



XII. CITOGENETICA DE QUIROPTEROS EN LA PENINSULA IBERICA

Gonzalo Pérez-Suárez, José María Reina, Jacinto Navlet, Oscar de Paz y Emilio José López-Caballero

INTRODUCCION

Las características morfológicas y numéricas del conjunto de cromosomas (cariotipo) presentes en las células de un individuo constituyen una de las propiedades básicas de la biología de cada organismo.

Los estudios citogenéticos en quirópteros son esporádicos hasta mediados del presente siglo (MAKINO, 1948; MATHEY y BOVEY, 1948; BOVEY, 1949). Pero es a partir de la década de los cincuenta y coincidiendo con el desarrollo y puesta a punto de nuevas técnicas (uso de cultivos celulares, choque hipotónico y utilización de colchicina como inhibidor mitótico) cuando se produce un notable incremento en la investigación citogenética aplicada a mamíferos y vertebrados en general.

Una figura señera en la investigación cariológica fue el profesor R. Matthey, que a lo largo de dos décadas asentó los fundamentos de la cariología descriptiva y comparada en mamíferos. La información correspondiente a este período se ha recogido en diversas monografías (CHIARELLI Y CAPANNA, 1973; MATTHEY, 1973). Además, a finales de los sesenta los estudios citogenéticos recibieron un nuevo impulso con la aparición de nuevas técnicas (CASPERSON *et al.*, 1968) que permitieron la identificación diferencial y selectiva de los cromosomas profásicos y metafásicos (fases de la división nuclear o mitosis). Estos procedimientos inducen la aparición de bandas o marcas en los cromosomas que facilitan no sólo el reconocimiento de cromosomas homólogos, sino también modificaciones cromosómicas tales como duplicaciones, inversiones y translocaciones. Estos cambios son de gran utilidad cuando se intentan establecer relaciones filogenéticas interespecíficas, aunque el problema de la evolución, por su complejidad, trasciende el marco de la cariología y debe ser abordado desde distintos frentes: ecológico, genético, bioquímico, citológico, morfológico y paleontológico.

En todas las especies de quirópteros europeos se han realizado investigaciones descriptivas de sus respectivos cariotipos (CAPANNA y CIVITELLI, 1970; ZIMA y KRAL, 1984; VOLLETH, 1987). Asimismo, la investigación comparada, gracias a la técnica de tinción diferencial, ha proporcionado un gran acúmulo de información. Sin embargo, sería conveniente resumir los resultados de los estudios citogenéticos realizados sobre especies europeas de representación ibérica y evaluar su significado para comprender la situación taxonómica y la estructura interna de los diversos taxones. Nuestro objetivo es proporcionar una información básica sobre el conocimiento cariológico de las especies ibéricas de murciélagos basada en una amplia revisión bibliográfica. Igualmente se pretende exponer la metodología de uso más frecuente en los estudios cromosómicos de los murciélagos, al tiempo que se aportan los resultados derivados de varios años de investigación cariológica en España, que incluye información todavía inédita.

CONCEPTOS BASICOS

Consideramos necesario explicar diversos conceptos que permitan a personas no especializadas en la investigación cariológica obtener un mejor conocimiento de la información que se proporciona en los siguientes apartados.

CARIOTIPO

El cariotipo es el conjunto de características morfológicas de los cromosomas de células somáticas, ordenados por pares de homólogos. Los cariotipos se describen utilizando el número diploide de cromosomas ($2n$), número fundamental autosómico (NFa) o número de brazos de los cromosomas autosómicos (cromosomas no sexuales), y la clasificación de los cromosomas en grupo según la posición del centrómero. De esta forma los cromosomas se han determinado como acrocéntricos (A), telocéntricos (T), subtelocéntricos (ST), metacéntricos (M) y submetacéntricos (SM). También los cromosomas se han descrito como puntuales, pequeños, medianos o grandes según tamaño relativo, aunque estas expresiones son arbitrarias y se refieren al conjunto de cromosomas de cada individuo en cuestión.

MUTACIONES CROMOSÓMICAS

Existe una gran variedad entre los cariotipos de las especies actuales de mamíferos, lo cual significa que los procesos de diversificación evolutiva van acompañados de alteraciones morfológicas en los cromosomas. Los cambios más importantes en la evolución de los cariotipos son varios tipos de inversiones y translocaciones que afectan a los autosomas y cromosomas sexuales.

Inversiones pericéntricas: son giros de 180 grados de fragmentos cromosómicos que incluyen el centrómero. Según el tamaño afectado y la situación del centrómero un cromosoma metacéntrico puede convertirse en acrocentrico o viceversa. Normalmente, estas inversiones pueden inducir a una reducción de la fertilidad. No obstante, son muy comunes en los mamíferos.

Inversiones paracéntricas: son giros de 180 grados de fragmentos cromosómicos, pero que no incluyen al centrómero. Tanto las inversiones pericéntricas, que modifican la morfología cromosómica, como las paracéntricas, que no lo hacen, sólo pueden detectarse con la ayuda de las técnicas de tinción diferencial, especialmente bandeos G y R.

Translocaciones: las translocaciones recíprocas incluyen el intercambio de segmentos cromosómicos entre dos cromosomas, mientras que en las translocaciones no recíprocas se transfiere un segmento de cromosoma a otro. En general, las translocaciones son raras en las poblaciones de mamíferos, pero se ha comprobado, por comparación de cromosomas bandeados de especies afines, que actúan como vía para la diversificación interespecífica de los cariotipos (DUTRILLAUX *et al.*, 1975; GAMPERL, 1982).

Fusiones y fisiones: las fusiones cromosómicas son un tipo especial de translocaciones en las que dos cromosomas se unen por el centrómero o por la región del telómero. Según el punto de unión las fusiones pueden ser céntricas, telómero-céntricas y teloméricas. Las fisiones o disociaciones, por el contrario, son divisiones de un cromosoma en dos. Las fusiones y fisiones, llamadas translocaciones Robertsonianas, son mutaciones que modifican severamente el número diploide y el número fundamental de las especies y constituyen uno de los mecanismos más importantes en la evolución de los mamíferos. Sin embargo, los procesos de fusión parecen más frecuentes que los de fisión y se han citado en numerosas especies de mamíferos (FORD *et al.*, 1957; GUSTAVSSON, 1964; CHIARELLI, 1965; WAHRMAN *et al.*, 1979) y, por supuesto, en quirópteros (CAPANNA y CIVITELLI, 1970).

Cambios en la heterocromatina: la heterocromatina constitutiva, puesta de manifiesto por la tinción positiva en los bandeos C, es una porción de cromatina genéticamente inerte que contiene una alta secuencia repetitiva de ADN. Los cambios cuantitativos más frecuentes son las adiciones o selecciones de heterocromatina en los brazos cromosómicos o en la región centromérica y se consideran como importantes factores en la especiación y evolución de los organismos.

TECNICAS DE INVESTIGACION CITOGENÉTICA EN QUIROPTEROS

Cariotipo

La obtención de cariotipos en murciélagos se realiza normalmente a partir de médula ósea, cultivos primarios de fibroblastos y más raramente de la sangre:

A) Médula ósea: La médula ósea de los murciélagos se obtiene de huesos largos, en especial del húmero. El procedimiento es sencillo: se cortan las porciones terminales de las apófisis y se hace correr por medio de una jeringa, adecuada al tamaño del hueso, una solución hipotónica, generalmente KCI 0,075 M a 37° C. Una vez recogida la médula se incuba durante treinta minutos a 37° C. Posteriormente, se centrifuga a 1.000 rpm durante cinco minutos, descartándose posteriormente el sobrenadante y resuspendiéndose el sedimento obtenido en fijador Carnoy (acético-metanol 3 : 1) recién preparado. Esta fase es crítica, ya que cualquier tratamiento brusco en el momento de la resuspensión puede provocar la rotura de las metafases. Después de veinte o treinta minutos de incubación en el fijador se vuelve a centrifugar, a las mismas revoluciones que antes, y durante cinco minutos. Una vez descartado el sobrenadante y tras añadir nuevo fijador, se repite el proceso dos veces más. Después del último lavado se acostumbra a tomar una pequeña muestra, para comprobar si la suspensión celular ofrece un grado de concentración adecuado, y en general si el proceso ha ofrecido un material que permita, con garantías, la aplicación de otros tratamientos.

Uno de los problemas más frecuentes de esta técnica es el bajo índice mitótico que muestra la médula ósea. La inyección de una disolución de levadura (LEE y ELDER, 1980), junto con la utilización de inhibidores mitóticos, aumenta el número de células en metafase (BAKER *et al.*, 1982).

Otros problemas que pueden surgir son los derivados de tratamientos inadecuado, tanto en las condiciones del choque hipotónico como en las de fijación. En cualquier caso, modificando la duración de estos procesos se pueden conseguir las condiciones óptimas.

