

ANÁLISE DO COMPORTAMENTO MEIÓTICO DE *ARTIBEUS* SPP. (*Chiroptera: phyllostomidae*)

Érica Martinha Silva de SOUZA¹; Maria Claudia GROSS²; Eliana FELDBERG³

¹Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA; ²Co-orientadora ICB/UFAM; ³Orientadora Laboratório de Genética Animal/INPA

1. Introdução

No Brasil, os morcegos estão inseridos na subordem Microchiroptera, distribuídos em nove famílias e 64 gêneros (Wilson e Reeder 2005). A família Phyllostomidae é a mais diversa, na qual a subfamília Stenodermatinae se destaca por possuir um grande número de espécies e problemas em sua taxonomia, principalmente entre as espécies de grande porte, a qual abriga *Artibeus* Leach 1821 (Reis *et al.* 2007; Dias e Peracchi 2008). Estudos citogenéticos em espécies de *Artibeus* têm revelado número diploide diferente entre machos e fêmeas, caracterizando um sistema sexual múltiplo do tipo XX/X₁Y₂ (Baker e Hsu 1970; Reis *et al.* 2007). O evento que levou o surgimento desse sistema cromossômico sexual ainda não está completamente esclarecido. Alguns autores sugerem que sua origem foi a partir de um sistema sexual do tipo XX/XY e o Y₂ teria surgido a partir de uma translocação envolvendo um autossomo e o cromossomo X, entretanto essa proposta não indica qual autossomo participou desta translocação (Tucker e Bickham 1986). A análise da distribuição de heterocromatina constitutiva tem se mostrado uma boa ferramenta para diferenciação citogenética das espécies de *Artibeus*, pois cada espécie possui um padrão (Morielle e Varella-Garcia 1988; Varella-Garcia *et al.* 1989; Souza e Araujo 1990; Souza *et al.* 2010). Ainda, a comparação dos padrões cariotípicos já descritos para *Artibeus* spp. evidencia que em coloração convencional os cariótipos são muito semelhantes (Souza *et al.* 2010). Deste modo, dada a importância dos morcegos na dispersão de sementes, na recuperação de áreas degradadas, por meio do guano ou por deslocamento de frutos (Bianconi *et al.* 2004; Oprea *et al.* 2007) ou ainda, o perigo que muitas espécies representam para a sociedade na transmissão de doenças (Reis *et al.* 2007), um estudo da meiose de espécies do gênero *Artibeus* que ocorrem na região de Manaus, AM, poderá contribuir para uma melhor caracterização destas espécies e para o entendimento dos rearranjos ocorridos na evolução dos mesmos.

2. Material e Métodos

Foram analisados onze indivíduos machos pertencentes ao gênero *Artibeus*, sendo quatro identificados como *A. lituratus* e sete como *A. obscurus*, coletados nos fragmentos florestais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (03°05'55,5"S / 59°59'0,79"W) e Sítio Bons Amigos (BR 174 – KM 14, 02° 50' 37"S / 60° 03' 58"W). Os cromossomos mitóticos foram obtidos pelo método *in vivo* segundo Ford e Harmerton (1956) e classificados conforme Levan *et al.* (1964). A meiose seguiu o método *in vivo* segundo Lee e Elder (1980), modificada por Varella-Garcia *et al.* (1989). A interpretação das fases da meiose seguiu John (1990). As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram detectadas por meio do tratamento com nitrato de Prata (Howell e Black 1980) e o padrão da heterocromatina constitutiva (banda C) por meio da ação do hidróxido de bário (Sumner 1972).

3. Resultados e discussão

A análise mitótica foi realizada para se confirmar o número diploide (2n) dos espécimes. Os onze indivíduos machos apresentaram o número diploide igual a 31 cromossomos. *A. lituratus* e *A. obscurus* possuem sistema múltiplo sexual do tipo XX/X₁Y₂ o que representa uma diferença no número diploide entre machos e fêmeas. O cariótipo de ambas espécies consistiu de 11 pares de cromossomos metacêntricos e três pares de subtelocêntricos (22m+6st+XX/X₁Y₂) e o número de braços (NF) igual a 56, sendo o X submetacêntrico médio, Y₁ puntiforme e o Y₂ um acrocêntrico pequeno (Fig. 1). Durante a meiose o comportamento dos cromossomos foi semelhante nas duas espécies. Em coloração convencional pode-se notar o início da condensação cromossômica no leptóteno (Fig. 2a) e em zigóteno foram evidenciados cromômeros (Fig. 2b). No paquíteno foi possível determinar a presença de 15 estruturas, sugerindo a presença de 14 bivalentes e um trivalente sexual

