONs na constrição secundária de um autossomo de tamanho médio, apesar de não o especificarem melhor.

O cariótipo obtido para *Diaemus youngi* é semelhante ao apresentado por FORMAN e col. (1968), CADENA & BAKER (1976) e BAKER (1979). Os padrões de bandas G e C não puderam ser comparados com os dados de BASS (1978, cf. em BAKER e col., 1982) devido a inacessibilidade da publicação. Pela análise das bandas G foi possível determinar-se os cromossomos sexuais, sendo o cromossomo X um submetacêntrico médio e o cromossomo Y um pequeno acrocêntrico.

Desmodus, *Diaemus* e *Diphylla* são muito semelhantes cariotipicamente (CADENA & BAKER, 1976). Os padrões de bandas G e C de *Desmodus* (2n = 28) e *Diaemus* (2n = 32) demonstram extensa homologia cromossômica (Figuras 23.B e 25. B). Os cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 13 são comuns às duas espécies, os pares 7, 8, 9, 11 e 12 de *D. rotundus* assemelham-se respectivamente aos 9, 7, 8, 12 e 11 de *D. youngi*, enquanto que o par 6 de *D. rotundus* diferencia-se do de *D. youngi* por uma inversão pericêntrica. O cromossomo 14 de *D. youngi* parece duplicação do 13 e, assim como o 15, não está presente em *D. rotundus*.

A heterocromatina constitutiva tem distribuição diferente nas duas espécies. Ambas a apresentam nos centrômeros, porém em *Desmodus* há bandas intersticiais em ambos os braços de três pares de autossomos (1, 4 e 5), em *Diaemus* apenas no braço longo do cromossomo X. Além disso, *Desmodus* não apresenta heterocromatina em regiões teloméricas, enquanto que em *Diaemus* sete pares (9, 10, 11, 14, 12 13 e 15) a manifestam, dos quais três (12, 13 e 15) no telômero de ambos os braços. Essa variabilidade quanto à distribuição das bandas C, indica que a heterocromatina constitutiva alterou-se durante a diferenciação dessas duas espécies.

Apesar da coincidência do número diplóide de cromossomos (32) e do número fundamental de braços cromossômicos (60) entre *Diphylla* e *Diaemus*, diferindo de *Desmodus* (2n = 28 e NF = 52), verifica-se pelas informações citogenéticas desse trabalho e pelos dados obtidos da literatura para *Diphylla ecaudata* (LOPES, 1978), que alguns cromossomos (por exemplo: 2, 3, 5, 6/7, 10) parecem ser comuns às três espécies e que *Desmodus* e *Diaemus* apresentam grande similaridade entre si, com

homologia praticamente da maioria dos cromossomos, com as poucas diferenças podendo ser atribuídas a inversões e possivelmente deficiências. Apesar de não se poder esclarecer com segurança essas questões, pois o padrão de bandas em *Diphylla* tem baixa resolução, fica evidente pelos dados disponíveis a origem monofilética dessas espécies.

Se um número diplóide de 30 ou 32 e um número fundamental de 56 a 60 representam o cariótipo primitivo dos Phyllostomidae, conforme proposto por BAKER (1967, 1973), os cariótipos de *Diphylla* e *Diaemus* estariam mais próximos da condição primitiva que o de *Desmodus*.

Associando-se as informações citogenéticas da literatura (CADENA & BAKER, 1976; LOPES, 1978) e as informações ecológicas (SAZIMA & UIEDA, 1980), que relacionam mais proximamente *Diphylla* e *Diaemus*, com as informações citogenéticas do presente trabalho e os resultados de análises morfológicas (SMITH, 1976) e bioquímicas (HONEYCUTT e col., 1981), que relacionam proximamente *Diaemus* e *Desmodus*, pode-se propôr que *Desmodus* tenha se originado posteriormente à separação de *Diphylla* e *Diaemus*, à partir desse último.

As RONs, em *Desmodus*, localizam-se no cromossomo 8, que é semelhante ao 7 de *Diaemus*. Contudo, nesta espécie as RONs localizam-se no cromossomo 15, para o qual não é encontrada homologia de bandas no cariótipo de *Desmodus*. Configura-se como certo, portanto, que a localização das RONs alterou-se durante a diferenciação das espécies da subfamília Desmodontinae, embora os mecanismos pelos quais isso tenha ocorrido sejam objeto de especulação. Uma possibilidade seria a inserção do DNAr próxima ao centrômero do cromossomo 7 de *Diaemus*, que o tornaria similar ao 8 de *Desmodus*.

V. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho objetivou estudar as regiões organizadoras de nucléolos (RONs) em 13 espécies de morcegos da família Phyllostomidae (Mammalia, Chiroptera), identificando a localização e a freqüência de RONs ativas nos cromossomos metafásicos, relacionando esta com o número de nucléolos interfásicos e destacando as variações dessas regiões no processo de evolução cromossômica. Foram analisados citogeneticamente 72 exemplares pertencentes à cinco subfamílias de Phyllostomidae: Phyllostominae (*Phyllostomus discolor* e *P. hastatus*), Glossophaginae (*Anoura caudifer* e *Glossophaga soricina*), Carolliinae (*Carollia perspicillata*), Stenodermatinae (*Artibeus lituratus*, *A. planirostris*, *Chiroderma doriae*, *C. villosum*, *Sturnira lilium* e *Vampyrops lineatus*) e Desmodontinae (*Desmodus rotundus* e *Diaemus youngi*). A análise cariotípica foi realizada em células de medula óssea, após estimulação com fermento glicosado. Utilizou-se o bandamento G para determinar os padrões de bandas G, identificar os homólogos e as homologias cromossômicas, o bandamento C para identificação das regiões de heterocromatina constitutiva e a coloração pelo nitrato de prata para identificação das RONs.

Apenas *C. perspicillata* apresenta as RONs localizadas em cromossomo sexual, o cromossomo X, enquanto nas demais espécies elas se localizam em autossomos.

As espécies *A. lituratus*, *A. planirostris* e *C. doriae* apresentam RONs na região distal do braço curto de três pares de cromossomos subtelocêntricos (5, 6 e 7 em *Artibeus*;

6. 7 e 9 em *C. doriae*). A freqüência de RONs marcadas por células variou significativamente, tanto entre indivíduos como entre espécies.

Nas demais espécies, as RONs localizam-se em um único par de cromossomos e geralmente ambas aparecem marcadas, evidenciando a atividade na intérfase anterior. Em cinco espécies elas dispõem-se no menor par do complemento cromossômico, na região distal de um dos braços, em *P. discolor*, e do braço curto, em *P. hastatus* e *A. caudifer*, ou na região proximal do braço longo, em *G. soricina* e *D. youngi*. Em três espécies localizam-se na região distal do braço curto de um dos cromossomos subtelocêntricos médios (*C. villosum*, *S. lilium* e *V. lineatus*) e em *D. rotundus* apresentam-se na região proximal do braço longo de um cromossomo submetacêntrico médio. Em todas as espécies, com exceção das do gênero *Chiroderma*, detecta-se correspondência entre as RONs e constrições secundárias facilmente visíveis em cromossomos metafásicos corados usualmente.

O número de nucléolos interfásicos geralmente não corresponde ao de RONs ativas na metáfase, indicando alta taxa de fusão nucleolar. A proporção de núcleos com nucléolos ligados à membrana nuclear é alta em *D. youngi* (cerca de 60%), porém no conjunto das espécies a maior proporção fica com os núcleos que aparentemente não possuem nucléolos ligados à membrana.

A freqüência de associação de RONs na metáfase é muito baixa, indicando que o processo de desorganização da fusão dos nucléolos geralmente se completa antes da metáfase seguinte.

As técnicas de bandamento G e C são úteis na identificação dos rearranjos cromossômicos e das alterações da heterocromatina constitutiva que ocorreram ao longo do processo de diferenciação das espécies e, associando-se tais informações com a localização das RONs, verifica-se que estas sofreram mudanças frequentes.

Os cariótipos de *P. discolor* e *P. hastatus*, da subfamília Phyllostominae diferem somente por uma inversão pericêntrica no cromossomo 15, que é o portador das RONs, mas o rearranjo não alterou a localização dessas. Já em relação às espécies *A. caudifer* e *G. soricina*, da subfamília Glossophaginae, não se detecta homologia nos padrões de bandas G ao nível de resolução analisado e a heterocromatina é só centromérica. A diferença na localização das RONs exige, no mínimo, uma inversão pericêntrica para alterar a posição dessas, considerando se que os dois pares portadores das RONs sejam correspondentes.

Em *C. perspicillata*, única espécie da subfamília Carolliinae analisada, as RONs dispõem-se no cromossomo X, e oferecem uma questão interessante para análise pois, enquanto os machos apresentam um cromossomo com RON, as fêmeas apresentam dois e ambos são ativos em todas as células.

Nas espécies analisadas da subfamília Stenodermatinae está presente a estabilidade nos padrões de bandas G, de modo que *S. lilium* e *V. lineatus* diferem de *Artibeus* apenas por uma inversão paracêntrica no braço longo do cromossomo 7. O cariótipo de *Chiroderma* possue menor número cromossômico, com padrão de bandas G semelhante às demais espécies, sendo que o cromossomo 5 apresenta uma inversão pericêntrica em relação ao 5 das demais espécies. Os cromossomos subtelacêntricos 5, 6

e 7, portadores das RONs em *Artibeus*, são correspondentes nas cinco espécies analisadas, porém em *C. doriae* o par 5 que sofreu a inversão pericêntrica não é portador da RON, que se apresenta no cromossomo 9. Tais resultados sugerem que os rearranjos cromossômicos envolvidos na diferenciação das espécies de *Artibeus* e *C. doriae*, à partir do ancestral comum, incluiram as RONs. Nas espécies *C. villosum*, *S. lilium* e *V. lineatus* houve redução no número de RONs ativas.