B) Cultivos de fibroblastos: Esta técnica, utilizada en nuestro laboratorio, evita el sacrificio de los animales y permite la repetición del proceso en condiciones controlables.

El tratamiento es como sigue:

- 1) Limpiar la zona de piel que va a ser extraída con un antiséptico.
- 2) Cortar pequeñas muestras de tejido (patagio o cartílago auricular) y trocearlas hasta un tamaño no muy superior a 1 mm (explantos).
- 3) Colocar los explantos en un frasco de cultivo estéril.
- 4) Añadir 5 ml de medio enriquecido y mantener en estufa de CO₂ al 5 por 100 y 37° C.
- 5) Renovar el medio cada dos o tres días.
- 6) A las dos o tres semanas los fibroblastos habrán crecido y cubierto gran parte del fondo del frasco de cultivo.
- 7) En este momento se puede optar por subcultivar o por cosechar. Si se subcultiva, se han de levantar las células con una disolución de tripsina estéril al 0,025 por 100, añadir nuevo medio y repartir entre dos frascos. Si se prefiere cosechar, se añade dos o tres horas antes de iniciar el proceso un inhibidor mitótico (Colcemid). Pasado este período de tiempo se retira el medio, se levantan las células con tripsina y se somete a tratamiento similar al de la médula ósea.

El medio de cultivo utilizado es McCoy 5A reforzado con suero bovino fetal al 10 por 100, glutamina, penicilina/estreptomocina y fungizona. No obstante, también pueden usarse otros medios como M - 199, RPMI 1640 o Hams. La disolución de tripsina al 0,25 por 100 se prepara a partir de Tripsina (1 250) y Hank's libre de calcio y magnesio.

TÉCNICAS DE BANDEO

Desde hace unos veinte años la citogenética dispone de una serie de técnicas que permiten la identificación individualizada de cromosomas: De entre las más usuales en los estudios cariológicos de murciélagos cabe destacar las siguientes:

Bandeo G por Tripsina y Giemsa (GTG)

Consiste en una digestión de los cromosomas con una enzima proteolítica: la tripsina. La técnica que se describe es básicamente la propuesta por SEABRIGHT (1971).

Procedimiento

- 1) Envejecer las preparaciones por calentamiento a 55-60°C de doce a veinticuatro horas.
- 2) Tratar las preparaciones con una solución de tripsina al 0,05 por 100 durante un tiempo que deberá ajustarse de una especie a otra.
- 3) Lavar las preparaciones en Hank's frío.
- 4) Teñir con Giemsa al 4 por 100 de cuatro a seis minutos.
- 5) Lavar con agua destilada y secar al aire.
- 6) Examinar las preparaciones para comprobar si la duración del tratamiento enzimático ha sido la correcta.

Si los cromosomas aparecen huecos o deshilachados se deberá disminuir el tiempo; si muestran una morfología cromosómica estándar o poco bandeada se aumentará dicho tiempo. Se necesitan de cuatro a seis preparaciones para dar con el tiempo correcto de bandeo.

Disoluciones

a) Tampón fosfato libre de calcio y magnesio: Dubelcco's.

b) Solución tripsina 0,025 por 100:

Tripsina (1 : 250): 50 mg.

Dubelcco's: 100 ml.

Preparar en el momento de su uso.

c) Solución Giemsa:

Agua destilada: 42,5 ml.

Tampón pH 6,8 (Gurr's): 5,0 ml.

Giemsa: 2,5 ml.

Esta técnica del bandeo G ha sido ampliamente utilizada para detectar modificaciones cromosómicas en diferentes taxones de quirópteros (PATTON y BAKER, 1978; BAKER *et al.*, 1982; HAIDUK y BAKER, 1982; QUMSIYEH y BAKER, 1985).

El mecanismo de las bandas G no está bien comprendido, aunque se sabe que corresponden a regiones cromosómicas ricas en Adenina-Timina (AT) (ELLISON y BEISER, 1972). También se ha sugerido que el colorante Giemsa es el responsable del bandeo (MCKAY, 1973; SCHUH *et al.*, 1975).

Bandeo R

El principio básico de esta técnica es el tratamiento de las preparaciones en soluciones tamponadas a altas temperaturas seguidas de una tinción, que en nuestro caso es Giemsa.

Las bandas obtenidas tras este proceso son las inversas respecto de las G (DUTRILLAUX y LEJEUNE, 1971; BOBROW *et al.*, 1972; SCHESTED, 1974).

Procedimiento

1) Preparaciones envejecidas a temperatura ambiente de una a tres semanas se incuban en tampón Sorensen (pH 6,8) a 85° C, unos ocho minutos, aunque este tiempo deberá ajustarse en cada caso.

2) Lavar en tampón Sorensen a temperatura ambiente.

3) Teñir con Giemsa de seis a diez minutos.

4) Lavar en agua destilada y secar al aire.

Disoluciones

Tampón Sorensen (pH 6,5-0,06 M):

KH_2PO_4 : 5,60 g.

Na_2HPO_4 : 2,64 g.

H₂O: 1-000 ml

Giemsa, como en las bandas G.

El tiempo de incubación en el tampón Sorensen a 85° C es crítico y depende de la edad de las preparaciones. Este tiempo deberá ajustarse según las especies.

El mecanismo tampoco está bien conocido (COMINGS,, 1978j, pero se sabe que

el calor .no sólo desnaturaliza las proteínas, sino también las secuencias ricas en AT, dejando las regiones GC (Guanina-Citosina) en su configuración nativa (SUMNER, 1982).

Bandeo C

La técnica del bandeo C produce una tinción selectiva de la heterocromatina constitutiva. Las bandas que aparecen se localizan preferentemente en el centrómero y en ocasiones en otros puntos. La técnica fue inicialmente descrita por ARRIGHI y HSU (1971) y consiste en un tratamiento con una base fuerte y una incubación posterior en una solución salina.

Aquí se describe básicamente el método de SUMNER (1972).

Procedimiento

- 1) Con preparaciones de una a dos semanas de antigüedad se incuba en HCL 0,2 N durante una hora a temperatura ambiente.
- 2) Lavar en agua destilada y secar al aire.
- 3) Tratar las preparaciones con Ba (OH)₂ al 5 por 100 y a 50° C de medio a cinco minutos. Si el proceso se hace a temperatura ambiente, la duración se prolongará a veinte o treinta minutos.
- 4) Lavar las preparaciones varias veces en agua destilada y deshidratar por medio de lavados en alcohol de concentraciones crecientes. Después secar al aire.
- 5) Incubar las preparaciones en 2xSSC a 60-65 C durante dos horas.
- 6) Lavar las preparaciones en agua destilada y secar al aire.
- 7) Teñir en Giemsa al 5 por 100 en tampón Sorensen de diez a quince minutos.

Disoluciones

- Ba (OH)₂ al 5 por 100:

Ba (OH)₂: 5 g.

Agua destilada: 100 ml.

Disolver el hidróxido de bario con agitador de quince a veinte minutos y filtrar antes de su uso. Esta disolución debe prepararse en el momento de su utilización.

- 2 x SSC:

Cloruro de sodio: 17,5 g.

Citrato sódico dihidratado: 8,8 g.

Ajustar el pH a 7 con hidróxido sódico 1 N.

- HCl 0,2 N:

HCl 2N: 10 ml.

Agua destilada: 100 ml.

- Solución Giemsa 5 por 100:

Tampón Sorensen pH 7: 47,5 ml.

Tinción Giemsa Gurr: 2,5 ml.

Tampón Sorensen (pH 7):

KH_2PO_4 : 5,26 g.

Na_2HPO_4 : 8,65 g.

Agua destilada: 1 l.

En esta técnica la etapa crítica es el tiempo de incubación en el hidróxido bórico. Este tiempo depende no sólo de la antigüedad de las preparaciones, sino también del tipo de tejido. Las preparaciones de una a ocho semanas de antigüedad son las que proporcionan los mejores resultados. Un tratamiento excesivo en hidróxido de bario se traduce en una tinción débil de los cromosomas, ofreciendo un aspecto que se denomina «fantasma». Por el contrario, un período de incubación corto muestra, después de la tinción con Giemsa, cromosomas de aspecto estándar.

La incubación en 2 x SSC no es crítica. Otra alternativa es mantener las preparaciones en una cámara húmeda y cubiertas con 2 x SSC durante una noche.

Bandeo NOR

Esta técnica localiza aquellas regiones del cromosoma que organizan y mantienen el nucleolo en la interfase. Aquí se describe la técnica de BLOOM y GOODPASTURE (1976) y la de HOWEL y BLACK (1980), que han sido, con pequeñas modificaciones, las más aplicadas en quirópteros.

Procedimiento (BLOOM y GOODPASTURE, 1976)

- 1) Poner de cuatro a seis gotas de AgNO_3 al 5 por 100 sobre las preparaciones y taparlas con un cubre.
- 2) Incubar a 37° C en cámara húmeda de dieciocho a veinticuatro horas.
- 3) Retirar el cubre, lavar en agua destilada y secar al aire.
- 4) Montar y examinar las preparaciones.

