

DEBORAH FRANK MOTA TELLES VIEIRA

**ESPÉCIES DO GÊNERO OLIGORYZOMYS OCORRENTES NA
REGIÃO SUL — caracterização citogenética e distribuição
biogeográfica.**

Monografia apresentada à Disciplina de Estágio em Genética (BG016), Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ives José Sbalqueiro.

CURITIBA
2004

DEBORAH FRANK MOTA TELLES VIEIRA

**ESPÉCIES DO GÊNERO OLIGORYZOMYS OCORRENTES NA
REGIÃO SUL — caracterização citogenética e distribuição
biogeográfica.**

CURITIBA
2004

AGRADECIMENTOS

Durante toda a graduação tive o apoio de muitas pessoas e gostaria de agradecer-las por todos os favores e ajuda que me prestaram, em especial:

Ao Prof. Dr. Ives José Sbalqueiro pela oportunidade que me deu, de poder estagiar no Laboratório de Citogenética Animal, pela orientação e estímulo prestados durante todo esse tempo de convivência.

Ao pessoal do Laboratório: Roxane, Andréa, Polly, Rafael, Daniel, Roger, Cristina, Elizabete, Wanessa e outros com os quais não convivi muito, mas que pudemos ter momentos de muita descontração e gargalhadas para esquecer um pouco o estresse do dia-a-dia. Em especial à Roxane por sua paciência e carinho em ensinar praticamente tudo que sei acerca do Laboratório; e à Andréa com quem dividi muitos momentos (inclusive a bolsa... hahahahaha).

Ao Prof. Dr. José Fernando de Souza Lima e à doutoranda Íris Hass que me ajudaram com dicas importantes e com coleta de espécimens para o nosso trabalho.

À FURB por nos conceder animais e preparações que foram de suma importância para o andamento da pesquisa.

Aos meus pais, Mário e Maria do Carmo, que sempre lutaram para que eu pudesse ter bons estudos e sempre me ajudaram em tudo que precisei, com amor, carinho e conselhos que levo para o resto da vida.

Ao meu esposo, Giovan, que sempre esteve me apoiando, me incentivando e encorajando a prosseguir, sempre me dando o seu amor e compreensão.

E acima de tudo, agradeço a Deus, porque se não fosse por Ele, eu não teria chegado até aqui. Ele tem me sustentado e me dado força e coragem para conseguir caminhar. Por isso dedico tudo o que TENHO e tudo o que SOU a Ele, ao meu Deus e ao meu Senhor Jesus que têm me abençoado dia após dia.

Muito obrigada!!!

RESUMO

O presente trabalho visa contribuir para uma melhor compreensão citotaxonômica e biogeográfica de duas espécies de *Oligoryzomys* - *O. flavescens* e *O. nigripes* -ocorrentes na região Sul do Brasil, em especial nos Estados do Paraná e Santa Catarina. A amostra foi composta por 197 exemplares, sendo 163 animais do acervo do Laboratório de Citogenética Animal e 34 do presente trabalho, coletados em 20 municípios, sendo 18 do Paraná e dois de Santa Catarina. Foram aplicadas diferentes técnicas de coloração: convencional e bandeamentos C, G e RON. Os resultados mostraram: **a)** *O. nigripes* ($2n=62/NA=80-82$), variação no NA decorrente de alteração estrutural, inversão pericêntrica, no cromossomo 3 originando as formas submetacêntrica e acrocêntrica e três estados cariomorfológicos - homozigotos submetacêntricos ou acrocêntricos e heterozigotos, que em São Domingos, com o maior número de exemplares capturados, mostraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\alpha^2 = 0,765$; $gI = 1$; $p > 0,30$); a heterocromatina constitutiva distribuiu-se nas região pericentromérica de todos os autossomos, braço curto do X e todo o cromossomo Y, ao passo que a banda RON marcou a região telomérica do braço menor de pelo menos dois pares de cromossomos acrocêntricos pequenos; **b)** *O. flavescens* ($2n=64/NA=66$ e $2n=66/NA=68$), variação numérica tanto no $2n$ como no NA devido às presenças de dois cromossomos B acrocêntricos; a heterocromatina restrita às regiões pericentroméricas dos autossomos, braço curto do X, todo o Y e cromossomos B; a banda RON mostrou-se presente nos telômeros dos braços curtos de cromossomos acrocêntricos pequenos. Estes achados citogenéticos estão de acordo com os dados descritos na literatura em amostras de outras regiões brasileiras. A caracterização dos cariótipos destas duas espécies, aqui descritos em exemplares coletados em cerca de 20 novas localidades da região Sul, excetuando-se a região metropolitana de Curitiba, constitui-se em uma importante contribuição na ampliação biogeográfica das formas cromossômicas conhecidas. Nesta, percebe-se que *O. nigripes* tem uma distribuição mais ampla, sendo encontrada em 19 das localidades, desde o litoral (Leste) até Foz do Iguaçu (Oeste) do Paraná, ao passo que *O. flavescens*, apesar de também ter uma distribuição ampla, foi capturada em apenas cinco das localidades. A análise comparativa dos padrões de bandas G e C entre os três maiores cromossomos dessas duas espécies sugere que a forma acrocêntrica, verificada nos três cromossomos de *O.*

flavescens, seja a mais primitiva e possivelmente presente no ancestral comum a elas, onde a inversão pericêntrica responderia pela divergência cariotípica existente, no que concerne ao número de braços.

SUMÁRIO

1. Introdução	01
2. Objetivos	05
3. Materiais e métodos	06
3.1. Obtenção de cromossomos mitóticos	07
3.2. Preparação de lâminas	08
3.3. Técnicas de coloração	08
3.3.1. Coloração convencional	08
3.3.2. Bandeamento CBG	08
3.3.3. Bandeamento GTG	09
3.3.4. Bandeamento RON	09
3.4. Análise do material	10
3.5. Fotomicrografias	10
3.6. Montagem de kariogramas	10
3.7. Análise cariotípica das bandas	10
4. Resultados	12
4.1. <i>Oligoryzomys nigripes</i>	12
4.2. <i>Oligoryzomys flavescens</i>	13
4.3. Distribuição geográfica	17
4.4. Comparação dos padrões de bandas G entre as duas espécies	17
5. Discussão	19
6. Conclusões	22
7. Anexos	23
8. Referências Bibliográficas	25

1. INTRODUÇÃO

Os roedores constituem-se entre os mamíferos num dos grupos mais bem sucedidos evolutivamente, sendo considerados membros importantes de, praticamente, todas as faunas, desde o Paleoceno Superior até o Recente (VAUGHAN, 1978).

Esta ordem, com aproximadamente 450 espécies viventes, corresponde a cerca de 43% das espécies atuais de mamíferos sul-americanos e a 11% no contexto mundial (REIG, 1984).

A Região Neotropical da América do Sul, com suas sub-regiões Brasileira e Patagônica, notabiliza-se por apresentar uma acentuada diversidade na fauna de mamíferos, caracterizando-se, ainda, por ser densamente populosa em termos do número de indivíduos.

A família Muridae está distribuída através da África, Ásia, Europa e as Américas, tanto como representantes fósseis, como atuais. Os murideos são, de maneira geral, terrestres, mas com representantes arborícolas, semi-aquáticos e fossoriais, com hábitos alimentares variando de herbívoros, onívoros a insetívoros.