Os cromossomos sexuais dos Stenodermatinae, como já descrito na literatura e semelhantemente aos de *C. perspicillata*, caracterizam-se por apresentarem em *A. lituratus* e *A. planirostris*, uma translocação X-autossomo. Em *S. lilium*, *V. lineatus* e *C. villosum* a translocação do autossomo foi dupla, para ambos os cromossomos sexuais (o X e o Y). Os padrões de bandas C encontrados são compatíveis com esse mecanismo de determinação sexual.

D. rotundus e *D. youngi*, espécies da subfamília Desmondontinae, embora tenham número diplóide diferente (2n= 28 e 32, respectivamente), apresentam extensa homologia de bandas de praticamente todos os cromossomos, diferindo aparentemente por uma inversão pericêntrica e duplicações ou deficiências cromossômicas. A heterocromatina constitutiva tem distribuição diferente nas duas espécies, sendo centromérica e intersticial em *Desmodus* e também telomérica em *Diaemus*. As RONs localizam-se no cromossomo 8 em *D. rotundus* e no cromossomo 15 em *D. youngi*, o qual não possue homologia no cariótipo de *D. rotundus*, o que indica que a localização das RONs alterou-se durante a diferenciação dessas espécies.

Finalizando, à semelhança de outros grupos de

animais, os morcegos apresentam variabilidade quanto à localização das RONs no cariótipo, bem como variabilidade celular intra e interespecífica na atividade dessas regiões. A associação dos dados obtidos para as RONs com as comparações dos padrões de bandas G e C evidenciam a frequente inclusão das RONs, nos rearranjos ocorrentes durante a evolução das espécies.

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The objective of the present investigation was to study the nucleolus organizer regions (NOR's) of 13 species of bats of the family Phyllostomidae (Mammalia, Chiroptera). The location and frequency of active NOR's on metaphase chromosomes was determined and related to the number of interphase nucleoli, with a discussion of the variation these regions during the process of chromosomal evolution. Cytogenetic analysis was carries out on 72 individuals belonging to the following five subfamilies of Phyllostomidae: Phyllostominae (*Phyllostomus discolor* and *P. hastatus*), Glossophagine (*Anoura caudifer* and *Glossophaga soricina*), Carolliinae (*Carollia perspicillata*), Stenodermatinae (*Artibeus lituratus, A. planirostris, Chiroderma doriae, C. villosum, Sturnira lilium* and *Vampyrops lineatus*) and Desmodontinae (*Desmodus rotundus* and *Diaemus youngi*). Karyotypc analysis was performed using bone marrow cells stimulates with glucose yeast. G-banding patterns were used to identify homologous chromosomes and chromosomal homologies, and C-banding was used to identify constitutive heterochromatin regions. NOR's were identified by silver nitrate staining.

NOR's were located on the autosomes in all species except *C. perspicillata*, in which they were located on the X chromosome.

In *A. lituratus, A. planirostris* and *C. doriae*, NOR's were located on the distal region of the short arm of three pairs of subtelocentric chromosomes (5,6 and 7 in *Artibeus;*

6, 7 and 9 in *C. doriae*). The frequency of labeled NOR's per cell varied significantly among individuals and species.

In the remaining species, NOR's were located on single chromosome pair and usually both were labeled, indicating activity during the precedent interphase. In five species, NOR's were located on the smallest pair of the chromosome complement, in the distal region of one of the arms (*P. discolor*) and of the short arm (*P. hastatus* and *A. caudifer*) or in the proximal region of the long arms (*G. soricina* and *D. youngi*). In three species, NOR's were located in the distal region of the short arm of one of the medium subtelocentric chromosomes (*C. villosum, S. lilium* and *V. lineatus*) and in the proximal region of the long arm of a medium submetacentric chromosome (*D. rotundus*). In all of these species, with exception of those belonging to genus *Chiroderma*, NOR's corresponded to secondary constrictions, as easily visualized by standard staining.

The number of interphase nucleoli generally did not correspond to the number of active NOR's at metaphase, indicating a high rate of nucleolar fusion. The proportion of nuclei with nucleoli connected to a nuclear membrane was high in *D. youngi* (approximately 60%); however in most species, the nuclei did not appear to have nucleoli connected to the membrane.

The frequency of NOR association at metaphase was very low, indicating that the process of disorganization of nucleolar fusion was usually complete before the next metaphase.

G-and G-banding, as well as Ag-NOR staining showed that frequent modifications occurred during the speciation

process. The karyotypes of *P. discolor* and *P. hastatus* (subfamily Phyllostominae) differed only by a pericentric inversion in the NOR-bearing chromosome 15, but the rearrangement did not change NOR location. In *A. caudifer* and *G. soricina* (subfamily Glossophaginae), no homology in G-banding patterns was detected at the level of resolution used, and the only heterochromatin observed was centromeric. The difference in NOR location requires at the least a pericentric inversion to account for their position.

Interestingly in *C. perspicillata*, the only species analyzed in the subfamily Carolliinae, the NOR's were located on the X chromosome so that males only have one chromosome with NOR's and females have two, both of them active in all cells.

The subfamily Stenodermatinae showed stability in G-banding patterns, with *S. lilium* and *V. lineatus* differing from *Artibeus* only by a paracentric inversion on the long arm of chromosome 7. The karyotype of Chiroderma has a small chromosome number, with G-banding patterns similar to those of the other species, and chromosome 5 showing a pericentric inversion in relation to chromosome 5 of the others species. The subtelocentric chromosomes 5, 6 and 7, which are the NOR-bearing chromosomes in *Artibeus*, correspond in the five species analyzed. However, in *C. doriae*, pair 5 wich shows a pericentric inversion, is not a carrier of NOR's, wich are located on chromosome 9. These results suggest that the chromosomal rearrangements involved in the species differentiation that led to *Artibeus* and *C. doriae* included the NOR's. In

C. villosum, *S. lilium* and *V. lineatus* the was a reduction in the number of active NOR's.

The sex chromosomes of Stenodermatinae, as described in the literature and as is the case for those of *C. perspicillata*, are characterized by an X-autosome translocation in *A. lituratus* and *A. planirostris*. In *S. lilium*, *V. lineatus* and *C. villosum* the translocation was double, i.e. for both sex chromosomes (X and Y). The C-banding patterns obtained are compatible with this mechanism of sexual determination.

D. rotundus and *D. youngi* (subfamily Desmodontinae) although having different diploid numbers (2n = 28 e 32 respectively), showed extensive banding homology in pratically the entire chromosomes complement, apparentely differing by one pericentric inversion and by chromosome duplications or deletions. Constitutive heterochromatin was distributed differently in the two species, being centromeric and interstitial in *Desmodus* but also telomeric in *Diaemus*. The NOR's are located in the chromosome 8 in *D. rotundus* and in the chromosome 15 in *D. youngi*, that don't have homologies in the karyotype of *D. rotundus*. This suggested that the location of NOR's was change during the differentiation of this species.

Finishing, similar to others classes of animals bats show variability in NOR location in the karyotype and intra and interspecific cellular variability in NOR activity.

The association of results obtained for the NOR's with the comparisons of the patterns of G and C-bands demonstra

te the frequente inclusion of the NOR's in the rearrangementes wich had occurred during the evolution of the species.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINORI, T. & OJIMA, Y. The assignment of the nucleolus organizer regions in the chromosomes of the carp, the funa and their hybrids (Cyprimidae, Pisces). *Proc. Japan. Acad.*, *58*: 303 - 306, 1982.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. & FORESTI, F. As regiões organizadoras do nucléolo em peixes. *Ciênc. e Cult.*, *37*: 448-453, 1985.

ANASTASSOVA-KRISTEVA, M. The nucleolar cyle in man. *J. Cell Sci.*, *25*: 103-110, 1977.

ANDÕ, K.; TAGAWA, T. & UCHIDA, T.A. A karyotypic study on four species of the indonesian fruit-eating bats, belonging to *Cynopterus*, *Eonycteris* and *Macroglossus* (Chiroptera; Pteropidae). *Caryologia*, *33*: 41-53, 1980a.

ANDÕ, K.; TAGAWA, T. & UCHIDA, T.A. Karyotypes of Taiwanese and Japanese bats belonging to the families Rhinolophidae and Hipposideridae. *Cytologia*, *45*: 423-432, 1980b.

ANDÕ, K.; TAGAWA, T. & UCHIDA, T.A. The C- banding pattern of 6 Japanese species of vespertilionine bats (Mammalia: Chiroptera). *Experientia*, *36*: 653-654, 1980c.

ANGELIER, N.; HERNANDEZ-VERDUN, D. & BOUTEILLE, M. Visualization of Ag - NOR proteins on nucleolar transcriptional units in molecular spreads. *Chromosoma*, *86*: 661-672, 1982.