Procedimiento (HOWEL y BLACK, 1980)

- 1) Colocar dos gotas de gelatinas cuatro de AgNO_3 al 50 por 100 sobre la preparación. Mezclarlas suavemente y extenderlas por todo el porta, después tapar con un cubre.
- 2) Mantener a 70° C hasta que la disolución se vuelva de un color amarillo pardo (unos dos minutos).
- 3) Retirar el cubre, aclarar la preparación y secar al aire.

Disoluciones

Nitrato de plata al 50 por 100:

AgNO₃: 5 g.

Agua destilada: 10 ml.

Almacenar en oscuridad de 2 a 5° C.

Solución de gelatina:

Gelatina: 2 g.

Agua destilada: 100 ml.

Acido fórmico: 1 ml.

Disolver la gelatina por agitación de diez a quince minutos.

ESTUDIOS CARIOLÓGICOS DE LA FAUNA IBERICA DE MURCIELAGOS

En este apartado se describen los estudios citogenéticos realizados por distintos autores en especies de quirópteros presentes en la Península Ibérica. La mayor parte de estos trabajos se circunscriben a países europeos, ya que en la Península Ibérica se han iniciado en una época relativamente reciente y, por tanto, todavía son escasos o permanecen aún inéditos. En la tabla 1 se presentan las descripciones de los cariotipos de las especies con representación ibérica.

Familia Vespertilionidae

Myotis bechsteinii (KUHL, 1818)

La descripción del cariotipo de esta especie ha sido realizada por ZIMA (1978) en ejemplares capturados en Checoslovaquia y por PÉREZ-SUÁREZ *et al.* (1991) en España.

Su cariotipo consta de cuarenta y cuatro cromosomas. Los cromosomas autosómicos presentan la siguiente morfología: tres pares metacéntricos grandes, un par submetacéntrico pequeño, quince pares acrocéntricos de tamaño progresivo decreciente y dos pares de microcromosomas o cromosomas puntuales, según descripción de ZIMA (1978), de los cuales uno es metacéntrico. El cromosoma X es metacéntrico de tamaño medio y el Y es un acrocéntrico de pequeño tamaño. PÉREZ-SUÁREZ *et al.* (1991) considera que el cromosoma X es submetacéntrico y el Y acrocéntrico. Estudios de bandeos NOR han sido realizados por VOLLETH (1987).

Myotis blythii (TOMES, 1857)

El número diploide de esta especie es de cuarenta y cuatro cromosomas, característico de este género, y cuya morfología es similar a la descrita para *M. bechsteinii*. La variabilidad en el número fundamental autosómico (NFa) encontrado en esta especie se debe a la evaluación o determinación que realizan los distintos autores en la posición de los centrómeros en los autosomas puntuales y en uno de los pares autosómicos. Autores como VALENCIUC y TEODORESCU (1972) en Rumania, BAKER *et al.* (1974) en Túnez, BICKHAM y HAFNER (1978) en Yugoslavia, RUEDI (1987) en Suiza y PÉREZ-SUÁREZ *et al.* (1991) en España consideran los cromosomas puntuales como acrocéntricos (NFa=50). Por otra parte, RADJABLI *et al.* (1970) en Turkmenistán y ZIMA (1978) en Checoslovaquia consideran uno de los dos pares cromosomáticos puntuales como metacéntrico (NFa=52), mientras que KULIJEV y FATTAJEV (1975) describen ambos como metacéntricos (NFa=54).

Myotis capaccinii (BONAPARTE, 1837)

Mantiene el número diploide de cuarenta y cuatro cromosomas, característico de *Myotis*, con una morfología cromosómica similar a la *M. bechsteinii*: tres pares metacéntricos grandes, un par submetacéntrico pequeño y

diecisiete pares acrocéntricos, con un $NFa=50$. El cromosoma X es metacéntrico y el Y acrocéntrico. Estudios cariológicos de esta especie han sido realizados por CAPANNA *et al.* (1968a) en Italia. En España los ejemplares estudiados por PÉREZ-SUÁREZ *et al.* (1991) presentaron un par subtelocéntrico pequeño en vez del correspondiente acrocéntrico, por lo que su número fundamental autosómico (NFa) sería 52. Además, el cromosoma sexual X corresponde a un submetacéntrico.

***Myotis daubentonii* (KULH, 1819)**

Su cariotipo es similar al de *M. bechsteinii* con tres pares de grandes metacéntricos, un par de pequeños metacéntricos y diecisiete pares acrocéntricos. El cariotipo de este quiróptero ha sido investigado por FEDYK y FEDYK (1970) en Polonia, ZIMA (1978) en Checoslovaquia, RUEDI (1987) en Suiza y HONGELL *et al.* (1989) en Finlandia. BOVEY (1949) en Suiza encuentra un número diploide de cuarenta y dos cromosomas con cuatro pares metacéntricos grandes, aunque ZIMA (1978) duda de que dicha descripción corresponda a esta especie.

***Myotis emarginatus* (GEOFROY, 1806)**

Su número diploide es el característico para este género, $2n=44$ cromosomas. Su morfología cariológica no difiere de la descrita para *M. bechsteinii*. El primero en describirla fue BOVEY (1949) en Suiza; posteriores trabajos fueron realizados por RADJHABLI *et al.* (1970) en Asia, por ZIMA (1978) en Checoslovaquia y PÉREZ-SUÁREZ *et al.* (1991) en España.

***Myotis myotis* (BORKHAUSEN, 1797)**

El número diploide de esta especie es de cuarenta y cuatro cromosomas, con un cariotipo similar al de *M. bechsteinii*. Los estudios cariológicos sobre esta especie han sido llevados a cabo por BOVEY (1949) en Suiza, CAPANNA *et al.* (1968) en Italia, BICKHAM y HAFNER (1978) en Yugoslavia, quienes realizaron además bandeos G y C, ZIMA (1978) en Checoslovaquia, ILIOPOULOU-GEORGUDAKI y GIAGIA (1984) en Grecia y por PÉREZ-SUÁREZ *et al.* (1991) en España.

***Myotis mystacinus* (KULH, 1818)**

Se mantiene en esta especie la constancia del número diploide del género $2n=44$, con una morfología similar a la descrita para *M. bechsteinii*. A nivel cariológico esta especie ha sido analizada en Suiza (BOVEY, 1949), en Checoslovaquia (ZIMA, 1978), en Tazdikistán (URSS) (RADJABLI *et al.*, 1970) y en Finlandia (HONGELL *et al.*, 1989). Estudios de bandeos G han sido realizados por ZIMA (1982a).

***Myotis nattereri* (KULH, 1819)**

Su cariotipo no varía del característico del género, con $2n=44$ y morfología cariotípica similar a la de *M. bechsteinii*. Los estudios cromosómicos en esta especie han sido llevados a cabo por ZIMA (1978) en Checoslovaquia, ANDO *et al.* (1977) y HARADA y YOSHIDA (1978) en Japón. Estos últimos autores realizaron bandeos G y C en esta especie y otras tres del mismo género, observando variaciones morfológicas interespecíficas en el cromosoma cinco. Consideran que el correspondiente a *M. nattereri*, cromosoma acrocéntrico, como el tipo cromosómico ancestral. En España los estudios cariológicos han sido realizados por PÉREZ-SUÁREZ *et al.* (1991).

***Pipistrellus kuhlii* (KULH, 1819)**

El cariotipo de esta especie consta de un número diploide de cuarenta y cuatro cromosomas y mantiene una morfología cromosomática similar a la citada para el género *Myotis*. Las investigaciones cariológicas sobre esta especie han sido realizadas por CAPANNA y CIVITELLI (1966) en Italia, por BAKER *et al.* (1974) en ejemplares de Túnez y por ZIMA (1982a) en Libia.

***Pipistrellus nathussii* (KEYSERLING y BLASIUS, 1838)**

El número diploide de esta especie es de cuarenta y cuatro cromosomas con morfología similar a la citada para *M. bechsteinii*. Las descripciones cariotípicas han sido mencionadas a partir de individuos capturados en Suiza (BOVEY, 1949), Polonia (FEDYK y RUPRECHT, 1976) y Checoslovaquia (ZIMA, 1978). Las diferencias en el NFa entre los distintos autores citados son debidas a distintas consideraciones en relación con los pequeños cromosomas puntuales.

***Pipistrellus pipistrellus* (SCHREBER, 1774)**

El número diploide de cromosomas encontrado por FEDYK y RUPRECHT (1976) en ejemplares de Polonia y por ZIMA (1978, 1982a) en animales provenientes de Checoslovaquia y Bulgaria es de cuarenta y cuatro, con una morfología que no difiere de la descrita para *M. bechsteini*. Previamente, BOVEY (1949) cita un valor de $2n=42$ cromosomas en ejemplares suizos con cuatro pares metacéntricos grandes. El patrón de bandeos G ha sido descrito por ZIMA (1982a) y VOLLETH (1987) con tinciones NOR, observando diferentes localizaciones de los organizadores nucleolares correlacionados con el origen geográfico de los animales.