Na América do Sul, a família Muridae, representada principalmente pela subfamília Sigmodontinae, compreende cerca de 51 gêneros e 249 espécies, agrupadas em sete tribos, com a maior concentração ocorrendo em três delas: Oryzomyini (que inclui os gêneros *Oryzomys* e *Oligoryzomys*); Akodontini e Phyllotini (REIG, 1984). De acordo com este autor, a alta concentração tanto de espécies (87%) como de gêneros e subgêneros (73%) destas tribos nas diferentes localidades andinas, sugerem que a diversificação destes roedores, através de distintos processos cladogênicos, deu-se ao longo dos Andes.

Torna-se também importante destacar que não se conhece, em toda a sua extensão, a diversidade sigmodontina atual, justamente porque freqüentemente são descritas não só novas espécies como também novos gêneros (PARDIÑAS et.al. 2002).

A ordem Rodentia mostra uma enorme multiformidade cariotípica, permitindo supor que a evolução dos roedores deu-se às custas de profundas modificações em seus cariótipos, à semelhança de situações em que se tem atribuído aos rearranjos cromossômicos um papel importante e indispensável no processo da especiação (WHITE, 1978; KING, 1993). Essa grande dinâmica cromossômica é reflexo da estrutura de suas populações, da alta taxa reprodutiva, da baixa mobilidade e da capacidade de ocupação de nichos restritos (MIRANDA, 2000). A tribo Oryzomyini é a mais diversificada do ponto

de vista tanto cariotípico e morfológico, quanto de distribuição (MIRANDA,2000) — alcançando as três Américas, Galápagos, as Antilhas, e num passado recente, também a ilha de Fernando de Noronha (PARDIÑAS et.al. 2002).

A tribo Oryzomyini possui 15 gêneros e 104 espécies, evidenciando uma diferenciação cariotípica resultante de vários mecanismos de rearranjos cromossômicos (MIRANDA, 2000). É considerada morfológicamente como a mais primitiva, apresentando a mais alta frequência de espécies e o maior número de gêneros. Os achados citogenéticos, neste grupo, reforçam a hipótese que os orizominos, mais especificamente o gênero *Oryzomys*, com um cariótipo entre 70 e 80 cromossomos, constituem-se no estoque basal, a partir do qual, possivelmente, originaram-se todas as demais linhagens de cricetídeos neotropicais (GARDNER & PATTON, 1976). Consideram, ainda, estes autores, que o número cromossômico, durante a história evolutiva dos Sigmodontinae, tanto pode ter aumentado como diminuído em relação àquele cariótipo primitivo, porém com uma aparente tendência à diminuição.

Os orizominos apresentam uma grande variedade de formas cariotípicas, variabilidade esta que pode estar associada à grande diversidade de espécies que participam do grupo. As principais variações cromossômicas intra-específicas descritas para os orizominos envolvem fusões cêntricas, fusões *in tandem*, inversões pericêntricas, variabilidade na quantidade de heterocromatina constitutiva, heteromorfismo de cromossomos sexuais e cromossomos supernumerários (SILVA, 1994).

No que se refere ao gênero *Oryzomys*, que é politípico com cerca de 45 espécies, que se espalham do Leste dos Estados Unidos ao Estreito de Magalhães na América do Sul. No Paraná, foram descritas cinco espécies - *nigripes*; *flavescens*; *nitidus*; *ratticeps* e *eliurus* (LANGE & JABLONSKI, 1981). Os dados citogenéticos têm mostrado, neste gênero, uma ampla variabilidade cromossômica devido a ocorrência de uma série de mecanismos, tais como inversão pericêntrica em *O. nigripes* ($2n= 62$), alterações na quantidade de heterocromatina constitutiva nos cromossomos sexuais - *O. nigripes* e *O. flavescens* ($2n= 64$ a 66), e presença de cromossomos B em *O. flavescens*, entre os achados mais significativos (SBALQUEIRO, 1989). Duas destas espécies - *ratticeps* e *eliurus* - ainda não foram estudadas citogeneticamente em nosso Estado.

Há uma certa confusão taxonômica envolvendo o gênero *Oligoryzomys*, que até recentemente se constituía em um subgênero de *Oryzomys*, e que foi elevado a esta

categoria por CARLETON e MUSSER (1989). Várias espécies estão incluídas em *Oligoryzomys*, a destacar: *O. flavescens*, *O. nigripes*, *O. fornesi*, entre outros.

Os roedores do gênero *Oligoryzomys* são muito delicados, de pequeno tamanho, o que contrasta com *Oryzomys*, que é comparativamente maior e mais robusto. Distribuem-se desde o México até a Terra do Fogo (Olds e Anderson, 1987; Emmons e Feer, 1990, *apud* MIRANDA 2000). Algumas espécies podem ser hospedeiras do hantavírus (Powers e col, 1999 *apud* MIRANDA).

No Uruguai e Argentina (BRUM-ZORRILA *et al.*, 1988) e no sul do Brasil (MATTEVI *et. al.*, 1981 e SBALQUEIRO, 1989) estudaram a espécie *Oryzomys delticola*, descrevendo o cariótipo de 62 cromossomos. Outros trabalhos realizados no Brasil na mesma década revelaram o mesmo cariótipo só que para a espécie identificada como *Oryzomys nigripes*. De acordo com ALFREDO LANGGUTH (1988, comunicação pessoal em SBALQUEIRO (1989)), deve-se considerar todos os exemplares de mesmo cariótipo como pertencentes à espécie *O. nigripes*, sendo *O. delticola* considerada sinonímia. Nesta espécie é freqüente a variação no número de braços autossômicos devido à ocorrência de inversões pericêntricas.

As variações no cariótipo de *Oligoryzomys flavescens*, $2n=64$ a $2n=66$, é devida à presença de cromossomos B. Esta espécie fenotipicamente é caracterizada pelo tamanho pequeno, orelhas pequenas e cauda e pés longos. Dorsalmente ela é marrom-alaranjado e ventralmente amarelo-acinzentado (LANGGUTH, 1963, FORNES e MASSOIA, 1965 *apud* SBALQUEIRO, 1991). Eles ocorrem no Brasil, Uruguai e Argentina.

Tanto as variações cromossômicas inter e intraespecíficas bem como a não ocorrência das mesmas dentro das espécies de mamíferos têm sido usadas, muitas vezes, no sentido de se estabelecer relações de afinidade filogenéticas, acrescentando contribuições importantes às filogenias previamente inferidas a partir de caracteres morfométricos, bioquímicos, etc.

Por outro lado, a aplicação crescente das técnicas de bandeamento, que revelam uma estrutura mais íntima e própria de cada cromossomo, tem proporcionado um aumento não só na qualidade e quantidade destas informações, como, também, na conseqüente análise e interpretação dos achados cromossômicos.

Desta forma, a análise cariotípica feita através do bandeamento cromossômico, conforme SBALQUEIRO (1989) e OLIVEIRA (1996, 2001), é extremamente útil a uma

abordagem cladística, pois, por tais métodos, é possível inferir os números e tipos de rearranjos do genoma que são ou não compartilhados pelas espécies.

Estudos filogenéticos envolvendo os orizominos, em especial as espécies de *Oligoryzomys*, são pouco consistentes, principalmente entre aquelas que ocorrem em solo brasileiro. Por outro, os achados citogenéticos existentes, em particular neste gênero, demonstram mecanismos cromossômicos complexos, capazes de contribuir ao esclarecimento da evolução dos cariótipos, porém são ainda, em grande parte, limitantes e não conclusivos.

Vê-se, portanto a importância e a necessidade de avaliar o estado atual da diversidade cariotípica nas espécies dos gêneros de orizominos, em particular em *Oligoryzomys*, ocorrentes no Sul do Brasil e, conseqüentemente, suas implicações evolutivas.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi contribuir para um melhor entendimento citotaxonômico das espécies de *Oligoryzomys* ocorrentes na região Sul do Brasil, em especial nos Estados do Paraná e Santa Catarina, analisando-as citogeneticamente e comparando seus cariótipos com os já descritos na literatura pertinente.