ARAUJO, M.C.P. de. & SOUZA, M.J. Análise comparativa da distri

buição de heterocromatina constitutiva no gênero *Artibeus* (Chiroptera). Anais do IV Encontro de Genética do Nordeste Olinda, PE : 85, 1987a.

ARAUJO, M.C.P. & SOUZA, M.J. Análise comparativa dos padrões de bandeamento cromossômico em *Desmodus rotundus* e *Diphylla ecaudata* (Chiroptera). *Ci.e Cult., 39*(7): 755 (Suplemento), 1987b.

ARNHEIM, N. and SOUTHERN, E.M. Heterogeneity of the ribosomal genes in mice and men. *Cell, 11:* 363-370, 1977.

ARRIGHI, F.E.; LAU, Y.F. & SPALLONE, A. Nucleolar activity in differentiated cells after stimulation. *Cytogenet. Cell Genet., 26*: 244-250, 1980.

ARROUA, M.L.; HARTUNG, M.; DEVICTOR, M.; BERGE-LEFRANC, J. L. & STAHL, A. Localisation of ribosomal genes by in situ hybridization in the fibrillar centre of the nucleolus in the human spermatocyte. *Biol. Cell, 44*: 337-340, 1982.

BAKER, R.J. Karyotypes of bats of the family Phyllostomidae and their taxonomic implications. *Sowthwestern Naturalist, 12*: 407-428, 1967.

BAKER, R.J. Comparative cytogenetics of the New World leaf-nosed bats (Phyllostomatidae). *Period. Biol., 75*: 37-45 , 1973.

BAKER, R.J. Karyology in Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae. Part. III. *Special Publ. Mus.;Texas Tech. Univ., 16*: 1-441 (107-155), 1979.

BAKER, R.J. Chromosomal flow between chromosomally characterized taxa of a volant mammal, *Uroderma bilobatum* (Chiroptera: Phyllostomatidae). *Evolution, 35*: 296-305, 1981.

BAKER; R.J. A sympatric crypitic species of mammal: a new species of *Rhogeessa* (Chiroptera. Vespertilionidae). *Syst. Zool., 33*: 178-183, 1984.

BAKER, R.J. & BASS, R.A. Evolutionary relationships of the Brachyphyllinae to the Glossophaginae genera *Glossophaga* and *Monophyllus*. *J. Mamm., 60*: 364-372, 1979.

BAKER, R.J. & BICKHAM, J.M. Karyotypic evolution in bats: evidence of extensive and conservative chromosomal evolution in closely related taxa. *Syst. Zool., 29*: 239-253. 1980.

BAKER, R.J. & BLEIR, W.J. Karyotypes of bats of the subfamily Carolliinae (Mammalia, Phyllostomatidae) and their evolutionary implications. *Experientia, 27*: 220, 1971.

BAKER, R.J. & GENOWAYS, H.H. A new species of *Chiroderma* from Guadalupe, West Indies (Chiroptera: Phyllostomatidae). *Occas. Papers Mus., Texas Tech Univ., 39*: 1-9, 1976.

BAKER, R.J.; ATCHLEY, W.R. & MC DANIEL, V.R. Karyology and morphometrics of Peter's tent-making bat, *Uroderma bilobatum* Peters (Chiroptera, Phyllostomatidae). *Syst. Zool., 21*: 414-429, 1972.

BAKER, R.J.; BASS, R.A. & JOHNSON, M.A. Evolutionary implications of chromosomal homology in four genera of stenodermine bats (Phyllostomatidae: Chiroptera). *Evolution, 33:* 220-226, 1979

BAKER, R.J.; BICKHAM, J.M. & ARNOLD, M.L. Chromosomal evolution in *Rhogeessa* (Chiroptera Vespertilionidae): possible speciação by centric fusions. *Evolution, 39*: 233-243, 1985.

BAKER, R.J.; BLEIER, W.J. & ATCHLEY, W.R. A contact zone between karyotypically characterized taxa of *Uroderma bilobatum* (Mammalia: Chiroptera). *Syst. Zool.,24:* 133-142, 1975.

BAKER, R.J.; KOOP, B.F. & HAIDUK, M.W. Resolving systematic relationship with G-bands a study of five genera of South American Cricetinae Rodents. *Syst. Zool., 32*: 403-416,1983.

BAKER, R.J.; HAIDUK, M.W.; ROBBINS, L.W.; CADENA, A. & KOOP, B. F. Chromosomal studies of South American bats and their systematic implications. In: Mares, M.A.; Genoways, H.H. (eds.): *Mammalian Biology in South America*, vol. 4. *Special Publication Series Pymatuning Laboratory* of *Ecology, University* of *Pittsburgh, Penn.*, pp. 303-327, 1982.

BICUDO, H.E.M. de C. Silver staining and the nucleolar organizing activity in *Drosophila* species of the mulleri complex and their hybrids. *Rev. Bras. Genet.*, V: 31-50, 1982.

BICUDO, H.E.M. de C. & RICHARDSON, R.H. Gene regulation in *Drosophila mulleri, D. arizonensis* and their hybrids: the nucleolar organizer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* , *74:* 3498-3502, 1977.

BICKHAM, J.W. Chromosomal variation and evolutionary relationship of vespertilionid bats. *J. Mamm.*, *60*: 350-363, 1979.

BICKHAM, J.W. & BAKER, R.J. Implications of chromosomal variation in *Rhogeessa* (Chiroptera: Vespertilionidae) *J. Mamm.*, *58*: 448-453, 1977.

BICKHAM, J.W. & BAKER, R.J. Canalization model of chromosomal evolution. *Carnegie Mus. Nat. Hist.*, *13*: 70-84, 1979.

BICKHAM, J.W. & HAFNER J.C. A chromosomal banding study of three species of vespertilionidae bats from Yugoslavia. *Genetica*, *48*: 1-3, 1978.

BICKHAM, J.W. & ROGERS, D.S. Structure and variation of the nucleolus organizer regions in turtles. *Genetica*, *67*: 171-184, 1985.

BICKHAM, J.W.; MCBEE, K. & SCH LITTER, D.A. Chromosomal variation among seven species of *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *J. Mamm.*, *67*: 746-750, 1986.

BIRSTEIN, V.J. Localization of NORs in karyotypes of four *Rana* species. *Genetica*, *64* : 149-154, 1984.

BIRSTEIN, V.J. & VASILIEV, V.P. Tetraploid octoploid relationships and karyological evolution in the order Ascipenseriformes (Pisces) karyotypes, nucleoli, and nucleolus organizer regions in four acipenserid species. *Genetica*, *72*: 3-12, 1987.

BLOOM, S.E. & GOODPASTURE, C. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer in human chromosomes. *Hum. Genet., 34*: 199-206, 1976.

BOBROW, M.; PEARSON, P.L. & COLLACOTT, H.E.A.C. Para nucleolar position of the human Y chromosome in interphase nuclei. *Nature, 232*: 556-557, 1971.

BOURGEOIS, C.A.; BARD, F. & BOUTEILLE, M. Evidence showing that the nucleolus-envelope region is located on the nor-bearing chromosomes in *Aotus trivirgatus*. *J. Submicroscopie Cytol, 15*: 873-882, 1983.

BOURGEOIS, C.A.; HERNANDEZ-VERDUN, D.; HUBERT, J. & BOUTEILLE, M. Silver staining of NORs in electron microscopy. *Exp. Cell Res., 123*: 449-452, 1979.

BOURGEOIS, C.A.; HEMON, D.; BEAURE d' AUGÈRES, C.; ROBINEAUX, R. & BOUTEILLE, M. - Kinetics of nucleolus location within the nucleus by time-lapse microcinematography. *Biol. Cell, 40*: 229-232, 1981.

BRINKLEY, B.R.; VALDIVIA, M.M.; TOUSSON, A. & BRENNER, S.L. Compound kinetochores of the indian muntjac. Evolution by linear fusion of unit kinethochores. *Chromosoma, 91*: 1-11 , 1984.

BROWN, D.D. & DAWID, I.B. Specific gene amplification in oocytes. *Science, 160* : 272-280, 1968.

BUCKLAND, R.A. & EVANS, H.J. Cytogenetic aspects of phylogeny in the Bovidae. I. G-banding. *Cytogenet. Cell Genet., 21:* 42-63, 1978.

BUONGIORNO-NARDELLI, M.; AMALDI, F.; BECCARI, E. and JUNAKOVIC, N. Size of ribosomal DNA repeating units in *Xenopus laevis:* limited individual heterogeneity and extensive population polymorphism. *J. Mol. Biol., 110*: 105-117, 1977.

BUREAU, J.; HUBERT, J. & BOUTEILLE, M. Attachment of DNA to nucleolar and nuclear skeletal structures as visualized by Kleinschmidt molecular spreading. *Biol. Cell, 56*: 61-70, 1986.

BUYS, C.H.C.M. & OSINGA, J. Abundance of protein-bound sulfhydryl and disulfide groups at chromosomal nucleolus organizing regions. A cytochemical study on the selective silver staining of NORs. *Chromosoma, 77*: 1-11, 1980.

BUYS, C.H.C.M. & OSINGA, J. Selective staining of the same sete of nucleolar phosphoproteins by silver and giemsa - A combined biochemical and cytochemical study on staining of NORs. *Chromosoma, 89*: 387-396, 1984.

CADENA, A. & BAKER, R.J. Cariotipos de los murcielagos vampiros (Chiroptera: Desmodinae). *Caldasia, 54*: 159-163,1976.