($2n=14II+XY_1Y_2$) (Fig. 2c). Em diplóteno inicial verificaram-se quiasmas em todos os cromossomos autossômicos, que são formados na fase anterior mas só são visualizados nessa fase, e o trivalente sexual (Fig. 2d). Em metáfase I foram visualizados os bivalentes, sendo a maioria deles com dois quiasmas e os cromossomos sexuais formando um trivalente, provavelmente aquiasmáticos. Estes têm uma conformação semelhante a uma flecha na qual a sua ponta corresponde ao Y_2 e a extremidade ao Y_1 (Fig. 2e). Em metáfase II dois números haploides foram encontrados, sendo um proveniente do pólo com dois Y ($n=14 + Y_1Y_2$) (Fig. 2f) e outro portador do X ($n=14+X$) (Fig. 2g). Em metáfase espermatogonial foram observados 31 cromossomos, corroborando os dados mitóticos (Fig. 2h).

Na impregnação por nitrato de prata pudemos visualizar as regiões organizadoras de nucléolos principalmente durante o zigóteno (Fig. 2i), além de observar essas regiões nos núcleos interfásicos ora associadas formando uma única marcação e ora desassociadas com marcações espalhadas no núcleo (Fig. 2j, k). Com relação às regiões de heterocromatina foi possível ver a estrutura do trivalente quase que completamente heterocromático em leptóteno (Fig. 2l, m), sendo possível checar também as RONS positivas para banda C nos núcleos (Fig. 2 n). Para a fase do paquíteno foi possível visualizar claramente a estrutura do trivalente, comprovando que os cromossomos Y se pareiam com o X, via associação de heterocromatina (Fig. 2o). Na figura 2p, encontra-se em tamanho aumentado o trivalente em metáfase I e seu respectivo esquema.

Estudos meióticos já realizados para alguns morcegos têm mostrado a ocorrência tanto de sistemas simples quanto de sistema múltiplos de determinação sexual (Baker 1967; Morielle e Varella-Garcia 1988; Souza e Araujo 1990; Silva 2000). Entre as espécies de *Artibeus* encontram-se as duas formas de sistema sexual, além de ocorrerem variações no tamanho entre os cromossomos Y (Hsu *et al.* 1968; Rusht 1970; Tucker e Bickham 1986; Noronha *et al.* 2009). Em *A. obscurus* e *A. lituratus* foi possível verificar a diferença no tamanho do Y_2 , porém o seu comportamento durante a meiose foi o mesmo. A diferença no tamanho desses cromossomos se deu provavelmente no momento em que ocorreu a formação desse sistema múltiplo (Hsu *et al.* 1968).

4. Conclusão

O padrão de emparelhamento dos cromossomos meióticos corrobora a existência do sistema de cromossomos sexuais do tipo XY_1Y_2 nos machos das duas espécies e indica que estes não efetuam trocas de material genético, uma vez que são aquiasmáticos, estando associados por regiões de heterocromatina.

5. Referências

- Bianconi, G.V.; Mikich, S.B.; Pedro, W.A. 2004. Diversidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em remanescentes florestais do município de Fênix, noroeste do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 21 (4): 943-954 (in Portuguese).
- Baker, R.J. 1967. Karyotypes of bats of the family Phyllostomidae and their taxonomic implication. *The Southwestern Naturalist*, 12 (4): 407-428 (in English).
- Baker, R.J.; Hsu, T.C. 1970. Further studies on the sex chromosome systems of the American leaf-nosed bats (Chiroptera, Phyllostomidae). *Cytogenetics*, 9: 131-138 (in English).
- Dias, D.; Peracchi, A.L. 2008. Quirópteros da Reserva Biológica do Tinguá, estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (Mammalia: Chiroptera). *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(2): 333-369 (in Portuguese, with abstract in English).
- Ford, C.; Hamerton, J. 1956. A colchicines hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technology*, 31: 247-251.
- Howell, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer region with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Hsu, T.C.; Baker, R.J.; Utakoji, T. 1968. The multiple sex chromosome system of American leaf-nosed bats (Chiroptera, Phyllostomidae). *Cytogenetics*, 7: 27-38 (in English).