***Hypsugo savii* (BONAPARTE, 1837)**

El número diploide es de cuarenta y cuatro cromosomas con una morfología característica a la descrita anteriormente para el género *Myotis*. Los estudios cromosómicos de esta especie han sido llevados a cabo en ejemplares de Italia (CAPANNA y CIVITELLI, 1966, 1967a), de Bulgaria (ZIMA, 1982a) y Corea (PARK y WON, 1978). El patrón de bandeos G es descrito por ZIMA (1982a).

***Nyctalus lasiopterus* (SCHREBER, 1780)**

Los datos cariológicos han sido aportados a partir de ejemplares capturados en Japón (HARADA, 1973; ANDO *et al.*, 1977; HARADA *et al.*, 1982), que encuentran un valor del número diploide cromosómico de cuarenta y dos. La morfología cariológica autosómica se compone de cuatro pares metacéntricos grandes, un par subtelocéntrico pequeño y quince pares acrocéntricos. El cromosoma X es subtelocéntrico y el Y acrocéntrico. El patrón de bandeos G y C es descrito por HARADA *et al.* (1982).

***Nyctalus leisleri* (KUHL, 1818)**

El número diploide es de cuarenta y seis cromosomas. El cariotipo ha sido descrito a partir de una hembra capturada en Polonia (FEDYK y FEDYK, 1970) y un macho procedente de Checoslovaquia (ZIMA, 1978). La morfología cariotípica descrita se compone de tres pares metacéntricos grandes y los restantes autosómicos son acrocéntricos, aunque en algunos de ellos se discute la presencia de brazos (ZIMA, 1978). El cromosoma X es submetacéntrico y el Y acrocéntrico. Dentro de este género, el cariotipo de esta especie se considera como el más primitivo, al mostrar un elevado número de cromosomas acrocéntricos.

***Nyctalus noctula* (SCHREBER, 1774)**

El número diploide observado en esta especie es de cuarenta y dos cromosomas. La morfología cariotípica, similar a la de *N. lasiopterus*, se compone de cuatro pares de metacéntricos grandes, un par subtelocéntrico pequeño y quince pares acrocéntricos. El cromosoma X es metacéntrico y el Y acrocéntrico. Los estudios cariológicos realizados en esta especie se han llevado a cabo en Yugoslavia (DULIC *et al.*, 1967) y en Checoslovaquia (ZIMA, 1978). El cariotipo de esta especie podría considerarse derivado del de *N. leisleri* ($2n=46$) por dos fusiones acrocéntricas (FEDYK y FEDYK, 1970).

***Eptesicus serotinus* (SCHREBER, 1774)**

El cariotipo de esta especie se compone de cincuenta cromosomas, con una morfología acrocéntrica en todos los cromosomas, excepto en el X, que es submetacéntrico. FEDYK y FEDYK (1970) describen al cromosoma Y como subtelocéntrico en ejemplares capturados en Polonia. Otros estudios cariológicos se han llevado a cabo con ejemplares de Checoslovaquia (ZIMA, 1978) y Túnez (BAKER *et al.*, 1967). Los bandeos cromosómicos en esta especie han sido realizados por FEDYK y RUPRECHT (1983).

***Barbastella barbastellus* (SCHREBER, 1774)**

El número de cromosomas diploide de esta especie es de treinta y dos. Su cariotipo autosómico se compone de siete pares metacéntricos grandes, un par metacéntrico pequeño, dos pares submetacéntricos grandes y cinco pares de acrocéntricos pequeños. Los cromosomas sexuales son de morfología submetacéntrica para el X y acrocéntrica para el Y. Los estudios cariológicos en Europa se han realizado por BOVEY (1949) en Suiza, CAPANNA *et al.* (1968b) en Italia y ZIMA (1978) en Checoslovaquia. Bandeos cromosómicos en esta especie han sido realizados por VOLLETH (1987).

***Plecotus auritus* (LINNEO, 1758)**

El cariotipo de esta especie está compuesto por treinta y dos cromosomas. La morfología autosómica se compone de siete pares metacéntricos grandes, un par metacéntrico pequeño, dos pares de submetacéntricos grandes y cinco pares de acrocéntricos. ZIMA (1978) considera uno de estos acrocéntricos pequeños como metacéntricos (NFa=52). Los cromosomas sexuales son metacéntricos para el X y acrocéntricos para el Y. El cariotipo ha sido descrito en ejemplares capturados en Suiza (BOVEY, 1949), Polonia (FEDYK y FEDYK, 1970, 1971), Japón (HARADA, 1973) y Checoslovaquia (ZIMA, 1978). Bandeos G han sido realizados por FEDYK y FEDYK (1970) y la detección de los organizadores nucleolares (NOR) por VOLLETH (1985).

***Plecotus austriacus* (FISCHER, 1829)**

Su cariotipo es similar al de *P. auritus* y se compone de treinta y dos cromosomas. El cariotipo ha sido descrito por FEDYK y FEDYK (1970) en Polonia, por BAKER *et al.* (1974) en Túnez y por ZIMA (1978) en Checoslovaquia.

Familia Miniopteridae***Miniopterus schreibersii* (KUHLE, 1819)**

El cariotipo de esta especie se compone de cuarenta y seis cromosomas. Los autosomas se componen de dos pares metacéntricos grandes, un par metacéntrico mediano y diecinueve pares de acrocéntricos, de los cuales dos de ellos presentan constricciones secundarias. El cromosoma X es metacéntrico y el Y acrocéntrico. Los estudios cariológicos se han realizado a partir de individuos capturados en Suiza (BOVEY, 1949), Italia (CAPANNA y CIVITELLI, 1965), Túnez (BAKER *et al.*, 1974), Yugoslavia (BICKHAM y HAFNER, 1978) y Checoslovaquia (ZIMA, 1978). En España, estudios aún inéditos han aportado un cariotipo similar al descrito en otros países, con un número diploide de cuarenta y seis cromosomas y un número fundamental autosómico (NFa) de cincuenta.

Familia Molossidae***Tadarida teniotis* (RAFINESQUE, 1814).**

Esta especie posee un número diploide de $2n=48$ cromosomas. Los cromosomas autosómicos están constituidos por dos pares metacéntricos, tres pares submetacéntricos, once pares subteloicéntricos y siete pares acrocéntricos. El cromosoma X es subteloicéntrico y el Y es acrocéntrico. Los estudios cariológicos en esta especie han sido realizados en España por ARROYO-NOMBELA *et al.* (1986) y en Yugoslavia por DULIC y MRAKOVICIC (1980), que apuntan un NFa=76, ya que consideran ocho pares de cromosomas y diez pares subteloicéntricos.

Familia Rhinolophidae***Rhinolophus euryale* (BLASIUS, 1853)**

Esta especie presenta un número diploide $2n=58$ cromosomas; de los veintiocho pares autosómicos, dos son metacéntricos y veintiséis acrocéntricos. El cromosoma X es metacéntrico y el Y se presenta como acrocéntrico. Estudios cromosómicos de esta especie han sido investigados en Italia por CAPANNA y CIVITELLI (1964), en Yugoslavia por DULIC (1966), en Checoslovaquia por ZIMA (1982b) y en España por PAZ *et al.* (1991). En Suiza, BOVEY (1949) describe un cariotipo distinto que presenta un único metacéntrico autosómico, aunque esta cita sea posiblemente incorrecta (ZIMA y KRAL, 1984).

***Rhinolophus ferrumequinum* (SCHREBER, 1774)**

Esta especie presenta un número diploide de cincuenta y ocho cromosomas, con una morfología similar a la descrita anteriormente para *R. euryale*. Numerosos estudios cariológicos han sido realizados en esta especie: BOVEY (1949) en Suiza, CAPANNA y CIVITELLI (1964) en Italia, DULIC (1966, 1967) en Yugoslavia, BAKER *et al.* (1974) en Túnez, KULIJEV y FATTAJEV (1975) en Azerbaijón, ZIMA (1982b) en Checoslovaquia, QUMSIYEH *et al.* (1986) en Jordania y PAZ *et al.* (1991) en España. ILIOPOULOU-GEORGUDAKI (1986) en Grecia analiza el cariotipo de la subespecie *R. ferrumequinum creticum* encontrando el mismo número diploide $2n=58$, pero con un par metacéntrico y un subteloicéntrico más (NFa=64), proponiendo que el mecanismo citogenético que produce este cariotipo es una inversión pericéntrica o una adición de un brazo heterocromatídico.