Para tal, pretendeu-se:

- a) Determinar os cariótipos em coloração comum e bandamentos C, G e RON dos exemplares coletados em diferentes regiões dos dois Estados;
- b) Identificar os cariótipos das espécies do presente trabalho e compará-los com os descritos na literatura, contribuindo desta forma para a ampliação da distribuição geográfica das formas cromossômicas conhecidas;
- c) Inferir possíveis mecanismos cromossômicos na diferenciação cariotípica entre as duas espécies, fundamentando-se nos padrões de bandeamento G.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os exemplares que compõem a amostra estudada compreendem animais já analisados e que fazem parte do acervo do Laboratório de Citogenética Animal da UFPR e aqueles estudados no presente trabalho.

Os dados gerais pertencentes tanto ao acervo como os dos analisados na presente amostra estão na tabela 01, onde se destacam os dados cariotípicos e seus respectivos locais de coletas (Mapas 01 e 02, em anexo), somando um total de 197 exemplares.

ESPÉCIE	2n	NA	M	F	LOCALIDADES	referência
<i>O. nigripes</i>	62	80	31	20	2,3,5,11,13,15,16,18,20	AL, PT
	62	81	50	39	1,2,3,4,5,6,7,8,10,11,12, 13,14,16,17,19,20	AL, PT
	62	82	23	13	3,4,,6,10,11,16,18,19,20	AL, PT
TOTAL			176		20 localidades	
<i>O. flavescens</i>	64	66	07	05	2,3,7	AL, PT
	65	67	02	03	2	AL
	66	68	03	01	2,3,9,20	AL, PT
TOTAL			21		5 localidades	

Tabela 01: Distribuição das duas espécies de oligoryzomídeos do acervo do Laboratório de Citogenética Animal (AL) e do presente trabalho (PT), de acordo com 2n/NA e respectivas localidades de coletas: 1) Guarapuava/PR; 2) Curitiba/PR; 3) S. J. dos Pinhais/PR; 4) Telêmaco Borba/PR; 5) Al. Tamandaré; 6) São João do Triunfo; 7) São Mateus do Sul; 8) Tijucas do Sul; 9) Três Barras do Paraná; 10) Campo Largo; 11) Itaipu; 12) Morretes; 13) Mandirituba; 14) Jaquariaiva; 15) Quaraqueçaba; 16) Paranaguá; 17) Colombo; 18) Piraquara; 19) Ita/SC; 20) São Domingos/SC

A coleta de São Domingos foi realizada num local que seria inundado posteriormente para construção de uma represa; como os animais morreriam de qualquer maneira, foi realizada uma coleta em massa dos roedores daquela região para estudo científico.

Os animais foram coletados com a utilização de armadilhas tipo gaiola ou Sherman contendo iscas de milho com pasta de amendoim e, em algumas ocasiões, iscas de milho com pasta de sardinha, trigo e paçoca.

As peles e os crânios foram tombados em diferentes locais: na coleção de roedores do Departamento de Genética-UFPR e coleção de mamíferos da FURB-Blumenau-SC.

3.1. OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS

Os cromossomos analisados são provenientes dos núcleos de linfócitos, os quais são encontrados em grande quantidade na medula óssea. Desta forma foi utilizada a técnica direta de FORD e HAMERTON (1956), com algumas alterações conforme SBALQUEIRO E NASCIMENTO (1996):

1 – Aplicação de colchicina 0,1% (diluída em solução isosmótica de NaCl – 0,9g % –), por via intra-peritonial, na dose de 1 ml de solução de colchicina para cada 100 g de peso corporal;

2 – Padronização do tempo de uma hora para ação da colchicina.

3 – Sacrifício do animal em uma cuba de vidro contendo algodão embebido em éter.

4 – Incisão logitudinal no abdomen do animal para retirada dos fêmures e corte das epífises.

5 – Perfusão do fêmur, com auxílio de uma seringa com agulha, com 5 ml de solução hipotônica de KCl (0,075 M), para retirada da medula óssea e posterior centrifugação por 15 minutos.

6 – Ressuspensão do material com pipetas Pasteur, evitando-se a formação de bolhas.

7 – Pré-fixação do material com 0,5 ml de fixador Carnoy (3 álcool metílico : 1 ácido acético), no tubo de centrifuga, com nova ressuspensão cuidadosa.

8 – Centrifugação manual, em 800 a 1.000 r.p.m., por 5 minutos.

9 – Retirada do sobrenadante (KCl), com o auxílio de pipeta Pasteur, com acréscimo de 5 ml de fixador e nova ressuspensão.

10 – Manutenção do tubo, com 5 ml de fixador, em congelador, ou em ambiente fresco quando da preparação no próprio local da coleta..

3.2. PREPARAÇÃO DE LÂMINAS

O material permaneceu estocado em congelador até o momento de preparação das lâminas, quando o material foi então retirado, ocorrendo três trocas de fixador. O material foi gotejado (duas a três gotas) sobre a lâmina e analisado ao microscópio óptico, dependendo da técnica de coloração utilizada.

3.3. TÉCNICAS DE COLORAÇÃO

3.3.1. COLORAÇÃO CONVENCIONAL

Para coloração convencional, as lâminas foram incubadas por 5 a 10 minutos em solução de tampão fosfato - pH 6,8, com corante Giemsa (eosina - azul de metileno) a 5%, em seguida lavadas rapidamente em água corrente e secas.

3.3.2. BANDEAMENTO CBG

O bandamento CBG proporciona a visualização de bandas C, através da aplicação de bário e corante Giemsa. A técnica a ser utilizada foi adaptada a partir da descrição original de SUMNER (1972). Esta banda marca regiões de heterocromatina constitutiva, e é obtida da seguinte maneira:

- 1 – Lâminas preparadas no dia.
- 2 – Incubação das lâminas em solução de HCl 0,1N, por 2 minutos e lavagem em H₂O destilada.
- 3 – Incubação em solução de bário a 5%, a 45°C, por 15 segundos (podendo variar o tempo).
- 4 – Incubação em solução de HCl 0,1N, a 60°C, por 5 segundos e lavagem em água destilada.
- 5 – Incubação em solução salina 2SSC, a 60°C, por 15 minutos.
- 6 – Lavagem em água destilada e incubação em tampão fosfato pH 6,8, a temperatura ambiente, por 2 minutos.
- 7 - Coloração com Giemsa a 5% (diluído em solução de tampão fosfato, pH 6,8), por 8 minutos.

8 – Lavagem em água corrente filtrada, secagem e observação ao microscópio.

3.3.3. BANDEAMENTO GTG

O bandamento GTG evidencia bandas G, obtidas com o uso de tripsina e corante Giemsa. As bandas (faixas) surgem em cor clara e escura intercaladas. Foi utilizada a técnica de SEABRIGHT (1971), com alterações citadas a seguir:

- 1 – Preparo das lâminas e envelhecimento por 5 dias em estufa a 50° C.
- 2 – Incubação das lâminas em tampão fosfato pH 6,8, por 2 minutos.
- 3 - Incubação em solução de tampão fosfato pH 6,8, com tripsina a 0,03% (dissolvida em tampão fosfato, pH 6,8), por 15 segundos (podendo variar o tempo para mais ou para menos).
- 4 – Rinçagem rápida em água destilada, álcool etílico P.A. e água destilada.
- 5 – Incubação em tampão fosfato, pH 6,8, por 1 minuto.
- 6 – Coloração com Giemsa tamponado (pH 6,8), a 2,5%, por 5 minutos; lavagem em água filtrada e observação ao microscópio.