CAPANNA, E. & CIVITELLI, M.V. Chromosomal mechanisms in the evolution of chiropteran karyotype chromosomal tables of chiroptera. *Caryologia, 23*: 79-111, 1970.

CASPERSON, T.; FARBER, S.; FOLEY, G.E.; KUDYNOWSKY, J.; MODEST, E. J.; SIMONSON, K.; WAGH, V. & ZECH, L. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res., 49*:219-222, 1968.

CERMEÑO, M.C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J.L. & LACADENA, J.R. Nucleolar activity and competition (amphyplasty) in the genus *Aegilops*. *Heredity, 53*: 603-611, 1984a.

CERMEÑO, M.C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J.L. & LACADENA, J.R. Nucleolar organizer activity in wheat, rye and derivatives analysed by a silver-staining procedure. *Chromosoma, 89*:370-376, 1984b.

COMINGS, D.E. Arrangement of chromatin in the nucleus. *Hum. Genet. 53*: 131-143, 1980.

COUVE, E. Morphometric analysis of the nucleolus during the life cycle of human odontoblasts. *The Anatomical Record, 213*: 215-224, 1985.

DANIEL, A. Single Cd band in dicentric translocations with one suppressed centromere. *Hum. Genet., 48*: 85-92, 1979.

DARLINGTON, C.D. & LA COUR, L.F. Nucleic acid starvation of chromosomes in *Trillium*. *J. Genet., 40*: 185-213, 1940.

DE CAPOA, A.; MARLEKAJ, P.; BALDINI, A.; ROCCHI, M. & ARCHIDIACONO, N. Cytologic demonstration of differential activity of rRNA gene clusters in different human tissues *Hum. Genet., 69*: 212-217, 1985.

DE LOZIER-BLANCHET, C.D.; WALT, H. & ENGEL, E. Ectopic nucleolus organizer regions (NORs) in human testicular tumours. *Cytogenet Cell Genet, 41*: 107-113, 1986.

DENTON, T.E.; BROOKE, W.R. & HOWELL, W.M. A technique for the simultaneous staining of both nucleolar organizer regions

and kinetochores of human chromosomes with silver. *Stain. Technol, 52*: 311-313, 1977.

DITTES, J.; KRONE, W.; BROSS, K.; SCHMID, D. & VOGEL, W. Biochemical and cytogenetic studies on the nucleolus organizer regions (NORs) of man. *Humangenetik, 26*: 47-59 , 1975.

DUPUY-COIN, A.M.; PEBUSQUE, M.J.; SEITE, R. & BOUTEILLE, M. Localisation of transcription in nucleoli of rat sympathetic neurons. A quantitative ultrastructural autoradiograpy study. *J. Submicrosc. Cytol. 18*: 21-27, 1986.

EL-ANSARY, E.H.; GORDON, D.J.; TEE, R.D. & TAYLOR, A.J.N. Respiratory allergy to inhaled bat guano. *Lancet, 7*:316-318, 1987.

ELDER, F.F.B. Tandem fusion, centric fusion and chromosomal evolution in the cotton rats, genus *Sigmodon.Cytogenet.Cell Genet., 26*: 199-210, 1980.

ERICKSON, J.M.; RUSHFORD, C.L.; DORNEY, D.J.; WILSON, G.N. & SCHMICKEL, R.D. Structure and variation of human ribosomal DNA: molecular analysis of cloned fragments. *Gene , 16:* 1-9, 1981.

EVANS, H.J.; BUCKLAND, R.A. & PARDUE, M.L. Location of the genes coding for 18S and 28S ribossomal RNA in the human genome. *Chromosoma, 48*: 405-426, 1974.

FEDYK, S. & RUPRECHT, A.L. Karyotypes of *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774) and *P. nathusii* (Keuserling and Blasius, 1839). (Chiroptera: Vespertilionidae). *Caryologia, 29*: 283-289, 1976.

FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E.; SÁNCHEZ-PINA, M.A.; MEDINA, F.J. & RISUEÑO, M.C. Ag-NOR staining and activity: analysis under inhibitors of nucleolar transcription. *Biol. Cell, 45:* 112 , 1982.

FERRARO, M.; LAVIA, P.; PELLICCIA, F. & DE CAPOA, A. Clonal inheritance of r RNA gene activity: cytological evidence in human cells. *Chromosoma, 84*: 345-351, 1981.

FLAVELL, R.B. & O'DELL, M. The genetic control of nucleolus formation in wheat. *Chromosoma, 71*: 135-152, 1979.

FORD, C.E. & HAMERTON, J.L. A colchicine hypotonic citrate , squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol., 31*: 247-251, 1956.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. & TOLEDO, Fº, S.A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet. Cell Genet., 31*: 137-144, 1981.

FORMAN, G.L.; BAKER, R.J. & GERBER, J.D. Comments on the systematic status of vampyre bats (family Desmodontidae). *Syst. Zool., 17*: 417-425, 1968.

FREDGA, K. & BERGSTRÖM, U. Chromosome polymorphism in the root vole (*Microtus oeconomus*). *Hereditas, 66*: 145-152,1970.

FREITAS, T.R.O.; MATTEVI, M.S. & OLIVEIRA, L.F.B. Unusual C-band patterns in three karyotypically rearranged forms of *Scapteromys* (Rodentia, Cricetidae) from Brazil. *Cytogenet. Cell Genet., 38*: 39-44, 1984.

FUNAYAMA, G.K. & BARRETO, M.P. Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi* . LIV: infecção na

tural do morcego, *Eptesicus brasiliensis brasiliensis* (Desmarest, 1819) pelo *T. cruzi*. *Rev. Bras. Biol.*, *33*: 439-444, 1973.

GALL, J.G. Differential synthesis of the genes for ribosomal RNA during amphibian oogenesis. *Proc. Acad. Natl. Sci.* USA, *60*: 553-560, 1968.

GAGNE, R.; LABERGE, C.; TANGUAY, R. Aspect cytologique et localisation intranucléaire de l'hétérochromatine constitutive des chromosomes C9 chez I'homme. *Chromosoma*, *41*: 159-166, 1973.

GANI, R. Nucleoli of cultured human lymphocytes. II. nucleolar fusion and its relation to acrocentric association . *Hum. Genet.* *42*: 271-282, 1978.

GARDNER, A.L. Chromosomal variation in *Vampyressa* and a review of chromosomal evolution in the Phyllostomidae (Chiroptera). *Syst. Zool.*, *26*: 300-318, 1977.

GOESSENS, G. & LEPOINT, A. Localization of Ag-NOR proteins in Ehrlich tumour cell nucleolus. *Biol. Cell*, *43*: 139-142, 1982.

GOLD, J.R. Silver staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer regions in north american cyprinid fishes. *Copeia*, *1*: 133-139, 1984.

GONZÁLEZ, S.P. & NARDONE, R.M. Cyclic nucleolar changes during the cell cycle. *Exp. Cell Res.*, *50*: 599-615, 1968.

GOODPASTURE, C. & BLOOM, S.E, Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, *53*: 37-50, 1975.

GREENBAUN,I.F. Genetic interactions between hybridizing cytotypes of the tent making bat (*Uroderma bilobatum*). *Evolution, 35*: 305-320, 1981.

GROUCHY, J. & TURLEAU, C. *Atlas des Maladies Chromosomiques*. Paris, Expansion Scientifique Fraiçaise, 1977.

GUICHAOUA, M.R.; DEVICTOR, M.; HARTUNG, M.; LUCIANI, J.M. & STAHL, A. Randon acrocentric bivalent associations in human pachytene spermatocytes. *Cytogenet. Cell Genet. 42*: 191-197, 1986.

HAIDUK, M.W. & BAKER, R.J. Cladistical analysis of G- banded chromosomes of nectar feeding bats (Glossophaginae:Phyllostomidae). *Syst. Zool., 31*: 252-265, 1982.

HAIDUK, M.W.; BAKER, R.J.; ROBBINS, L.W. & SCHLITTER, D.A. Chromosomal evolution in african Megachiroptera: G- and C - band assessment of the magnitude of change in similar standard karyotypes. *Cytogenet. Cell Genet., 29*: 221-232, 1981.

HARADA, M. & YOSIDA, T.H. Karyological study of four japonese *Myotis* bats (Chiroptera, Mammalia). *Chromosoma, 65*: 283-291, 1978.

HARADA, M.; YENBUTRA, S.; YOSIDA, T.H. & TAKADA, S. Cytogenetical study of *Rhinolophus* bats (Chiroptera, Mammalia)from Thailand. *Proc. Japan Acad., 61*: 455-458, 1985.

HATCH, F.T.; BODNER, A.J.; MAZRIMAS, J.A. & MOORE, D.H. Satellite DNA and cytogenetic evolution in kangaroos rats (genus *Dipodomys*). *Chromosoma, 58*: 155-168, 1976.

HAYMAN, D. & SHARP, P. Verification of the structure of the complex sex chromosome system in *Lagorchestes conspicillatus* Gould (Marsupialia: Mammalia). *Chromosoma, 83*: 263-274, 1981.

HEITZ, E. Nucleolen und chromosomen in der gattung *Vicia*. *Planta* (Berl.),*15*: 495-505, 1931.

HENDERSON, L.M. & BRUÈRE, A.N. Inheritance of Ag-stainability of the nucleolus organizer regions in domestic sheep. *Ovis . aries. Cytogenet. Cell Genet., 26*: 1-6, 1980.