***Rhinolophus hipposideros* (BECHSTEIN, 1800)**

El número de cromosomas que componen el cariotipo de esta especie es de cincuenta y seis. Los cromosomas autosómicos presentan un par metacéntrico grande, dos pares metacéntricos pequeños y veinticuatro pares acrocéntricos, con un $N_{Fa}=60$. El cromosoma X es metacéntrico y el Y acrocéntrico de tipo puntual. El cariotipo de esta especie ha sido descrito por CAPANNA *et al.* (1967) en Italia y por ZIMA (1982b) en Checoslovaquia. QUMSIYEH *et al.* (1986) en Jordania encuentran un valor de n número diploide de cincuenta y ocho, diferente del citado para los ejemplares europeos, y consideran, puesto que el número fundamental es el mismo en ambos cariotipos, que el cariotipo europeo derivaría de la fusión de dos acrocéntricos.

***Rhinolophus mehelyi* (MATSCHE, 1901)**

Presenta cincuenta y ocho cromosomas en su cariotipo, el cual ha sido analizado por distintos autores encontrando modificaciones en su morfología cariotípica. Así, DULIC y SOLDATOVIC (1969) en Rumania describen dos pares metacéntricos grandes y dos pares pequeños y veinticuatro acrocéntricos, N_{Fa} 64. KULIJEV y FATTAJEV (1975) en ejemplares de Azerbaijón y PAZ *et al.* (1991) en España citan dos pares metacéntricos, un par submetacéntrico y veinticinco pares acrocéntricos, $N_{Fa}=62$. BAKER *et al.* (1974) en Túnez encuentran un cariotipo de morfología idéntica a la de *R. ferrumequinum*, dos pares metacéntricos y veintiséis acrocéntricos, $N_{Fa}=60$. El cromosoma X se describe por estos autores como metacéntrico o subtelocéntrico y el Y como acrocéntrico.

EVOLUCION CROMÓSOMICA EN QUIROPTEROS

En los mamíferos es evidente que los procesos de diversificación evolutiva están acompañados de cambios en la morfología cromosómica (DOBZHANSKY, 1959; MAYR, 1963). Ejemplos bien conocidos son las reordenaciones cromosómicas de primates (PEARSON, 1977; JONES, 1977; DUTRILLAUX, 1979), cérvidos (NEITZEL, 1987), cricétidos (FREITAS *et al.*, 1983), carnívoros (WURSTER-HILL y CENTERWAL, 1982), esciúridos (NADLER *et al.*, 1984), múridos (CAPANNA, 1982), micrótidos (BURGOS *et al.*, 1988) y bóvidos (BUCKLAND y EVANS, 1978). Aunque no se conoce la forma por la cual los cambios cromosómicos intervienen en los procesos evolutivos, se cree, al menos teóricamente, que especiación y modificación cariotípica están correlacionados (MAT-FHEY, 1966; BUSH, 1975, 1981).

La teoría fundamental considera que las alteraciones del cariotipo actúan a través de cambios en la posición de los loci y en el número de grupos de ligamiento, manifestándose todo ello en la expresión génica, que a su vez puede modificar la capacidad adaptativa de los organismos. Estas modificaciones cromosómicas también pueden afectar a las meiosis, de forma que los individuos portadores de alteraciones tendrán disminuida su fertilidad. En casos extremos, al menos en teoría, la acumulación de diferencias en los cariotipos de las poblaciones afectadas puede conducir a la esterilidad de los híbridos y abrir el camino hacia un aislamiento reproductor, requisito básico en los procesos de especiación.

GRANT (1973) y WHITE (1968, 1973) han señalado tres modos de fijación de las variantes cromosómicas que facilitarían la evolución adaptativa a nivel orgánico y la especiación:

- a) Alteración cromosómica tal que impediría el flujo de genes entre subpoblaciones por constituirse en una barrera de aislamiento genético. Este tipo de situación se conoce como especiación estasiopátrica (KEY, 1968).
- b) La alteración afecta a los sistemas de regulación, produciendo un modelo de expresión genética que se manifestaría como un nuevo fenotipo (WHITE, 1968, 1973; BUSH, 1975).
- c) Los cambios cromosómicos forman supergenes que proporcionan ventajas adaptativas a las poblaciones y no pueden ser anuladas por recombinación (DOBZHANSKY, 1970; WHITE, 1973; REDGA, 1977).

Se ha sugerido que otros factores aisladamente o en combinación ayudarían a fijar las variantes cromosómicas que aparecen en las poblaciones. Entre éstos, se suele señalar a la deriva meiótica, deriva genética, endogamia y a la ventaja selectiva de los homocigotos como las más importantes.

Con los datos obtenidos de los cariotipos estándar y de los diferentes tipos de bandeos (G, R, C, NOR ...) se propone el cariotipo que se considera el primitivo de la familia. A partir de éste, y por medio de los cambios cromosómicos mencionados anteriormente (inversiones, translocaciones, fusiones, fisiones ...), se intenta justificar los cariotipos de las especies actuales mediante el menor número de cambios (principio de parsimonia),

estableciéndose relaciones cladísticas (PATFON y BAKER, 1978; BAKER, 1979; BICKHAM, 1979a). En relación con estos estudios se han sugerido tres modelos para explicar la evolución de los cariotipos de los quirópteros:

- 1) Modelo conservativo: En taxones que exhiben una tasa de variación cromosómica baja o nula. Es característico de géneros como *Myotis*, *Eptesicus*, *Pteronotus* y *Artibeus*.
- 2) Ortoselección cariotípica: Los taxones que evolucionan por esta vía lo hacen repitiendo los mismos tipos de alteraciones, independientemente que la tasa mutacional sea baja o relativamente alta, como ocurre en el género *Rhogeessa* (BICKHAM y BAKER, 1977).
- 3) Megaevolución cariotípica: Cuando los taxones experimentan tal cantidad de modificaciones que incluso no podrían establecerse homologías entre especies próximas. Este puede ser el tipo de evolución que se observa en los géneros *Tonatia* ($2n=34, 30, 26$ y 16), *Mycronycteris* ($2n=28, 30, 32, 38$ y 40), *Vampyresa* ($2n=26, 24, 22, 20, 18$ y 14), *Lasionycteris* ($2n=20$) y procedentes de *Myotis* por no menos de catorce cambios cromosómicos).

En mamíferos placentarios, la tasa de evolución cromosómica ha sido mayor que en otros vertebrados (WILSON *et al.*, 1974, 1975; BUSH *et al.*, 1977). No obstante, los quirópteros se muestran como un grupo muy conservativo desde un punto de vista cariológico, con tasas de mutación de $2,1 \times 10^4$ cambios en el número de brazos en cada línea evolutiva por millón de años y 0,028 cambios en el número de cromosomas en igual tiempo. Posiblemente esta baja tasa de evolución de los cariotipos en este orden sea el resultado de su alta movilidad, dificultando formación de subpoblaciones que permitirían la fijación de las alteraciones cromosómicas.

CONCLUSIONES GENERALES

Este estudio está restringido a las familias de murciélagos presentes en la Península Ibérica, en especial aquellas que muestran un mayor número de especies: *Vespertilionidae* y *Rhinolophidae*.

La familia *Vespertilionidae*, la más amplia dentro del orden Chiroptera, presenta cariológicamente una marcada variación a nivel genérico, con grupos de número diploide 50 (*Eptesicus*); 46 (*Antrozous*, *Nycticeius*, *Miniopterus*); 44 (*Myotis*); 34 (*Rhogeessa*); 32 (*Plecotus*); 30 (*Pipistrellus*, *Rhogeessa*); 28 (*Lasiurus*); 20 (*Lasionycteris*). Aunque el número fundamental se mantiene en valores más discretos que van desde 28 a 52 (BAKER y BICKHAM, 1980).

Esta diversidad cromosómica intergenérica contrasta con la escasa modificación cariotípica en niveles taxonómicos inferiores, y no sólo en cuanto al número diploide o al fundamental, sino también cuando se estudian los cariotipos bandeados.

No obstante, hay dos géneros donde la variación intergenérica es acusada; uno es el del complejo *Rhogeessa tumida-parvula*, con especies de números diploides 30, 32, 34, 42 y 44 (BAKER y PATTON, 1967; BAKER *et al.*, 1985); el otro es el género *Pipistrellus* con números diploides de 26 a 44 y fundamentales de 44 a 50 (McBEE *et al.*, 1986).

Del estudio de los cariotipos estándar y bandeados se puede sugerir dos grandes grupos en la familia *Vespertilionidae*: el llamado «tipo *Myotis*», que incluiría los géneros *Myotis*, *Pipistrellus*, *Lasiurus*, *Idionycteris*, *Plecotus* y *Lasionycteris*, caracterizados por la existencia de tres pares de cromosomas metacéntricos grandes y el resto acrocéntricos medianos o pequeños. El otro grupo, el «tipo *Eptesicus*», que incluye los géneros *Eptesicus*, *Nycticeius*, *Rhogeessa* y *Antozous*, tendría los cromosomas primero a sexto acrocéntricos o se habrían fusionado a otros autosomas.