3.3.4. BANDEAMENTO RON

A técnica de HOWELL e BLACK (1980), com algumas modificações, foi utilizada para observação de regiões organizadoras de nucléolo. A técnica consistiu em:

- 1 – Preparo das lâminas e envelhecimento por 5 dias, no mínimo, a 50°C.
- 2 – Incubação das lâminas em tampão borato pH 9,2, por 5 a 10 minutos.
- 3 – Lavagem em água destilada e secagem ao ar.
- 4 – Pipetagem sobre cada porção de material na lâmina: duas gotas de solução coloidal (0,25 g de gelatina + 5 ml de água bidestilada aquecida + 0,2 ml de ácido fórmico).
- 5 – Pipetagem sobre cada porção de material na lâmina: quatro gotas de solução de prata a 50% (1 g de prata + 2 ml de água bidestilada + duas gotas de formalina).
- 6 – Homogeneização das soluções gotejadas sobre a lâmina com pipeta Pasteur.
- 7 – Cobertura com laminula, colocação em uma câmara úmida (placa de Petri com papel filtro umedecido), manutenção em estufa a 70°C até atingir cor castanho-dourada (\pm 8 a 12 minutos).

8 – Lavagem em água destilada.

9 – Coloração com Giemsa (tamponado pH 6,8) a 2%, por 1 minuto; lavagem, secagem e observação ao microscópio.

3.4. ANÁLISE DO MATERIAL

De cada exemplar foram analisadas em média 10 células coradas pelo método convencional. Foram selecionadas as três melhores para as montagens dos kariogramas. Para a caracterização dos padrões de bandeamentos, após análise ao microscópio, foram igualmente selecionadas e fotografadas as melhores metáfases.

3.5. FOTOMICROGRAFIAS

Os melhores pontos escolhidos durante a análise foram fotografados em câmera fotográfica Winder M35, acoplada em microscópio óptico Carl Zeiss, com o auxílio de câmera fotográfica adicional MC63A.

O filme preto e branco e o papel fotográfico utilizados foram o Copex Pan eo Kodabromide F – 3, respectivamente.

3.6. MONTAGEM DE KARIOGRAMAS

Os kariogramas foram montados pareando-se os cromossomos homólogos e ordenando-os pelo tamanho e morfologia. A nomenclatura utilizada fundamentou-se naquela descrita para cada uma das espécies por SBALQUEIRO (1989).

A montagem de kariogramas foi realizada apenas para os cromossomos em coloração convencional, tendo em vista que os padrões de bandeamentos não foram satisfatórios.

A análise das metáfases e a montagem de kariogramas também foram feitas em um sistema de captura de imagens, acoplado ao fotomicroscópio.

3.7. ANÁLISE KARIOTÍPICA COMPARATIVA

Visando identificar os cromossomos compartilhados entre estas duas espécies, bem como os mecanismos que podem ter atuado na diferenciação cariotípica das mesmas, foram realizadas comparações entre os padrões de bandeamento G das duas espécies. Em virtude dos padrões de bandas obtidas nos exemplares do presente trabalho serem pouco esclarecedoras, utilizamos as fotomicrografias em bandas G apresentadas por SBALQUEIRO (1989). Para esta análise comparativa foram considerados apenas os cromossomos maiores de cada cariótipo com o intuito de assegurar uma maior confiabilidade em tal tipo de estudo.

4. RESULTADOS

4.1. *Oligoryzomys nigripes*

Os exemplares de *O. nigripes* analisados apresentaram número cromossômico de $2n=62$ e de braços autossômicos, NA, variando de 80 a 82, com 11 pares de cromossomos com dois braços (metacêntricos ou submetacêntricos), 20 pares de cromossomos acrocêntricos e o par sexual composto de um X submetacêntrico, tanto nos machos como nas fêmeas (Figura 01), e de um Y heteromórfico, apresentando-se com duas formas: submetacêntrica ou metacêntrica (Figura 02).

Dos 60 animais capturados em São Domingos, apenas 31 foram analisados citogeneticamente, sendo 06 de *O. flavescens* e 25 de *O. nigripes*. Em 21 exemplares desta foram analisados quanto à morfologia do cromossomo 3 – se acrocêntrico ou metacêntrico -, onde o par 3 mostrou-se em três estados cariomorfológicos: 42,86% (nove animais) em heterozigose; 33,33% (sete animais) homozigoto para a acrocêntrica e 23,81% (cinco animais) homozigoto para metacêntrica (Figura 3). No Paraná os 16 exemplares mostraram-se homozigotos para a forma metacêntrica (NA=82).

O teste do X^2 feito para a amostra de São Domingos não se mostrou significativo ao nível de 5%, ($\alpha^2 = 0,765$; gl = 1; $p > 0,30$), indicando que a população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, sugerindo que essa alteração cromossômica não se constitui uma barreira meiótica nesta população, ou seja os animais podem potencialmente se cruzar e gerar descendentes férteis, independentemente da morfologia do cromossomo 3.

A banda C não se mostrou satisfatória para uma análise mais aprimorada, mas o padrão obtido mostrou marcações pericentroméricas em todos os autossomos (Figura 4). Os cromossomos sexuais, apesar das marcações não serem conspícuas, mostraram uma marcação no braço curto do X e de todo o cromossomo Y.

O bandeamento RON mostrou marcação na região telomérica do braço menor em pelo menos dois pares de cromossomos acrocêntricos pequenos (Figura 05).

Não se obteve um padrão satisfatório em banda G.

4.2. *Oligoryzomys flavescens*

Dos seis exemplares coletados em São Domingos - SC, apenas um foi analisado citogeneticamente, apresentando $2n=66$ e $NA=68$, mostrando 30 pares de acrocêntricos, incluindo os cromossomos B e menores do complemento, e dois pares de cromossomos metacêntricos que além de pequenos são de difícil visualização (Figura 6). Nesta figura observa-se ainda o cromossomo X, que é submetacêntrico grande, e o Y igualmente submetacêntrico, porém pequeno; igualmente ao que ocorre em um exemplar de São José dos Pinhais.

Os outros dois exemplares de São José dos Pinhais – PR, mostraram um cariótipo com 64 cromossomos ($NA=66$), que diferiu dos demais pela ausência de um par de acrocêntricos pequenos, provavelmente cromossomos B.

A banda C mostrou marcações de heterocromatina constitutiva em blocos pericentriméricos em todos os autossomos (Figura 7). Nesta figura ainda pode-se observar a presença de dois cromossomos todo marcado, confirmando a presença de cromossomo B (seta indicando) nesta espécie.

O bandamento RON de *O. flavescens* revelou de duas a três marcações por célula, como é indicada na metáfase da Figura 8.

O padrão do bandamento G, tal qual ocorreu com a outra espécie, também não foi satisfatório.