HENDERSON, A.S. & RITOSSA, F. On the inheritance of rDNA of magnified bobbed loci in *D. melanogaster. Genetics, 66*: 463-473, 1970.

HENDERSON, A.S.; WARBURTON, D. & ATWOOD, K.C. Location of ribosomal RNA in the human chromosome complement. *Proc.Natl. Acad. Sci.,* USA,*69*: 3394-3398, 1972.

HENDERSON, A.S.; WARBURTON, D. & ATWOOD, K.C. Ribosomal DNA connectives between human acrocentric chromosomes. *Nature, 245*: 95-97, 1973.

HENDERSON, A.S.; EICHER, E.M.; YU, M.T. & ATWOOD, K.C. Variation in ribosomal RNA gene number in mouse chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet., 17*: 307-316, 1976.

HENDERSON, A.; WARBURTON, D.; MEGRAW-RIPLEY, S. & ATWOOD, K.C. The chromosomal location of rDNA in selected lower primates. *Cytogenet. Cell Genet., 19*: 282-302, 1977.

HERNANDEZ-VERDUN, D. & BOUTEILLE, M. Nucleologenesis in chick erythrocyte nuclei reactivated by cell fusion. *J. Ultrastruct. Res.*, *69*: 164-179, 1979.

HERNANDEZ-VERDUN, D.; DERENZINI, M. & BOUTEILLE, M. The morphological relationship in electron microscopy between NOR-silver proteins and intranucleolar chromatin. *Chromosoma*, *85*: 461-473, 1982.

HERNANDEZ-VERDUN, D.; HUBERT, J.; BOURGEOIS, C.A. & BOUTEILLE, M. Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nucleolar structures. *Chromosoma*, *79*: 349-362, 1980.

HILL, J.E. A new family, genus, and species of bat (Mammalia: Chiroptera) from Thailand. *Bull. British. Mus. (Nat. Hist.)*, *27*: 301-336, 1974.

HOFF, G.L. & BIGLER, W.J. The role of bats in the propagation and spread of histoplamosis: a review. *J. Wild dis.*, *17*: 191-196, 1981.

HOLDEN, J.J.A. & REIMER, D.L.; HIGGINS, M.J.; RODER, J.C. & WHITE, B.N. Amplified sequences from chromosome 15, including centromeres, nucleolar organizer regions, and centromeric heterochromatin in homogeneously staining regions in the human melanoma cell line Mc Wo. *Canc. Genet. Cytogenet.*, *14*: 131-146, 1985.

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.

HONEYCUTT, R.H.; GREENBAUM, I.F.; BAKER, R.J. & SARICH, V.M. Molecular evolution of vampyre bats. *J. Mamm., 62*: 805-811 , 1981.

HOOD, C.S. & BAKER, R. G-and C-banding chromosomal studies of bats of the family Emballonuridae *J. Mamm., 67*: 705-711, 1986.

HOOD, G.S. & SMITH, J.D. Histomorphology of the female reproductive tract in phyllostomoid bats. *Occas Papers Mus., Texas Tech Univ., 86*: 1-38, 1983.

HOWELL, W.M. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma, 62*: 361-367, 1977.

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

HOWELL, W.M. & DENTON, T.E. An ammoniacal silver staining technique specific for satellite III DNA regions on human chromosomes. *Experiencia, 30*: 1364-1365, 1974.

HSU, T.C.; PATHAK, S. & CHEN, T.R. The possibility of latent centromeres and a proposed nomenclature system for total chromosome and whole arm translocations. *Cytogenet. Cell Genet., 15*: 25-36, 1975a.

HSU, T.C.; SPIRITO, S.E. & PARDUE, M.L. Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma, 53:* 25-36, 1975b.

HSU, T.C.; PATHAK, S.; BASEN, B.M. & STAAK, G.T. Induced robertsonian fusions and tandem translocations in mammalian cell cultures. *Cytogenet. Cell Genet., 21*: 86-98, 1978.

HUBERT, J. & BOURGEOIS, C.A. The nuclear skeleton and the spatial arrangement of chromosomes in the interphase nucleus of vertebrate somatic cells. *Hum. Genet., 74*: 1-15, 1986.

HUBERT, J.; BUREAU, J. & BOUTEILLE, M. Anchorage of the nucleolus in the pore complex-lamina by a DNA-bearing structure masked in situ in rat liver nuclei. *Biol. Cell , 52*: 91-102, 1984.

IMAI, H.T. Origin of telocentrics in mammals. *J. Theoret. Biol., 71*: 619-637, 1978.

JONES, Jr. J.K. & CARTER, D.C. Annotated chicklist, with keys to subfamilies and genera. *Spec. Publ. Mus., Texas Tech Uni., 10*: 7-38, 1976.

JORDAN, E.G. Nucleolar nomenclature. *J. Cell Sci., 67*: 217-220, 1984.

JOTTERAND-BELLOMO, M. - Le genre *Mus* africain, un example D'homogénéité caryotypique: étude cytogénétique de *Mus minutoides/musculoides* (côte d'Ivovie), de *M. setulosus* (République Centrafricaine), et de *M. mattheyi* (Burkina Faso). *Cytogenetc. Cell Genet., 42*: 99-104, 1986.

JOTTERAND-BELLOMO, M. & VAN MELLE, G. Variability of nucleolar organizer activity in human lymphocytes via Ag-staining *Hum. Genet., 59*: 141-147, 1981a.

JOTTERAND-BELLOMO, M. & VAN MELLE, G. Is it always the same NOR that is more active in a pair of acrocentrics with distint Ag-staining? *Hum. Genet., 59*: 185, 1981b.

KANO-TANAKA, K.; FUKAMI, H.; KATO, T.; ITO, J. & TANAKA, T. Specific changes in the distribution pattern of silver-stained nucleolar organizer regions in chemically transformed rat glial cells . *Proc. Japan Acad., 62*: 398-400, 1986.

KASAHARA, S. & DUTRILLAUX, B. Chromosome banding patterns of fours species of bats with special reference to a case of X-autosome translocation. *Ann. Genet., 26*: 197-201, 1983.

KASAHARA, S. & YONENAGA-YASSUDA, Y. Sex-chromosome variability in *Zygodontomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae). *Cytologia, 48*: 569-576, 1983.

KASAHARA, S.; YONENAGA-YASSUDA, Y. & RODRIGUES, M.T. Karyotype and evolution of the *Tropidurus nanuzae* species group (Sauria, Iguanidae). *Rev. Bras. Genet., X* : 185-197, 1987.

KIVI, S. & MIKELSAAR, A.V. Polymorphism of Ag-stained nucleolus organizer regions in lymphocytes of patients with ovarian or breast adenocarcinoma. *Hum. Genet., 69*: 350-352, 1985.

KNIBIEHLER , B.; MIRRE, C.; HARTUNG, M.; JEAN, P. & STAHL, A. Sex-vesicle associated nucleolar organizers in mouse esperma tocytes: localization, structure and origin. *Cytogenet.Cell Genet., 31*: 47-57, 1981.

KOOP, B.F. & BAKER, R.J. Electrophoretic studies of rela-

tionships of six species of *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Occas Papers Mus., Texas Tech Univ., 83*: 1-12,1983.

KOOP, B.F.; BAKER, R.J. & GENOWAYS, H.H. Numerous chromosonal polimorphisms in a natural population of rice rats(*Oryzomys*, Cricetidae). *Cytogenet. Cell Genet., 35*: 131-135, 1983.

KOOPMAN, K.F. Zoogeography of bats. In SLAUGHTER, B.H. & WALTON, D.W., ed. *A chiropteran biology symposium*. Dallas, Southern Methodist Uni. Press, p. 29-50, 1970.

KOOPMAN, K.F. A synopsis of the families of bats. *Bat Research News, 25*: 25-29, 1984.

KRISHNA, D.S.; ROY, S. & SHAH, V.C. Localization of nucleolus organizing regions on chromosomes of the hanuman langur, *Presbytis entellus entellus* (Dufresne), the bonnet monkey, *Macaca radiata*. *Indian J. Exp. Biol., 21*: 315-317, 1983.

LABHART, P. & REEDER, R.H. Characterization of three sites of RNA 3' end formation in the *Xenopus* ribosomal gene spacer. *Cell, 45*: 431-443, 1986.

LAFARGA, M.; VILLEGAS, J. & CRESPO, D. Changes in nucleolar morphology and volume of the supraoptic nucleus neurons during postnatal development of the rat. *Developmental. Brain Reserarch, 22*: 310-313, 1985.

LEDBETTER, D.H. NOR-bearing Y chromosome in a primate, *Hylobates (Symphalangus) syndactylus*. *Cytogenet. Cell Genet, 29*: 250-252, 1981.

LEE, M.R. & ELDER, F.F.B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenet. Cell Genet.*, *26*: 36-40, 1980.

LEPOINT, A. & GOESSENS, G. Nucleologenesis in Ehrlich tumour cells. *Exp. Cell Res.*, *117*: 89-94, 1978.

LEVAN, A.; FREDGA, K. & SANDBERG, A.A. Nomenclatura for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, *52*: 201-220, 1964.

LI, X. & ZHOU, X. Study of nucleolar organizer in women with galactorrhea, or polycystic ovaries, or using oral contraceptive. *Am. J. Med Genet.*, *15*: 567-569, 1983.