Un tercer grupo, el «tipo *Miniopterus*», que obviamente estaría representado por el género de ese nombre, se situaría en una posición intermedia y se caracterizaría por tener los cromosomas que han servido como base para esta ordenación fusionados el primero y el segundo, el quinto y el sexto y como acrocéntricos el tercero y el cuarto.

Algunos autores han propuesto como cariotipo ancestral de los Vespertilionidos aquel de número diploide 44-50 y con un número fundamental de 50 (BAKER, 1970), basándose en la abundancia de este rango de valores. Además, utilizando caracteres morfológicos, el Vespertilionido primitivo sería del tipo *Myotis*. Aunque no pueda ser resuelto con certeza, la condición primitiva de la familia parece ser que mostraría un cariotipo con un número elevado de cromosomas acrocéntricos y que la tendencia evolutiva va hacia la reducción en el número diploide a través de translocaciones Robertsonianas. Posiblemente el cariotipo del tipo *Myotis* sea el que más se ajuste al cariotipo

ancestral de la familia (BICKHAM, 1979b).

Las especies europeas de la familia *Rhinolophidae* muestran un cariotipo muy homogéneo, predominando en ellos los cromosomas acrocéntricos. En concreto, hay tres especies, *R. ferrumequinum*, *R. mehelyi* y *R. euryale*, con número diploide 58 y fundamental 60, con dos pares de metacéntricos pequeños y el resto de acrocéntricos de diversos tamaños. Sin embargo, *R. hipposideros* presenta un número diploide 56, número fundamental 60, con tres pares de metacéntricos, el resto acrocéntricos.

La evolución intragenérica en términos cariológicos se ha producido por transformaciones no Robertsonianas (CAPANNA y CIVITELLI, 1970) más que por procesos de fusión/fisión, aunque en *R. hipposideros* hay una variación cromosómica respecto de los otros rinolofidos que se justifica por una fusión céntrica. CAPANNA *et al.* (1970) establece dos grupos citotaxonómicos dentro del género *Rhinolophus* que interpreta como dos líneas filogenéticas, pero no justifica la relación entre ambas. Uno de los grupos incluiría *R. ferrumequinum*, *R. hipposideros*, *R. mehelyi*; y el otro, *R. euryale* y *R. blassi*.

Tabla 1. Resumen de los datos sobre cariotipos de Quirópteros de la fauna ibérica. M: Metacéntrico; SM: Submetacéntrico; ST: Subtelocéntrico; A: Acrocéntrico; 2n: número diploide; NFA: número fundamental. *A summary of standard karyotypes from the*

Iberian bats. M: Metacentric, SM: Submetacentric; ST: Subtelocentric; A: Acrocentric, 2n: diploid number, - NFA: fundamental number.

RESUMEN

Se presenta una revisión de los estudios citogenéticos realizados en Europa sobre especies de quirópteros que tienen representación ibérica. Entre éstos se incluyen los llevados a cabo en España y comprenden las siguientes especies: *M. bechsteinii*, *M. blythii*, *M. capaccinii*, *M. emarginatus*, *M. myotis*, *M. nattereri*, *M. schreibersii*, *R. euryale*, *R. ferrumequinum* y *R. mehelyi*. Las especies del género *Myotis* muestran un cariotipo muy conservativo con un número diploide (2n) de 44 y un número fundamental que varía entre 50 y 56. En algunas especies (*M. bechsteinii*) se pueden apreciar diferencias entre los ejemplares examinados en España y los de otros países europeos a nivel de los cromosomas sexuales. En otros casos (*M. blythii*, *M. capaccinii*, *M. emarginatus*) se observan diferencias en el número fundamental. El cariotipo de *M. schreibersii* no difiere de aquellos estudiados en otras regiones de Europa.

Las especies del género *Rhinolophus* presentan un cariotipo con 2n=58 y un número fundamental entre 60 y 62. Los ejemplares de *R. mehelyi* de la Península Ibérica muestran un NFA=62, similar a los de Azerbaijón y diferentes a los de Yugoslavia (NFA=64) y Túnez (NFA=60).

También se ofrecen distintas teorías de la evolución cromosómica en quirópteros y se considera, de acuerdo con otros autores, que el cariotipo ancestral de los Vespertiliónidos estaría compuesto por un número diploide entre 44 y 50, y un número fundamental de 50. Es decir, el Vespertiliónido primitivo correspondería al tipo *Myotis*.

SUMMARY

In this paper is given a revision of cytogenetic studies carried out in Europe about european bat species representad in the Iberian Peninsula. We consider the ones realized in Spain, which includes 10 species: M. bechsteinii, M. blythii, M. capaccinii, M. emarginatus, M. myotis, M. nattereri, M. schreibersii, R. euryale, R. ferrumequinum and R. mehelyi. The species of the genus Myotis show a very conservative karyotype with a diploid number 2n=44 and its fundamental number (FNa) deviating between 50 and 56. In some species (M. bechsteinii) we can appreciate differences in the sex chromosomes between the specimens examined in Spain and other european countries. We have observed in another species (M. blythii, M. capaccinii and M. emarginatus) differences in the FNa. However, the Iberian M. schreibersii karyotype does not differ from the one studied in other european regions.

The genus Rhinolophus presents a karyotype with 2n=58 chromosomes and FNa=60-62. The Iberian individuals of R. mehelyi show an FNa similar to the specimens of Azerbaijan (FNa=62) and different to the Yugoslavians (FNa=64) and Tunisians (FNa=60).

We also present some theories about the types of chromosomal evolution on bats and, agree with another authours,

that the diploid number of the ancestor to the vespertilionids was probably between 44 and 50 with a FNa of 50.

BIBLIOGRAFIA

- ANDO, K.; TAGAWI, T., Y UCHIDA, T. A. (1977): «Considerations of karyotypic evolution within *Vespertilionidae*». *Experientia*, 33: 877-879.
- ARRIGHI, F. E., y Hsu, T. E. (1971): «Localization of heterocromatin in human chromosomes». *Cytogenetic*, 10: 81-86.
- ARROYO-NOMBELA, J. J.; RODRÍGUEZ, C., e IBÁÑEZ, C. (1986): «Análisis citogenético. Cariotipo bandeado de *Tadarida teniotis* (Rafinesque, 1814) (Mololsidae-Chiroptera)». *Genet. Iber.*, 3, 38: 93-103.
- BAKER, R. J. (1970): «Karyotypic trends in bats». *Biology of bats*. W., A. Wimsatt (ed.). Vol. 1, Acd. Press. New York, 406 pp.
- BAKER, R. J., y BASS, R. A. (1979): «Evolutionary relationships of Brachyphyllinae to the Glossophagine genera *Glossophaga* and *Monophyllus*». *J. Mamm.*, 60: 364-372.
- BAKER, R. J., y BICKHAM, J. W. (1980): «Karyotypic evolution in bats: Evidence of extensive and conservative chromosomal evolution in closely related taxa». *Syst. Zool.*, 29: 239-253.
- BAKER, R. J., y PATTON, J. L. (1967): «Karyotypes and karyotypic variations of North American Vespertilionid bats». *J. Mamm.*, 48: 270-286.
- BAKER, R. J.; DAVIS, B. L.; JORDAN, R. G., y BINOUS, A. (1974): «Karyotypic and morphometric studies of Tunisian mammals: bats». *Mammalia*, 38: 695-710.
- BAKER, R. J.; HAIDUK, M. W.; ROBBINS, L. W.; CADENA, A., y KOOP (1982): «Chromosomal studies of South American Bats and their systematic implications». *Mammalian Biology in South America*, pp. 303-327. M. A. Mares and H. H. Genoways (eds.). Pymatuning Laborator of Ecology. Vol. IV. Pymatuning Pennsylvania, 539 pp.
- BAKER, J. L.; BICKHAM, M. W., y ARNOLD, M. L. (1985): «Speciation in the *Rhogeessa tumida-parvula* complex (Chiroptera: Vespertilionidae)». *Evolution*, 39: 233-243.
- BICKHAM, J. W. (1979a): «Chromosomal variations and evolutionary relationships of Vespertilionid bats». *J. Mamm.*, 60: 350-363.
- BICKHAM, J. W. (1979b): «Banded karyotypes of 11 species of American bats (genus *Myotis*)». *Cytologia*, 44: 789-797.
- BICKHAM, J. W., y BAKER, R. J. (1977): «Implications of cromosomal variation in *Rhogeessa* (Chiroptera: Vespertilionidae)». *J. Mamm.*, 58: 448-453.
- BICKHAM, J. W., y HAFNER, J. C. (1978): «A chromosomal banding study of three species of Vespertilionid bats from Yugoslavia». *Genetica*, 48: 1-3.
- BLOOM, S. E., y GOODPASTURE, C. (1976): «An improved technique for selectiva silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes». *Human Genetic.*, 34: 199-206.
- BOBROW, M.; MODEN, K., y PEARSON, P. L. (1972): «Staining of some specific regions of human Chromosome particularly the secondary constriction of n. 9». *Nature New Biol.*, 238: 122-124.
- BOVEY, R. (1949): «Les chromosomes des Chiroptères et des Insectivores». *Rev. Suisse Zool.*, 56: 3 71-460.