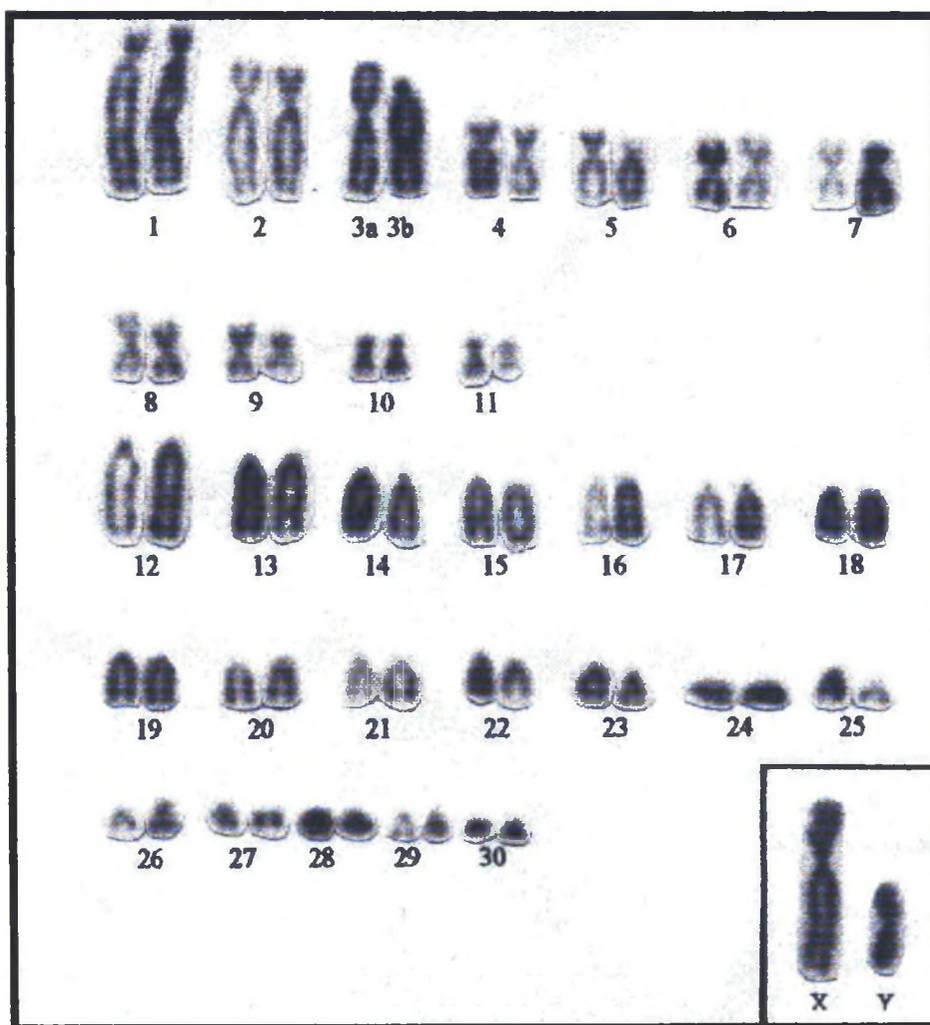


Figura 01: Cariograma de *O. nigripes*.

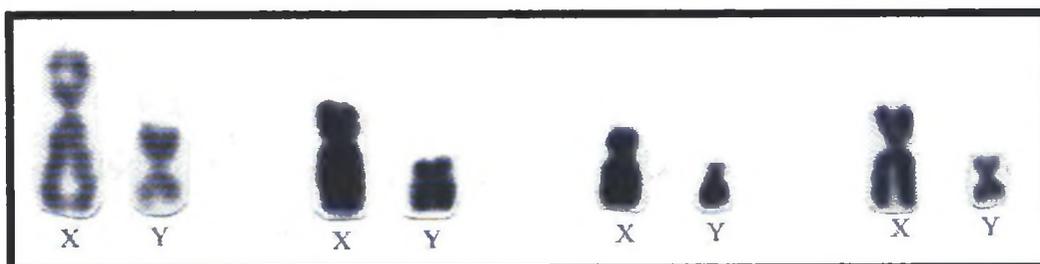


Figura 02: Heteromorfismo dos cromossomos sexuais em machos de *O. nigripes*, exemplos.



Figura 03: Heteromorfismo do par 03 de *O. nigripes*.

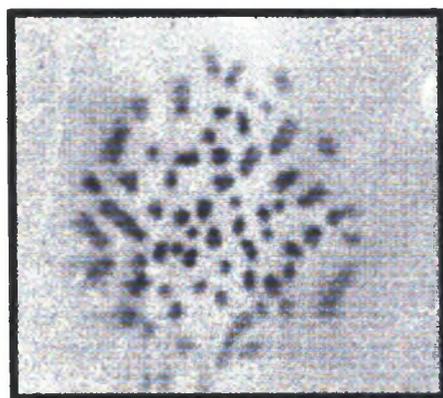


Figura04: Banda C de *O. nigripes*.

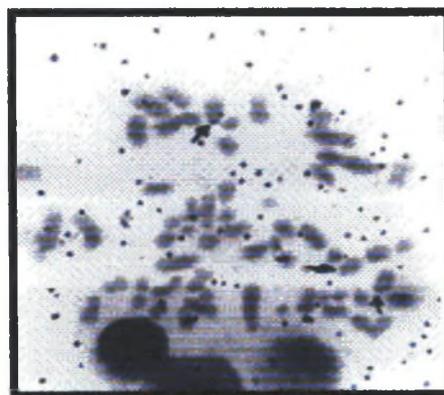


Figura 05: Banda RON de *O. nigripes*

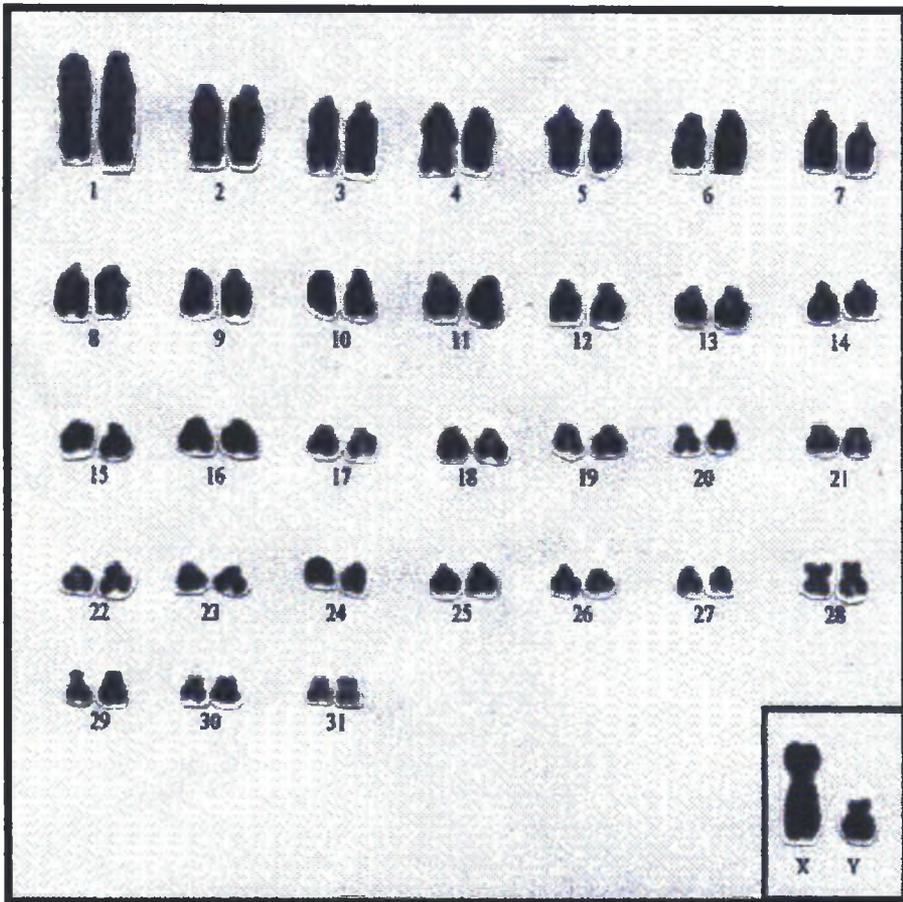


Figura 06: Cariograma de *O. flavescens*.