- John, B. 1990. Meiosis. Cambridge University Press: New York. 396 pp (in English).
- Lee, R.J.; Elder, F.F.B. 1980. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 26: 36-40 (in English).
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220 (in English).
- Morielle, E.; Varella-Garcia, M. 1988. Variability of nucleolus organizer regions in phyllostomid bats. *Revista Brasileira de Genética*, 11(4): 853-871 (in English).
- Noronha, R.C.R.; Nagamachi, C.Y.; O'Brien, P.C.; Ferguson-Smith, M.A.; Pieczarka, J.C. 2009. Neo-XY body: na analysis of XY₁Y₂ meiotic behavior in *Carollia* (Chiroptera, Phyllostomidae) by chromosome painting. *Cytogenetic and Genome Research*, 124: 37-43 (in English).
- Oprea, M.; Brito, D.; Vieira, T.B; Mendes, P.; Lopes, S.R.; Fonseca, R. M.; Coutinho, R.Z.; Ditchfield, A.D. 2007. A note on diet and foraging behavior of *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae) in an urban park in southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, 7 (2): 298- 300 (in English).
- Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, L.P. 2007. *Morcegos do Brasil*. Ed. Universidade Estadual de Londrina. 253pp (in Portuguese).
- Rusht, A.R. 1970. Cytotaxonomy and chromosomal evolution of the bats (Mammalia-Chiroptera). *Ann. Génét. Sél. anim.* 2 (4): 457-469 (in English).
- Silva, A.M. 2000. *Estudo citogenético e evolução cromossômica em seis espécies amazônicas da subfamília Stenodermatinae (Chiroptera: Phyllostomidae)*. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. 124pp (in Portuguese).
- Souza, M.J.; Araújo, M.C.P. 1990. Conservative pattern of the G-bands and diversity of C-banding patterns and NORs in Stenodermatinae (Chiroptera-Phyllostomatidae). *Revista Brasileira de Genética*, 13(2): 255-268 (in English).
- Souza, E.M.S.; Gross, M.C.; Feldberg, E. 2010. Citogenética clássica e molecular em *Artibeus* sp. (Chiroptera: Phyllostomidae) da cidade de Manaus-AM. Anais da XIV Jornada de Iniciação Científica PIBIC CNPq/ FAPEAM/ INPA: CD (in Portuguese).
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Tucker, P.K.; Bickham, J.W. 1986. Sex chromosome-autosome translocation in the leaf nosed bats. II. Meiotic analyses of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae. *Cytogenetic Cell Genetic*, 43: 27-28 (in English).
- Varella-Garcia, M.; Morielle-Versute, E.; Tadei, V.A. 1989. A survey of cytogenetic data on brazilian bats. *Revista Brasileira de Genética*, 12: 761-793.
- Wilson, D.E.; Reeder, D.M. 2005. Mammal Species of the World. *Johns Hopkins University Press*. 2142 pp (in English).

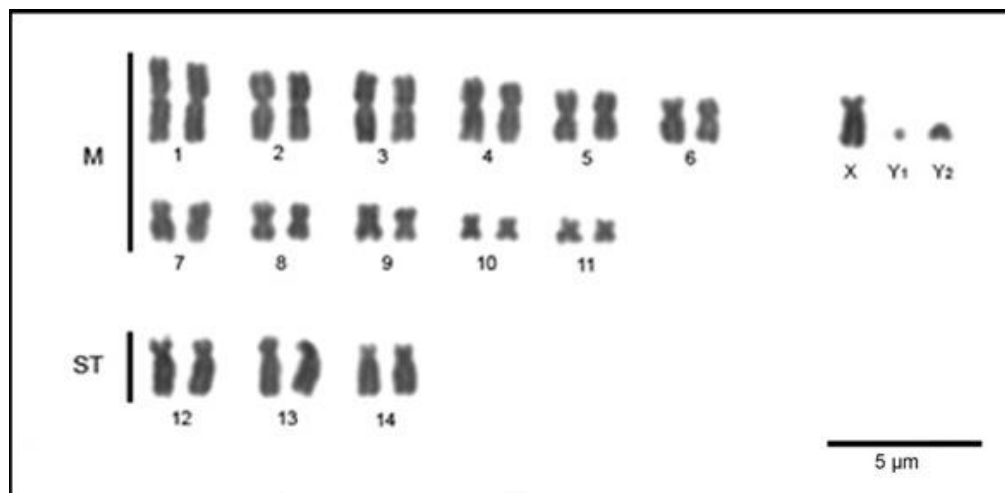


Figura 1 - Cariótipo de *Artibeus obscurus*, com $2n=31$ cromossomos.