- BUCKLAND, R. A., y EVANS, H. J. (1978): «Cytogenetics aspects of phylogeny in Bovidae II C-Banding». *Cytogenet. Cell. Genet.*, 21: 74-71.
- BURDOS, M.; JIMÉNEZ, R., y DÍAZ DE LA GUARDIA, R. (1988): «Comparative study of G and C Banded chromosomes of five species of *Microtidae* a chromosomal evolution analysis». *Genome*, 30: 540-546.
- BUSH, G. L. (1975): «Modes of animal speciation». *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 6: 339-364. Bush, G. L. (1981): *Stasipatric speciation and rapid evolution in animals*. Evolution and Speciation. Essays in Honor M. J. D. White. Cambridge Univ. Press.
- BUSH, G. L.; CASE, S. M.; WILSON, A. C., y PARRON, J. L. (1977): «Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals». *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74: 3942-3946.
- CAPANNA, E. (1982): «Robertsonian numerical variation in animal speciation. *Mus musculus*: An emblematic model». *Mechanisms of speciation*. Proceedings of the Int. Meeting on Mechanisms of speciation. Rome. Edited by C. Barigozi, R. Alan, Liss N. Y.
- CAPANNA, E., y CIVITELLI, M. V. (1964): «Contributo alla conoscenza della carilogia del Rinolofidi (Mammalia: Chiroptera)». *Caryologia*, 17: 361-371.
- CAPANNA, E., y CIVITELLI, M. V. (1965): «Cariologia e cariometria del miniottero (Mammalia: Chiroptera)». *Caryologia*, 18: 541-546.
- CAPANNA, E., y CIVITELLI, M. V. (1966): «I cromosomi del Pipistrello abulim bato». *Caryologia*, 19: 231-240.
- CAPANNA, E., y CIVITELLI, M. V. (1967): «I cromosomi di *Pipistrellus savii*». *Caryologia*, 20: 265-272.
- CAPANNA, E., y CIVITELLI, M. V. (1970): «Chromosomal mechanisms in the evolution of chiropteran karyotype. Chromosomal tables of Chiroptera». *Caryologia*, 23: 79-111.
- CAPANNA, E.; CIVITELLI, M. V., y CONTI, L. (1967): «I cromosomi somatici del Pipistrello "ferro di cavarlo minore" (Mammalia: Chiroptera)». *Rend. Acc. Naz. Lincei*, 42: 125-128.
- CAPANNA, E.; CIVITELLI, M. V., y SPAGNUOLO, C. (1968a): «Contributo alla carilogia del genere *Myotis*. Considerazioni sulla evoluzione del cariotipo del Vespertilionidi Mammalia, Chiroptera)». *Caryologia*, 21: 225-240.
- CAPANNA, E.; CONTI, L., y REUZIS, G. (1968b): «I cromosomi di *Barbastella barbastellus*». *Caryologia*, 21: 137-145.
- CASPERSSON, T., y ZECH, L. (1973): *Chromosome identification technique and application in biology and medicine*. Nobel symp. 23. Nobel foundation. Stockholm. Acad. Press, N. Y., London.
- CHIARELLI, B. (1965): «Interesse sistemático et evolutivo della carilogia del Canidae». *Boll. Zool.*, 32: 435-444.
- CHIARELLI, A. B., y CAPANNA, E. (1973): *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. Academic Press London, N. Y.
- COMINGS, D. E. (1978): «Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure». *Am. Rev. Genet.*, 12: 25-46.
- DOBZHANSKY, T. (1959): «Cold Spring Harbor». *Symp. Quant. Biol.*, 24: 15-27.
- DOBZHANSKY, T. (1970): *Genetic of the evolutionary process*. Columbia Univ. Press. N. Y., 505 pp,

- DULIC, B. (1966): «Somatic chromosomes as indicators of interspecific relationships in certain rhinolophid bats». *Biolosqui Glasnik*, 19: 65-96.
- DULIC, B. (1967): «Comparative study of the chromosomes of the spleen of some European Rhinolophidae (Mammalia: Chiroptera)». *Bull. Sci. Conseil. Acad. RSF Yugoslavie, Sec. A-Zagreb*, 12 (3-4): 63-65.
- DULIC, B., Y SOLDATOVIC, B. (1969): «Les chromosomes de *Rhinolophus mehelyi*, Matschie, 1990 (Mammalia: Chiroptera)». *Caryologia*, 22: 1-5.
- DULIC, B.; SOLDATOVIC, B., y RIMSA, D. (1967): «La formule chromosomique de la Noctule, *Nyctalus noctula*, Schreber (Mammalia: Chiroptera)». *Experientia*, 23: 1-4.
- DULIC, B., y MRAKOVIC, M. (1980): «Chromosomes of European free-tailed bat *Tadarida teniotis teniotis*, Rafines, 1984 (Mammalia: Chiroptera, Molossidae)». *Biosistematika*, 6 (1): 109-112.
- DUTRILLAUX, B. (1979): «Chromosomal evolution in Primates». *Human Genet.*, 48: 251-256.
- DUTRILLAUX, B., y LEJEUNE, J. (1971): «Sur un nouvelle technique d'analysis du caryotype humaine». *C. R. Acad. Sci. Paris*, 272: 2638-2640.
- DUTRILLAUX, B.; RETHORE, M. O.; AURIAS, A., y GOUSTARD, M. (1975): «Analyse du caryotype de deux espèces de gibbons (*Hylobates lar* et *H. concolor*) par différentes techniques du marquage». *Cytogenet. Cell. Genet.*, 15: 81-91.
- ELLISON, J. R., y BEISER, H. J. (1972): «Quinacrine fluorescence of specific chromosome region: Late replication and high AT content in *Samoia leonensis*». *Chromosoma*, 36: 375-390.
- FEDYK, A., y FEDYK, S. (1970): «Karyotypes of some species of Vespertilionid bats from Poland». *Acta Theriol.*, 15: 295-302.
- FEDYK, S., y FEDYK, A. (1971): «Karyological analysis of representatives of the genus *Plecotus*, Geoffroy, 1818 (Mammalia: Chiroptera)». *Caryologia*, 24: 483-492.
- FEDYK, S., y RUPRECHT, A. L. (1976): «Karyotypes of *Pipistrellus pipistrellus*, Schreber, 1774, and *P. nathusii*, Keyserling and Blasius, 1839 (Chiroptera: Vespertilionidae)». *Caryologia*, 29: 282-289.
- FEDYK, S., y RUPRECHT, A. L. (1983): «Chromosomes of some species of vespertilionid bats. I: Banding patterns of *Eptesicus serotinus* chromosomes». *Acta Theriol.*, 28: 159-170.
- FORD, C. E.; HAMERTON, J. L., Y SHARMAN, G. B. (1957): «Chromosome polymorphism in the common shrew». *Nature*, 180: 392-393.
- FREDGA, K. (1977): «Chromosomal changes in vertebrate evolution». *Proc. R. Soc. London, B*, 199: 377-397.
- FREITAS, T.; MATEVI, M. S.; OLIVEIRA, L. F. B.; SOUZA, M. J.; YONENAGA-YASUDA, Y., y SALVANO, F. M. (1983): «Chromosome relationships in the three representatives of the genus *Holochilus* (Rodentia: Cricetidae) from Brazil». *Genetica*, 61: 13-20.
- GAMPERL, R. (1982): «Chromosomal evolution in the genus *Clethrionomys*». *Genetica*, 57:193-197.
- GRANT, J. (1973): *Plant speciation*. Columbia Univ. Press. N. Y.
- GUSTAVSSON, J. (1964): «The Karyotype of the fox». *Nature*, 201: 950-951.
- HAIIDUK, M. W., y BAKER, R. J. (1982): «Cladistical analysis of the G-Banded chromosomes of nectar-feeding bats (Glossophaginae: Phyllostomidae)». *Syst. Zool.*, 31: 252-265.

HARADA, M. (1973): «Chromosomes of nine chiropteran species in Japan (Chiroptera)». *La Kromosomo*, 91: 2885-2895.

HARADA, M., Y YOSHIDA, T. H. (1978): «Karyological study of four Japanese *Myotis* bats (Chiroptera: Mammalia)». *Chromosoma*, 65: 283-291.

HARADA, M.; UCHIDA, T. A.; YOSHIDA, T. H., y TAKADA, S. (1982): «Karyological studies of two Japanese noctule bats (Chiroptera)». *Caryologia*, 35: 1-9.

HONGELL, K.; HAGNER, N.; LOKKI, J., y STJERNBERG, T. (1989): «Chromosome studies in Finnish bats». *European Bat Research 1987*. V. Hanak, I. Horacek and J. Gaisler (eds.). Praha, pp.: 101-104.