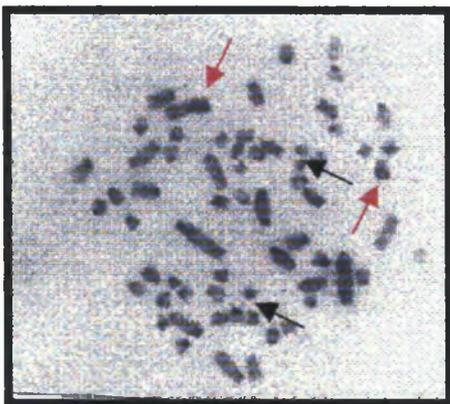


Figura 07: Banda C de *O. flavescens*.
Flecha indicando os Bs e os sexuais

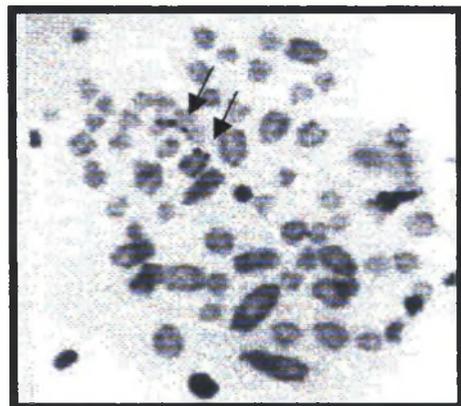


Figura 08: Banda RON de *O. flavescens*.
Flecha indicando as RONs

4.3. Distribuição geográfica

O levantamento dos animais que compõem o acervo do Laboratório de Citogenética Animal juntamente com as coletas realizadas para o presente trabalho, revelou uma ampla distribuição geográfica de ambas as espécies - *O. flavescens* e *O. nigripes* -, nos Estados do Paraná e Santa Catarina, estando presentes em pelo menos 20 municípios, como mostra a Tabela 01, sendo que na maioria correspondem aos primeiros registros, exceto a região metropolitana de Curitiba, ao passo que em quatro localidades estão em simpatria: Curitiba, São José dos Pinhais, São Mateus do Sul e São Domingos.

4.4. Comparação dos padrões de bandas G entre as duas espécies

Uma análise comparando os padrões de bandas G das duas espécies foi realizada revelando que os cromossomos acrocêntricos 1, 3 e 4 de *O. flavescens* correspondem, respectivamente, aos cromossomos de dois braços (submeta ou metacêntricos) 1, 3 e 2 de *O. nigripes* (Figura 09). Nesta figura nota-se a grande similaridade existente entre os padrões de bandas envolvendo os três cromossomos, sugerindo que a inversão pericêntrica seja o mecanismo mais provável pelas modificações nas morfologias destes cromossomos. Além disso, confirma-se como sendo este mesmo mecanismo a origem da diferenciação entre os cromossomos 3a e 3b em *O. nigripes*. Por outro lado, o cromossomo 3b mostra-se homeólogo ao 3 de *O. flavescens*, similares tanto na morfologia como na sequência de bandas.

A diferença no número de cromossomos observada entre os cariótipos básicos das duas espécies - 62 e 64 -, não pode ser identificada pelos mesmos padrões de bandas G.

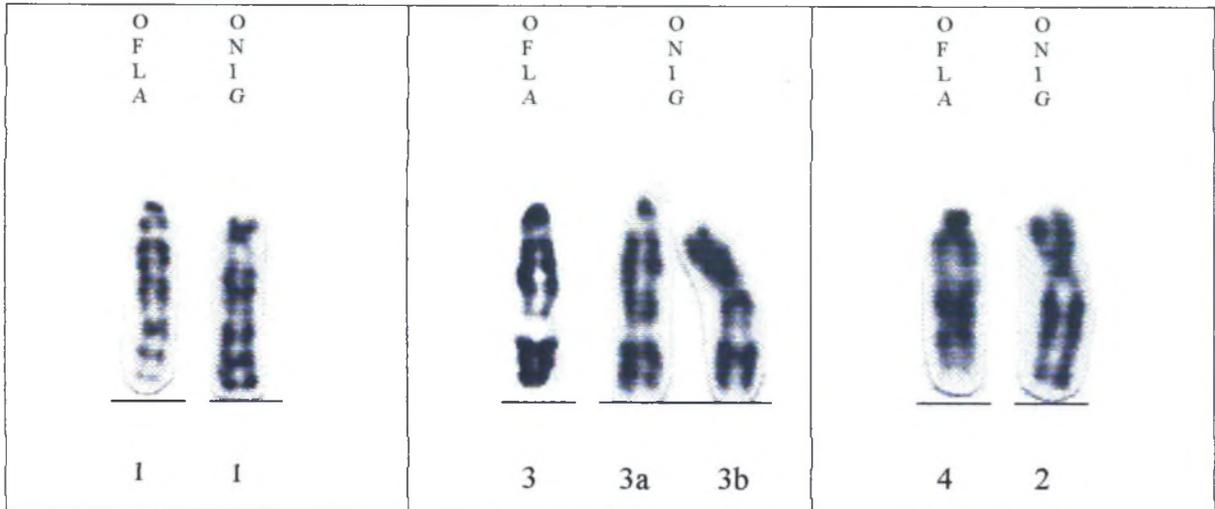


Figura 09: Análise comparativa de bandas de *O. flavescens* e *O. nigripes*, em bandamento G.

5. DISCUSSÃO

O. nigripes, que se distribui da região Sul ao Nordeste (LANGE, 1991), apresentou o $2n=62$, e o NA variando de 80 a 82, como consequência de inversão pericêntrica no par 3, originando duas formas cromossômicas distintas – acrocêntrica e submetacêntrica. Esta variação foi observada apenas nos exemplares de São Domingos-SC, ao passo que nos do Paraná houve uma constância. A observação das duas morfologias cromossômicas – submeta-metacêntrica e acrocêntrica – é relativamente comum nas diferentes localidades estudadas e, de acordo com SBALQUEIRO (1989), no Brasil a maior frequência das inversões pericêntricas ocorre no par 3, ao passo que nos demais pares esse mecanismo mostra-se menos frequente: em exemplares da Bahia (par 2), de São Paulo (pares 4 e 8) e do Rio de Janeiro (par 10). De acordo com ALMEIDA et al. (1991), em *O. nigripes* o cariótipo padrão seria aquele correspondente ao $2n=62$ com NA=82, podendo ocorrer variações no NA devido principalmente, a mecanismos de inversões pericêntricas. Discordamos destes autores quanto ao cariótipo padrão com NA=82 tendo em vista as comparações em bandas G que realizamos entre esta espécie e *O. flavescens*. Segundo ainda esses, as inversões ocorrem preferencialmente nos autossomos dos pares 3, 4 e 8, podendo ser homocigotos ou heterocigotos para as inversões, além de variações na morfologia e no tamanho do par sexual. SBALQUEIRO (1989), encontrou estas mesmas variações estruturais no par 10 de *O. nigripes*.

Bonvicino (2001), ao analisar casos de inversão pericêntrica no par 03 de outras populações de *O. nigripes*, também concluiu que as diferentes formas cromossômicas se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg quando as populações foram analisadas isoladamente, apesar de ter sido encontrado um excesso de animais heteromórficos e poucos exemplares com o par 3 homomórfico para a forma acrocêntrica.

Segundo PARKIN (1979), a manutenção do polimorfismo é explicada através de um modelo simples que trata da vantagem seletiva ao heterocigoto: viabilidade superior, fertilidade ou fecundidade superior do próprio genótipo ou uma vida reprodutiva mais longa. Como resultado o heterocigoto mostra um valor adaptativo aumentado e deixa, relativamente, mais descendentes do que demais genótipos.