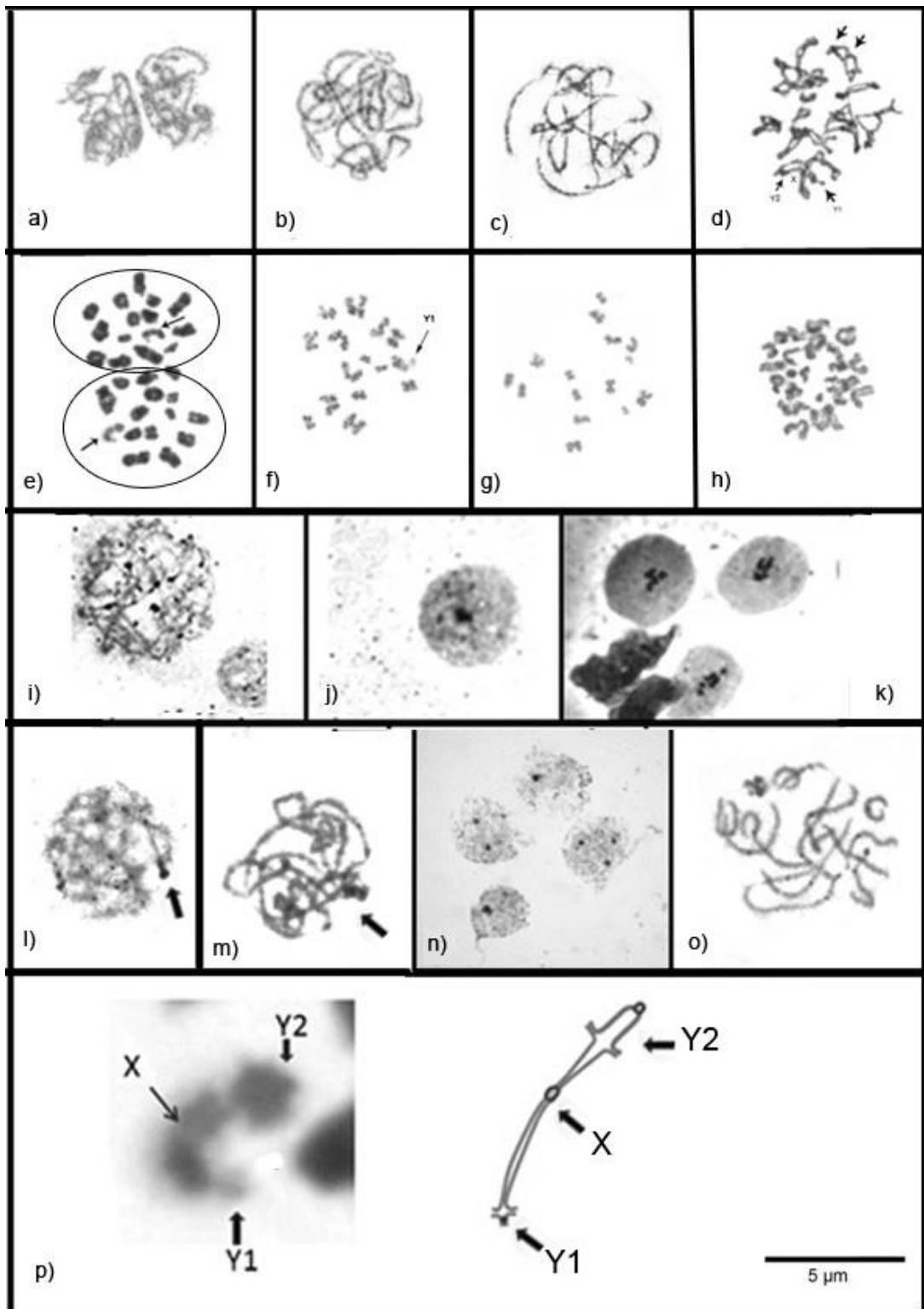


Figura 2 - Figuras meióticas de *Artibeus* spp. (a) Leptóteno; (b) Zigóteno evidenciando os cromômeros; (c) Paquíteno com 15 elementos, sugerindo a presença de 14 bivalentes e um trivalente sexual; (d) Diplótenu, evidenciando os quiasmas; (e) Metáfase I com $2n=14II+XY_1Y_2$ (setas); (f) Metáfase II com $n=14$ cromossomos+ Y_1Y_2 , estando o Y_1 evidenciado pela seta (menor cromossomo do complemento, Y_2 não identificado); (g) Metáfase II com $n=14$ cromossomos+ X ; (h) Metáfase espermatogonial com $2n=31$ cromossomos. Impregnação por $AgNO_3$: (i) Leptóteno; (j) Núcleo interfásico com marcação concentrada; (k) Núcleo interfásico com marcações dispersas. Bandeamento C: (l) Leptóteno com destaque para o trivalente heteropicnótico; (m) Leptóteno com

destaque para o trivalente heteropicnótico; (n) Núcleos interfásicos mostrando RON positiva para banda C; (o) Paquíteno, seta indicando o trivalente; (p) Trivalente em MI em maior aumento e seu esquema.