LIMING, S.; YINGYING, Y. & XINGSHUNG, D. Comparative cytogenetic studies on the red muntjac, chinese muntjac, and their F_1 hybrids. *Cytogenet. Cell Genet.*, *26*: 22-27, 1980.

LISCHWE, M.A.; SMETANA , K.; OLSON, M.O.J. & BUSCH, H. Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. *Life Sciences*, *25*: 701-708, 1979.

LONG, E.O. & DAWID, I.B. Repeated genes in eukaryote. *Ann. Rev. Biochem.*, *49*: 727-764, 1980.

LOPES, M.J.S. Contribuição para o estudo citogenético de morcegos: análise de 15 espécies. Tese de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, S.P., 1978.

MC CLINTOCK, B. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea Mays*. *Z. Zellforsh*, *21*: 294-328, 1934.

MAC GREGOR, H.C.; VLAD, M. & BARNETT, L. An investigation of some problems concerning nucleolus organizers in salamanders. *Chromosoma, 59*: 283-299, 1977.

MADEN, B.E.H. Ribossomal genes dissected. *Nature, 272*:580-581, 1978.

MAIA, V. & LANGGUTH, A. Chromosomes of the Brasilian cricetid rodent *Wiedomys pyrrhorhinos*(WIED, 1981). *Rev. Bras. Genet., X:* 229-233, 1987.

MAMAEV, N.; MAMAEVA, S.; LIBURKINA, I.; KOZLOVA, T.; MEDVEDEVA, N. & MAKARKINA, G. The activity of nucleolar organizer regions of human bone marrow cells studied with silver staining, I. chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet, 16*: 311-320, 1985.

MASCARELLO, J.T.; STOCK, A.D. & PATHAK, S. Conservantins in the arrangement of genetic material in rodents. *Journal of Mamm. 55*: 695-704, 1974.

MAYR, B.; RAB, P. & KALAT, M. NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in Cyprinidae of different ploidy level *Genetica, 69*: 111-118, 1986.

MEDINA, F.J.; SOLANILLA, E.L.; SÁNCHES-PINA, M.A.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E. & RISUEÑO, M.C. Cytological approach to the nucleolar functions detected by silver staining. *Chromosoma, 94*: 259-266, 1986.

MERRY, D.E.; PATHAK, S.; HSU, T.C. & BRINKLEY, B.R. Anti-kinetochore antibodies: use as probes for inactives centromeres. *Am. J. Hum. Genet., 37*: 425-430, 1985.

MIKELSAAR, A.V.; SCHMID, M.; KRONE, W.; SCHWARZACHER, H.G. & SCHNEDL, W. Frequency of Ag-Stained nucleolus organizer regions in the acrocentric chromosomes of man. *Hum. Genet.*, *37*: 73-77, 1977.

MILLER, Jr., O.L. The nucleolus chromosomes, and visualization of genetic activity. *J. Cell. Biol. 91 (3)*: 155-275, 1981.

MILLER, L. & BROWN, D.D. Variation in the activity of nucleolar organizers and their ribosomal gene content. *Chromosoma*, *28*: 430-444, 1969.

MILLER, D.A.; DEV, V.G.; TANTRAVAHI, R. & MILLER, O.J. Supression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Exp. Cell. Res.*. *101*: 235-243, 1976a.

MILLER, D.A.; TANTRAVAHI, R., DEV, V.G. & MILLER, O.J. Frequency of satellite association of human chromosomes is correlated with amount of Ag-staining of the nucleolus organizer region. *Am. J. Hum. Genet.*, *29*: 490-502, 1977.

MILLER, O.J.; MILLER, D.A.; DEV, V.G.; TANTRAVAHI, R. & CROCE, C.M. Expression of human and supression of mouse nucleolus organizer activity in mouse - human somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci*, USA, *73(12)*:4531-4535, 1976b.

MIRRE, C. & KNIBIEHLER, B. A re-evaluation of the relationships between the fibrillar centres and the nucleolus -organizing regions in reticulated nucleoli: ultrastructural organization, number and distribution of the fibrillar centres in the nucleolus of the mouse sertoli cell *J. Cell Sci.*, *55*: 247-259, 1982.

MIRRE, C. & KNIBIEHLER, B. - Quantitative ultrastructural analysis of fibrillar centers in the mouse: correlation of their number and volume with nucleolar organizer activity *Protoplasma, 121*: 120-128, 1984.

MIRRE, C. & STAHL, A. Peripheral RNA synthesis of fibrillar center in nucleoli of japanese quail oocytes and somatic cells. *J. Ultrastruct. Res., 64*: 377-387, 1978.

MIRRE, C.; HARTUNG, M. & STAHL, A. Association of ribosomal genes in the fibrillar center of the nucleolus. A factor influencing translocation and non disjunction in the human meiotic oocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci*, USA, *77*: 6017-6021 , 1980.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. & GALETTI, JR., P.M. Structure and variability of nucleolar organizer region in Paradontidae fish. *Can. J. Genet. Cytol., 26*: 564-568, 1984.

MORIELLE, E.; VARELLA-GARCIA, M. & TADDEI, V.A. - Regiões organizadoras do nucléolo (RONs) e evolução cariotípica nas subfamílias Phyllostominae e Glossophaginae (Chiroptera , Phyllostomidae). *Ci.* e *Cult., 38 (7)*: 895 (Suplemento), 1986a.

MORIELLE, E.; GOLONI, E.M.; VARELLA-GARCIA, M. & TADDEI, V.A.- Análise cariotípica em morcegos hematófagos (Chiroptera, Desmodontinae). *Ci.*e *Cult., 38(7):* 938 (Suplemento), 1986b.

MORIELLE, E.; GOLONI, E.M.; VARELLA-GARCIA, M. & TADDEI, V.A. Evolução cariotípica na subfamília Stenodermatinae (Chiroptera, Phyllostomidae), com base nos padrões de bandas 6, C e NOR. *Ci.* e *Cult., 39(7)* : 778 (Suplemento) , 1987a.

MORIELLE, E.; GOLONI, E.M.; VARELLA-GARCIA, M. & TADDEI, V.A. Análise cariotípica de *Eumops glaucinus* (Chiroptera, Molossidae). *Resumos do 14º Colóquio de Incentivos à Pesquisa*, São José do Rio Preto: 44, 1987b.

MURTY, U.V.V.S.; MITRA, A.B.; SHARMA, J.K. & LUTHRA, U.K. Nucleolar organizer regions in patients with precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. *Cancer Genet. Cytogenet, 18*: 275-279, 1985.

NANYA, S. Atividade organizadora nucleolar e bandamentos G e C em *Drosophila mulleri, D. arizonensis* e seus híbridos. Dissertação de Mestrado apresentada no IBILCE de São José do Rio Preto - UNESP, 1986.

NEVO, E. & BAR-EL, H. Hibridization and speciation in fossorial mole rats. *Evolution, 30*: 831-840, 1976.

NOWAK, R.M. & PARADISO, J.L. - Walker's mammals of the world. 4 ed. Baltimore and London, Johns Hophins Un. Press.,1300 p. 1v., 1983.

OBARA, Y.; TOMIYASU, T. & SAITOH , K. Chromosome studies in the japanese vespertilionid bats. II. G-banding pattern of *Pipistrellus abramus*.Temminck. *Proc. Japan. Acad., 52*: 383-386, 1976.

OCHS, R.L. & BUSCH, H . Further evidence that phosphoprotein C23(110 KD/pI 5,1) is the nucleolar silver staing protein. *Exp. Cell Res., 152*: 260-265, 1984.

OCHS, R.L.; LISCHWE, M.; O'LEARY, P. & BUSCH, H. Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis.*Exp. Cell Res., 146*: 139-149, 1983.

OHNO, S.; TRUJILLO, J1M.; KAPLAN, E.D. & KINOSITA, B. Nucleolus organizers in the causation of anomalies in man. *The Lancet 2*,: 123-126, 1961.

OLERT, J.; SAWATZKI, G.; KLING,H. & GEBAUER, J. Cytological and histochemical studies on the mechanism of the selective silver staining of nucleolus organizer regions (NORs). *Histochemistry, 60*: 91-99, 1979.

OLSON, M.O.J.; RIVERS, Z.M.; THOMPSON, B.A.; KAO, W.Y. & CASE, S.T. Interaction of nucleolar phosphoprotein C23 with cloned segments of rat ribosomal deoxyribonucleic acid. *Biochemistry, 22*: 3345-3351, 1983.

PARDUE, M.L. & HSU, T.C. Locations of 18S and 28S ribosomal genes in the chromosomes on the Indian Muntjac. *J. Cell Biol., 64*: 251-254, 1975.

PARDUE, M.L.; BROWN, D.D. & BIRNSTIEL, M.L. Location of the genes for 5S ribosomal RNA in *Xenopus laevis*. Chromosoma, *42*: 191-203, 1973.

PATHAK, S.; HSU, T.C. & ARRIGHI, F.E. Chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae). IV the role of heterocromatin in karyotypic evolution. *Cytogenet. Cell Genet., 12*:315-326, 1973a.

PATHAK, S.; HSU, T.C. & UTAKOJI, T. Relationships between patterns of chromosome banding and DNA synthetic sequences : a study on the chromosomes of the Seba's fruit bat, *Carollia perspicillata*. *Cytogenet. Cell Genet., 12*: 157-164, 1973b.