Tanto o padrão de banda C, pericentromérico nos autossomos e braço menor no X ou todo o cromossomo Y, como o de RON, quatro marcações, mostraram-se similares aos descritos em exemplares do Sul do Brasil (SBALQUEIRO, 1989; SBALQUEIRO et al., 1991) e Sudeste (ALMEIDA, 1991).

O heteromorfismo detectado no cromossomo Y — submetacêntrico e metacêntrico — pode ser atribuído a dois mecanismos: ou inversão pericêntrica ou variações na heterocomatina constitutiva (deleção ou duplicação). Estas alterações já foram observadas por SBALQUEIRO (1989) em animais coletados no Rio Grande do Sul.

Os exemplares da espécie *Oligoryzomys flavescens* - distribuída no Brasil, Uruguai e Argentina -, estudados no presente trabalho mostraram uma variação numérica de $2n=66/NA=68$ e $64/66$, respectivamente, devido à ocorrência de dois cromossomos B. Estes achados confirmam aquele encontrado por SBALQUEIRO (1989) e SBALQUEIRO et al. (1991), MIRANDA (2000) e LIMA (2000). O mesmo verifica-se também com o padrão de banda C, que é pericentromérica nos autossomos, braço curto do X e todo o cromossomo Y.

Até este momento pouco se sabia acerca da distribuição destas espécies no Sul do Brasil tendo por base estudos citogenéticos, porém com este trabalho tem-se uma idéia mais real da suas dispersões, principalmente nos Estados do Paraná e Santa Catarina. Assim, estão sendo descritos os cariótipos das mesmas em 20 municípios – 18 no Paraná e 2 em Santa Catarina. O *nigripes* está presente na grande maioria destes locais (19), ao passo que *O. flavescens*; em cinco deles. Ambas comungam do mesmo ambiente (simpátricas) em quatro localidades: Curitiba, São José dos Pinhais e São Mateus do Sul, no Paraná, e São Domingos, em Santa Catarina. Estas duas espécies estão amplamente distribuídas no Brasil, tendo seus cariótipos já descritos desde a região Sul até o Nordeste. No Paraná, baseando-se nos dados do presente trabalho, nota-se que *O. nigripes* distribuiu-se desde o Litoral até o Terceiro Planalto (Foz do Iguaçu), sendo evidente que sua ocorrência deva também ser estendida a outras regiões do Estado, porém não dispomos de tais dados para afirmarmos com segurança. Por outro lado, fundamentados neste mesmos dados, *O. flavescens* apresenta uma distribuição mais restrita – cinco localidades -, mas isto não significa que ela não esteja presente nas demais regiões e, sim, refletir, entre outros fatores, a densidade populacional desta espécie quando da realização das coletas.

A análise comparativa dos padrões de bandas G entre as duas espécies, apesar de ter sido restrita a poucos cromossomos, possibilitou a inferência sobre alguns dos mecanismos que devem ter contribuído às diferenças numéricas e morfológicas observadas entre os cariótipos das mesmas. Exceptuando-se os cromossomos Bs presentes em *O. flavescens*, os padrões de bandeamento sugerem a participação, principalmente, de inversões pericêntricas na diferenciação morfológica dos cromossomos 1, 3 e 4, em *O.*

flavescens, em relação aos cromossomos 1, 3 e 2, em *O. nigripes*. O fato desta espécie apresentar principalmente duas morfologias alternativas no par 3, onde uma delas, a acrocêntrica (3b), apresenta um padrão de banda G similar ao verificado no cromossomo acrocêntrico 3 de *O. flavescens*, sugere ser esta a morfologia que possivelmente esteve presente em um ancestral comum às duas espécies. Além disso, e reforçando a hipótese da inversão pericêntrica, a banda C em ambas espécies mostrou-se pericentromérica nos autossomos, mostrando a inexistência de braços heterocromáticos, que seria um outro mecanismo responsável pela origem de braços cromossômicos. Se assim aconteceu, então poderíamos estender à maioria dos demais cromossomos esta hipótese. Evidentemente que para a confirmação desta, há necessidade que a mesma comparação seja efetuada com outras espécies, inclusive de gêneros e tribos diferentes. A diferença no $2n$ pode ser atribuída a mecanismos que conduzem à condensação cariotípica, tais como fusões cêntricas ou em tandem, no entanto os padrões de bandeamentos apresentados pelos cromossomos não permitiram alguma conclusão a este respeito. Neste caso, a utilização de uma metodologia mais sofisticada, como FISH, possa solucionar este problema.

6. CONCLUSÕES

Foram estudadas citogeneticamente duas espécies de *Oligoryzomys* coletadas em várias localidades do Sul do Brasil, onde observou-se variações estruturais e numéricas.

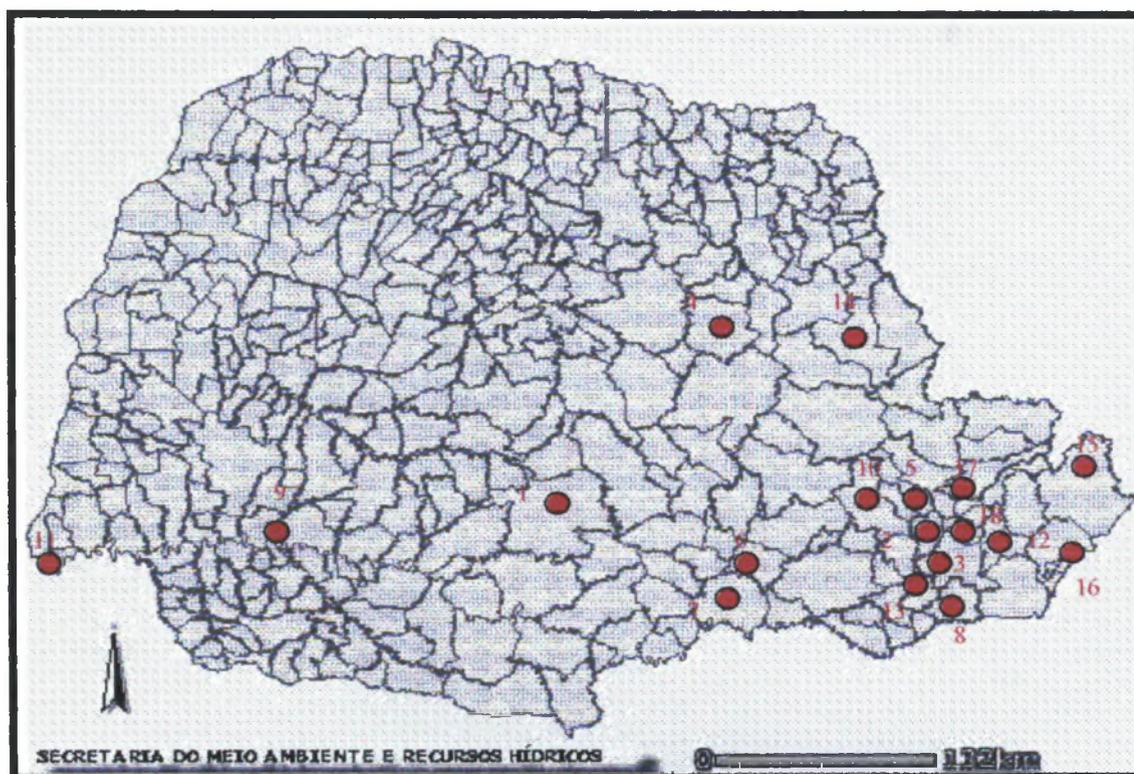
Oligoryzomys nigripes: A variação cariotípica observada nesta espécie, $2n=62$ e $NA=80$ a 82 , deve-se às alterações estruturais, do tipo inversão pericêntrica, tanto no par 3 ($NA=80$ a 82), como no cromossomo Y (formas metacêntrica e submetacêntrica). A heterocromatina distribuiu-se na região pericentromérica de todos os autossomos, e nos sexuais restringiu-se ao braço curto do X e todo o Y. Esta variação não foi observada nos animais do Paraná.