HOWELL, W. M., y BLACK, D. A. (1980): «Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer. A 1-step method». *Experientia*, 36: 1014.

ILIOPOULOU-GEORGUDAKI, J. (1986): «The karyotype of the new subspecies of the Greater Horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum creticum* (Chiroptera: Rhinolophidae)». *Saugetierk. Mitteil.*, 33: 249-251.

ILIOPOULOU-GEORGUDAKI, J., y GIAGIA, E. B. (1984): «Distribution notes on *Myotis myotis*, Borkhausen, 1797 (Chiroptera: Vespertilionidae) from Greece, including the karyotype of specimens from Lesbos Island». *Saugetierk Mitteil.*, 31: 135-139.

JONES, K. W. (1977): «Repetitive DNA in primates evolution». *Molecular Structure of Human Chromosomes*. J. J. Yunis (ed.). Acad. Press., N. Y.

KEY, K. H. L. (1968): «The concept of stasipatric speciation». *Syst. Zool.*, 17: 14-22.

KULIJEV, G. K., y FATTAJEV, M. D. (1975): «Kariologiceskoje issledovanije nekotorych vidov letucich mysej Azerbajdzana». *Sist. Citogenet. Mlekopit. Mat. Vesesoj. Simp. Moskva*, 4-7.

LEE, M. R., y ELDER, F. F. D. (1980): «Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigation». *Cytogen Cell. Gen.*, 26: 36-40.

MAKINO, S. (1948): «A study of the chromosomes in two species of bats (Chiroptera)». *Biol. Bull.*, 94: 275-282.

MATTHEY, R., y BOVEY, R. (1948): «La formule chromosomique chez cinq species de chiropteres». *Experientia*, 4: 26-27.

MATRHEY, R. (1966): «Cytogenetic mechanisms and speciation of mammals». *Amer. Tiss. Cult. Ass. Meet.* Miami, pp. 1-11.

MATTHEY, R. (1973): «The chromosome formulae of eutherian Mammals». *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*. Acad. Press. London, N. Y., pp. 531-616.

MAYR, E. (1963): *Animal species and evolution*. Harvard University Press. Cambridge, 797 pp.

McBEE, K.; BICKHAM, W.; YENBUTRA, S.; NABHITABHATA, J., y SCHLITRER, D. A. (1986): «Standard karyology of nine species of Vespertilionid bats (Chiroptera: Vespertilionidae) from Thailand». *Ann. Carnegie Museum*, 55: 95-116.

McKAY, R. D. G. (1973): «The mechanism of G and C banding in mammalian metaphase chromosome». *Chromosome*, 44: 1-14.

NADLER, C. F.; CYAPUNOSA, E. A.; HOFFMANN, N. N.; VORONTSOV; SHAITAROVA, L. L., y BORISOV, M. (1984): «Chromosomes evolution in Holarctic ground squirrels (*Spermophilus*)». *Z. Saugetierk.*, 4 (2): 78-90.

- NEITZEL, H. (1987): «Chromosome evolution of Cervidae karyotypic and molecular aspects». *Cytogenetics basics and applied aspects*, pp. 90-112. Springer-Verlag, Berlin,
- PARK, S. R., Y WON, P. O. (1978): «Chromosomes of the Korean bats». *J. Mammal Soc. Japan*, 7: 199-203.
- PAFTON, J. C., y BAKER, R. J. (1978): «Chromosomal homology and evolution of Phyllostomatoid bats». *Syst. Zool.*, 27: 449-462.
- PAZ, O. de; REINA, J. M.; BENZAL, J.; NAVLET, J.; PÉREZ-SUÁREZ, G., Y JÓPEZ-CABALLERO, E. J.: «Karyological study of three Spanish *Rhinolophus* (Chiroptera: Rhinolophidae) bats». *European Mammals. Proc. of the 1st. Congr. of Mamm.*, Lisboa, 1991, Chapman & Hall (ed.) (en prensa).
- PEARSON, P. L. (1977): «Banding patterns, chromosome polymorphism and primate evolution». *Molecular Estructure of Human Chromosomes*. J. J. Yunis (ed.). Acad. Press, N. Y., p. 267.
- PÉREZ-SUÁREZ, G.; LÓPEZ-CABALLERO, E. J.; PAZ, O. de; REINA, J. M., y NAVLET, J. (1991): «Chromosome studies of six species of the genus *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae) from Spain». *European Mammals. Proc. of the 1st. Congr. of Mamm.*, Lisboa, 1991. Chapman & Hall (ed.) (en prensa).
- QUMSIYEH, M. B., y BAKER, R. J. (1985): «G and C band karyotypes of *Rhinopomatidae* (Microchiroptera)». *J. Mammal.*, 66: 541-544.
- QUMSIYEH, M. B.; SCHLITFER, D. A., y Disi, A. M. (1986): «New records and karyotypes of small mammals from Jordan». *Z. Saugetierk.*, 51: 139-146.
- QUMSIYEH, M. B.; OWEN, R. D., y CHESSER, R. K. (1988): «Differential rates of genic and chromosomal evolution in bats of the family Rhinolophidae». *Genome*, 30: 326-335.
- RADJHABLI, S. I.; VORONTSOR, N. N., y VOLOBOUEV, V. T. (1970): «The karyological analysis of three *Myotis* species (Chiroptera: Vespertilionidae)». *Citologia*, 12: 767-773.
- RUEDI, M. (1987): *Status spécifique de deux chauve-souris jumelles Myotis myotis (Bork), et Myotis blythii (Tomes), une approche morphologique, cariologique et biochimique*. (Diplome de Biologiste.) Institut de Zoologie et d'Ecologie Animale. Université de Lausanne. Suisse, 43 pp.
- SCHESTED, J. (1974): «A simple method for R-banding of human chromosome showing a pH dependent connection between R and G bands». *Humangenetik*, 21: 55-58.
- SCHUH, B. E.; KORF, B. R., y SALWEN, M. J. (1975): «Dinamic aspects of trypsin-Giemsa banding». *Humangenetik*, 28: 233-238.
- SEABRIGHT, M. (1971): «A rapid banding technique for human chromosomes». *The Lancet*, 11: 971-972.
- SUMNER, A. T. (1972): «A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatic». *Exp. Cell. Res.*, 75: 304-306.
- SUMNER, A. T. (1982). «The nature and mechanisms of chromosome banding». *Cancer Genet. Cytogenet.*, 6: 59-87.
- VALENCIUC, N., y TEODORESCU, F. (1972): «Investigation sur le caryotype de deux especes de Chiroptera: *Myotis myotis*, (Borkh.) el *M. oxygnathus*, (Montic)». *An. st. Univ. Iasi*, 18: 351-356.
- VOLLETH, M. (1987): «Differences in the location of nucleolus organizer regions in european Vespertilionid bats». *Cytogenet. Cell. Genet.*, 44: 186-197.

WAHRMAN, J.; GOTTEIN, R., y NEVO, E. (1979): «Geographic variation of chromosome forms in *Spalax*, a subterranean mammals of restricted mobility». *Comparative Mammalian Cytogenetics*. K. Benirschke (ed.). New York, Springer. Verl.

WHITE, M. J.D. (1968): «Models of speciation». *Science*, 159: 1065-1070.

WHITE, M. J.D. (1973): *Animal cytology and evolution*. Cambridge Univ. Press. 3.^a edition.

WILSON, A. C.; SARICH, V. M., Y MAXSON, L. R. (1974): «The importance of gene rearrangement in evolution: evidence from studies on rates of chromosomal, protein and anatomical evolution». *Proc. Nat. Acad. Sej.* USA 71 (8): 3028-3030.

WILSON, A. C.; BUSH, G. L.; CASE, S. M., y KING, M. C. (1975): «Social structuring of mammalian populations and rate of chromosomal evolution». *Proc. Nat. Acad. Sci.* USA, 72 (12): 5061-5065.

WURSTER-HILL, D. H., Y CENTERWAL, W. R. (1982): «The interrelationship of chromosome banding patterns in canids, mustelid, hyena and felids». *Cytogen. Cell. Genet.*, 34: 178-192.

ZIMA, J. (1978): «Chromosomal characteristics of Vespertilionidae from Czechoslovakia». *Act. Sc. Nat. Brno.*, 12: 1-38.

ZIMA, J. (1982a): «Chromosomal homology in the complements of bats of the family Vespertilionidac. II: G-hand karyotypes of some *Myotis*, *Eptesicus* and *Pipistrellus* species». *Folia Zool.*, 31: 31-56.

ZIMA, J.(1982b): «Karyotypes of three species of horseshoe bats from Czechoslovakia». *Lynx*, 21: 121-124.

ZIMA, J., y KRAL, B. (1984): «Karyotypes of European Mammals. I». *Acta Sci. Acad.*, Bohemoslovaca, 18: 1-51.