PATHAK, S.; VAN-TUINEN, P. & MERRY, D.E. Heterochromatin, synaptonemal complex, and NOR activity in the somatic and

germ cells of a male domestig dog, *Canis familiaris* (Mammalia, canidae). *Cytogenet. Cell Genet., 34*: 112-118, 1982.

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

PATTON, J.L. & GARDNER, A.L. Parallel evolution of multiple sex-chromosome systems in the phyllostomatid bats, *Carollia* and *Choeroniscus.Experientia, 27*: 105, 1971.

PERES, C.A. & SALDIVA, C.D. - *Planejamento de Experimentos.* 5º Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística. IME-USP, SP, 1982.

PFEIFLE, J.; BOLLER, K. & ANDERER, F.A. Phosphoprotein pp135 is an essential componente of the nucleolus organizer region (NOR). *Exp. Cell Res., 162*: 11-22, 1986.

PHILLIPS, R. & IHSSEN, P.E. Chromosome banding in salmonid fish: nucleolar organizer regions in *Salmo* and *Salvelinus*. *Can. J. Genet. Cytol., 27*: 433-440, 1985

PIJNACKER, L.P.; FERWERDA, M.A. ; PUITE, K.J. & ROEST, S. Elimination of *Solanun phureja* nucleolar chromosomes in *S. tuberosum* + *S. phureja*. somatic hybrids. *Theor. Appl. Genet., 73*: 878-882, 1987.

POPP, W. & WACHTLER, F. Changes in nucleolar structure number and size in cellular activation and inactivation. *Cell Tissue Res., 234*: 377-388, 1983.

RAMAN, R. & SPERLING, K. Patterns of silver staining on NORs of prematurely condensed muntajac chromosomes following RNA inhibition. *Exp. Cell Res., 135*: 373-378, 1981.

RITOSSA, F.M. & SPIEGELMAN, S. Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, *53*:737-745, 1965.

RITOSSA, F.M.; ATWOOD, K.C. & SPIELGELMAN, S. A molecular explanation of the bobbed mutants of *Drosophila* as partial dificiences of "ribosomal" DNA. *Genetics, 54*: 819-834,1966a.

RITOSSA, F.M.; ATWOOD, K.C.; LINDSLY, D.L. & SPIEGELMAN, S. On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA. *Natl. Cancer. Inst. Monogr., 23*: 449-472, 1966b.

ROBINSON, T.J. Comparative chromosome studies in the family Leporidae (Lagomorpha, Mammalia). *Cytogenet. Cell Genet.* , *28*: 64-70, 1980.

ROBINSON, T.J.; ELDER, F.F.B. & CHAPMAN, J.A. Evolution of chromosomal variation in cottontails, genus *Sylvilagus* (Mammalia: Lagomorpha): *S. aquaticus, S. floridanus* and *S. transitionalis*. *Cytogenet. Cell Genet., 35*: 216-222, 1983.

RUIZ, I.R.G. Organizadores nucleolares e evolução cariotípica em anfíbios poliplóides. *Ci. Cult., 34*: (4). 470-473,1982.

RUIZ, I.R.G.; SOMA, M. & BEÇAK, W, Nucleolar organizer regions and constitutive heterocromatin in polyploid species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). *Cytogenet. Cell Genet. 29*: 84-98, 1981.

RUMPLER, Y.; COUTURIER, J.; WARTER, S. & DUTRILLAUX, B. Chromosomal evolution in malagasy lemurs. VII. phylogenic relationships between. *Propithecus, Avahi* (Indridae),

Microcebus (Cheirogaleidae), and *Lemur* (Lemuridae). *Cytogenet. Cell Genet.*, *36*: 542-546, 1983.

SASAKI, M.; NISHIDA, C.; KODAMA, Y. Characterization of silver stained nucleolus organizer regions (Ag-NORs) in 16 inbred strains of the norway rat, *Rattus norvegicus*. *Cytogenet. Cell Genet.*, *41*: 83-88, 1986.

SAZIMA; I. & UIEDA, W. Feeding behavior of the white winged vampire bat, *Diaemus youngii*, on poultry. *J. Mamm.*, *61*:102-104, 1980.

SCHAFER, V. & KUNZ, W. Two separated nucleolus organizer on the *Drosophila hydei* Y chromosome. *Molec. Gen. Genet.*, *137*: 365-368, 1975.

SCHMID, M. Chromosomes banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma*, *87*: 327-344, 1982.

SCHMID, M.; VOGEL, W.; KRONE, E. Attraction between centric heterochromatin of human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* *15*: 66-80, 1975.

SCHMID, M.; GRUNERT, D.; HAAF, T. & ENGEL, W. A direct demonstration of somatically paired heterochromatin of human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, *36*: 554-561, 1983.

SCHMID, M.; HAAF, T.; WEIS, H. & SCHEMPP, W. Chromosomal homologies in hamster species of the genus *Phodopus* (Rodentia, Cricetinae). *Cytogenet. Cell Genet.*, *43*: 168-173, 1986.

SCHMID, M.; LÖSER, C.; SCHMIDTKE, I. & ENGEL, W. Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. *Chromosoma*, *86*: 149-179, 1982.

SCHWARZACHER, H.G. & WACHTLER, F. Nucleolus organizer regions and nucleoli. *Hum. Genet., 63*: 89-99, 1983.

SIGMUND, J.; SCHWARZACHER, H.G. & MIKELSAAR, A.V. Satellite association frequency and number of nucleoli depend on cell cycle duration and NOR-activity. *Hum. Genet., 50*: 81-91, 1979.

SINCLAIR, J.H.; CARROLL, C.R. & HUMPHREY, R.R. Variation in rDNA redundancy level and nucleolar organizer length in normal and variant lines of the Mexican axolotl. *J. Cell. Sci., 15*: 239-257, 1974.

SITES, J.W. Jr.; BICKHAM, J.W. & HAIDUK, M.W. Conservative chromosomal change in the bat family Mormoopidae. *Can. J. Genet., Cytol., 23*: 459-467, 1981.

SMITH, J.D. Chiropteran evolution: In *Biology of Bats of New World Family Phyllostomatidae*, Part. I. *Spec. Publ. Mus. Texas Tech Univ.*, Lublock, *10*: 49-69, 1976.

SOLA, L.; ARCANGELI, R. & CATAUDELLA, S. Nucleolus organizer chromosomes in a teleostean species of tetraploid origin, *Cyprinus carpio*. *Cytogenet. Cell Genet., 42*: 183-186, 1986.

SOUZA, M.J. Caracterização cromossômica em oito espécies de roedores brasileiros das famílias Cricetidae e Echimydae. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, SP, 1981.

SOUZA, M.J. Regiões organizadoras do nucléolo em 6 espécies de morcegos da família Phyllostomatidae. *Ci. e Cult., 37(7)*: 739-740 (Suplemento), 1985.

SOUZA, M.J. & CORREA, S.I.C. Estudo das RONs em exemplares de *Artibeus* coletados em Pernambuco (Chiroptera, Phyllostomatidae). *Ci.Cult., 36 (7)*: 850 (Suplemento), 1984.

SOUZA, M. J. & YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromossomal variability of sex chromosomes and NOR's in *Trichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). *Cytogenet. Cell Genet., 33*: 197-203,1982.

SOUZA, M.J. & YONENAGA-YASSUDA, Y. G-and C-band patterns and nucleolus organizer regions in somatic chromosomes of *Clyomys laticeps laticeps* (Rodentia, Echimyidae). *Experientia, 40*: 96-97, 1984.

SOZANSKY, O.A. & TEREKHOV, S.M. Clonal analysis of intercellular variability of nucleolar organizer activity in human chromosomes. *Bul. Exp. Biol. Med. Engl.* TR, *97*: 638-642, 1984.

SOZANSKY, O.A.; ZAKHAROV, A.F. & TEREKHOV, S.M. Intercellular NOR-Ag- variability in man. II. Search for determining factors, clonal analysis. *Hum. Genet., 69*: 151-156, 1985.

SPEAR, B.B. & GALL, J.G. Independent control of ribossomal gene replication in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, *70*: 1359-1363, 1973.

SPEIRS, J. & BIRNSTIEL, M. Arrangement of the 5,8S RNA cistrons in the genome of *Xenopus laevis. J. Mol. Biol., 87:* 237-256, 1974.

STAHL, A.; HARTUNG, M.; VAGNER-CAPODANO, A.M. & FOUET, C. Chromosomal constitution of nucleolus-associated chromatin in man. *Hum. Genet. 35*: 27-34, 1976.

STAHL, A.; HARTUNG, M.; DEVICTOR, M. & BERGÉ-LEFRANC, J.L. The association of the nucleolus and th e short arm of acrocentric

chromosomes with the XY pair in human spermatocytes: its possible role in facilitating sex-chromosome acrocentric translocations. *Hum. Genet., 68*: 173-180, 1984.

STAHL, A.; LUCIANI, J.M.; DEVICTOR, M.; CAPODANO, A.M. & GAGNÉ, R. - Constitutive heterochromatin and micronucleoli in the human oocyte at the diplotene stage. *Humangenetik, 26*:315-327, 1975.

STAHL, A.; LUCIANI; J.M.; HARTUNG, M.; DEVICTOR, M.; BERGÉ-LEFRANC, J.L. & GUICHAOUA, M. Structural basic for robertsonian translocations in man: association of ribosomal genes in the nucleolar fibrillar center in meiotic spermatocytes and oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, *80*: 5946-5950, 1983.

STEFFENSEN, D.M. & DUFFEY, P.: Localisation of 5S ribosomal RNA genes on human chromosome 1. *Nature, 252*: 741-743, 1974.

STOCK, A.D. Chromosome banding pattern homology and its phylogenetic implications in the bat genera *Carollia* and *Choeroniscus*. *Cytogenet. Cell Genet., 14*: 34-41, 1975.

STOCK, A.D. Chromosomal homologies and philogenetic relationships of the vespertilionid bat genera *Euderma, Idionycteres* and *Plecotus*. *Cytogenet. Cell Genet., 35*: 136-140, 1983.

SUMNER, A.T. A sample technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res., 75*: 304-306, 1972.

SYLVESTER, J.E.; WHITEMAN, N.A.; PODOISKY, R.; POZSGAY, J.M.; RESPESSj J. & SCHMICKEL, R.D. The human ribosomal RNA genes structure and organization of the complete repeating unit. *Hum. Genet, 73*: 193-198, 1986.

TADDEI, V.A. Phyllostomidae da Região Norte Ocidental do Estado de São Paulo. Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia , Ciências e Letras de São José do Rio Preto, SP, 1973.

TADDEI, V.A. Morcegos. Algumas considerações sistemáticas e biológicas. *Bol. Tec. CATI*, Campinas, *172*, 31p, 1983.

TOLEDO, L.A. Estudos citogenéticos em morcegos brasileiros (Mammalia: Chiroptera). Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, SP, 1973.

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.

TUCKER, P.K. Sex chromosome- autosome translocations in the leaf-nosed bats, family Phyllostomidae. I: mitotic analyses of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae. *Cytogenet. Cell Genet.*, *43*: 19-27, 1986.

VAN DER MERWE, M. Bats as vector of rabies. *South African J. Science*, *78*: 421-422, 1982.

VAGNER-CAPODANO, A.M.; HARTUNG, M. & STAHL, A. Nucleolus, nucleolar chromosomes and nucleolus associated chromatin from early diplotene to dictyotene in the human oocyte. *Hum. Genet.* *75*: 140-146, 1987.

VARELLA-GARCIA, M. & TADDEI, V.A. Análise cariotípica em *Chiroderma doriae* (Chiroptera, Phyllostomidae). *Ci. e Cult.*, *37 (7)*:790 (Suplemento), 1985.

VARELLA-GARCIA, M. & TADDEI, V.A. Citogenética de quirópteros métodos e aplicações. No prelo, 1987.

VARLEY, J.M. Patterns of silver staining of human chromosomes. *Chromosoma, 61*: 207-214, 1977.

VOLLETH, M. Chromosomal homologies of the genera *Vespertilio, Plecotus* and *Barbastella* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Genetica, 66*: 231-236, 1985.

WACHTLER, F.; ELLINGER, A. & SCHWARZACHER, H.G. Nucleolar changes in human phytohaemagglutinèn-stimulated lymphocytes. *Cell Tissue Res., 213*: 351-360, 1980.

WACHTLER, F.; SCHWARZACHER, H.G. & ELLINGER, A. The influence of the cell cycle on structure and number of nucleoli in cultured human lymphocytes. *Cell Tissue. Res., 225*: 155-163 , 1982.

WALLACE, H. & BIRNSTIEL; M.L. Ribossomal cistrons and the nucleolar organizer. *Biochem. Biophys. Acta, 114*: 296-310, 1966.

WARBURTON, D. & HENDERSON, A.S. Sequencial silver staining and hybridization in situ on nucleolus organizing regions in human cells. *Cytogenet. Cell Genet., 24*: 168-175, 1979.

WARBURTON, D.; ATWOOD, K.C. & HENDERSON, A.S. Variation in the number of genes for rRNA among human acrocentric chromosomes: correlation with frequency of satellite association. *Cytogenet. Cell Genet., 17*: 221-230, 1976.

WARD, O.G. & COLE, C.J. Nucleolar dominance in diploide and triploide parthogenetic lizards of hybrid origin. *Cytogenet. Cell Genet., 42*: 177-182, 1986.

WARNER, J.R. Distribution of newly formed ribosomal proteins in HeLa Cell fractions. *J. Cell Biol., 80*: 767-772, 1979.

WARNER, J.W.; PATTON, J.L.; GARDNER, A.L. & BAKER, R.J. Karyotypic analyses of twenty-one species of molossid bats (Molossidae: Chiroptera). *Can. J. Genet., Cytol., 16*: 165-176, 1974.

WELLAUER, P.K. & DAWID, I.B. Isolation and sequence organization of human ribosomal DNA. *J. Mol. Biol., 128*: 289-303, 1979.

WELLAUER, P.K.; DAWID, I.B.; BROWN, D.D. & REEDER, R.H. The molecular basis for length heterogeneity in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *J. Mol. Biol. 105*: 461-486, 1976.

WELTENS, R.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HENS, L.; DEFRISE-GUSSENHOVEN, & SUSANNE, C. NOR variability in twins. *Acta. Genet. Med. Gamellol, 34*: 141-151, 1985.

WHITE, M.J.D. Animal cytology and evolution, 3 rd Ed. (Cambridge University Press. Cambridge), 1973.

WHITEHOUSE, D.B.; EVANS, E.P.; PUTT, W. & GEORGE, A.M. Karyotypes of the east african common zebra *Equus-burchelli:* centric fission in a pedigree. *Cytogenet. Cell Genet., 38:* 171-175, 1984.

WINKING, H.; NIELSEN, K. & GROPP, A. Variable positions of NORs in *Mus musculus*. *Cytogenet. Cell Genet., 26*: 158-164, 1980.

WURSTER, D. & BENIRSCHKE, K. Indian muntjac, *Muntiacus muntjak:* a deer with a low diploid chromosome number. *Science, 168:* 1364-1366, 1970.

WYANDT, H.E. & IORIO, R.J. Human Y-chromatin. III. The nucleolus. *Exp. Cell Res., 81*: 468-473, 1973.

YONENAGA, Y. Estudos cromossômicos em espécies de Chiroptera. *Ci. e Cult., 20*: 172, 1968.

YONENAGA, Y. Chromosomal polymorphism in the rodent. *Akodon arviculoides* (2n = 14) resulting from two pericentric inversions. *Cytogenet. Cell Genet., 11*: 488-499, 1972.

YONENAGA-YASSUDA , Y. New karyotypes and somatic and germ cell banding in *Akodon arviculoides* (Rodentia, Cricetidae) *Cytogenet. Cell Genet., 23*: 221-230, 1979.

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

YONENAGA-YASSUDA, Y.; PRADO, R.C. & MELLO, D. Supernumerary chromosomes in *Holochilus brasiliensis* and comparative cytogenetic analysis with *Nectomys squamipes* (Cricetidae, Rodentia). *Rev. Bras. Genet., X:* 209-220, 1987a.

YONENAGA-YASSUDA; Y.; PEREIRA, L.A.; ARMADA, J.L. & L'ABBATE,M. Chromosomal polymorphism in *Akodon reinhardti* Langguth, 1975 (Rodentia, Cricetidae). *Rev. Bras. Genet., X*: 199-208, 1987b.

YONENAGA-YASSUDA, Y.; ASSIS, M.F.L.; KASAHARA, S.; L'ABBATE, M. SOUZA, M.J. Nucleolar organizer regions in *Akodon arviculoides* (Cricetidae, Rodentia): evidence for the activity of

rDNA genes in both X chromosomes of females. *Cytogenet. Cell Genet.*, *35*: 143-147, 1983.

YONG, H.S. Robertsonian translocation, pericentric inversion and heterochromatin block in the evolution of the tailless fruit bat. *Experientia*, *40*: 875-876, 1984.

YONG, H.S. & DHALIWAL, S.S. Chromosomes of the fruit-bat subfamily Macroglossinae from Peninsular Malaysia. *Cytologia*, *41*: 85-89, 1976.

YOSIDA, T.H. Frequencies of chromosome polymorphism in pairs nº 1,9 and 13 in three geographical variants of black rats, *Rattus rattus*. *Chromosoma*, *60*: 391- 398 , 1977.

YOSIDA , T.H., KATO, H.; TSUCHIYA, K.; MORIWAKI, K.; OCHIAI, Y. & MONTY, J. Mauritus type black rats with peculiar karyotypes derived from robertsonian fission of small metacentrics. *Chromosoma*, *75*: 51-62, 1979.

YUNIS, J.J. & YASMINEH, W.G. Heterocromatin, satellite DNA,and cell function. *Science*, *174*: 1200-1209, 1971.

ZAKHAROV, A.F.; DAVUDOV, A.Z.; BENJUSH, V.A. & EGOLINA, N.A. Genetic determination of NOR activity in human lymphocytes from twins. *Hum. Genet.*, *60*: 24-29, 1982.

ZAPECINA, O.; NOVAK, J.; SMETANA, K.; SCHWARZACHER, H .G. & WACHTLER, F. Studies on nucleolar silver stained proteins in nucleoli of human normal, stimulated and leukemic lymphocytes. *Mikroskopie*, *41*: 278-284, 1984.


cm 1 2 3 4 5 6 7
unesp
11 12 13 14 15 16 17 18