Oligoryzomys flavescens: Foram observados dois cariótipos distintos: $2n=64/NA=66$ (S. José dos Pinhais/PR) e $2n=66/68$ (S. Domingos/SC), devido a presença de cromossomos B revelada pelo padrão de bandeamento C.

Consideramos importantes os achados citogenéticos aqui apresentados, do ponto de vista citotaxonômico, pois representam os primeiros estudos para estas regiões – Paraná e Santa Catarina -, ampliando assim a distribuição geográfica das formas cromossômicas encontradas. Além disso, verificamos em diversos locais que as duas espécies são simpátricas.

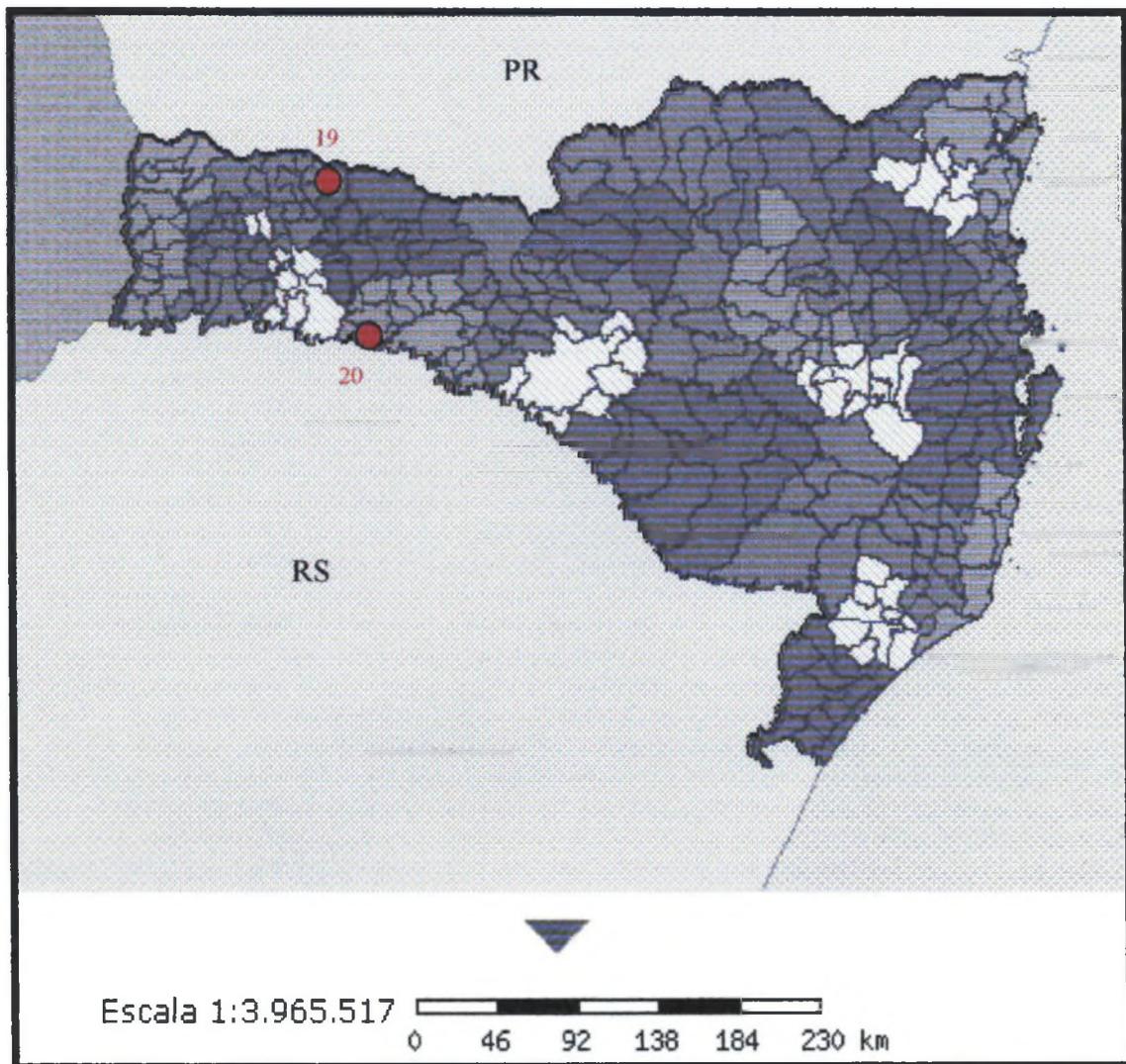
A análise comparativa dos padrões de bandas G entre as duas espécies sugere a ocorrência de inversão pericêntrica como um dos possíveis mecanismos responsável pela diversidade cariotípica existente entre elas, além de apontar a forma acrocêntrica como, possivelmente, sendo a mais ancestral.

7. ANEXOS



Anexo 1: Mapa da distribuição de oligoryzomynos no Estado do Paraná.

- 1) Guarapuava/PR; 2) Curitiba/PR; 3) S. J. dos Pinhais/PR; 4) Telêmaco Borba/PR; 5) Al. Tamandaré;
6) São João do Triunfo; 7) São Mateus do Sul; 8) Tijucas do Sul; 9) Três Barras do Paraná; 10) Campo Largo; 11) Itaipu; 12) Morretes; 13) Mandirituba; 14) Jaquariaiva; 15) Guaraqueçaba; 16) Paranaguá;
17) Colombo; 18) Piraquara.



Anexo 2: Mapa da distribuição de oligoryzomys no Estado de Santa Catarina.

19) Itá; 20) São Domingos

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Eunice J. C. de. & Yonenaga-Yassuda, Yatyó, 1991. **Pericentric inversions and sex chromosome heteromorphisms in *Oryzomys nigripes* (Rodentia, Cricetidae).** *Caryologia*, vol. 44, n 1:63-73.

BONVICINO, Cibele R. et al., 2001. **Pericentric inversion in natural populations of *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia: Sigmodontinae).** *Genome* 44: 791-796.

CRISCI, J.V. & ARMENGOL, M.F.L., 1983. **Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica.** OEA, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Monografía. Serie de Biología, n.º 26, 132p.

FORD, C.E. & HAMERTON, J.L., 1956. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosome. *Stain Tech.*, 31: 247-51.

FORD, C.E. & EVANS, E.P., 1969. Meiotic preparation from mammalian testes. In: BÉNIRSCHKE, K., *Comparative mammalian cytogenetics.* Berlin, Springer-Verlag. p. 461-4.

GARDNER, A.L. & PATTON, J.L. 1976. Karyotypic variation in oryzomyine rodents (Cricetinae) with comments on chromosomal evolution in the neotropical cricetine complex. *Occas. Pap. Mus. Zool.*, (49): 1-48.

HENNIG, W., 1965. Phylogenetic systematics. *Ann. Rev. Entom.*, 10: 97-116.

KING, M., 1993. **Species evolution. The role of chromosome change.** 1 ed., N.York, Cambridge University Press, 336p.

LANGE, R. B. & JABLONSKY, E.F., 1981. Lista prévia dos Mammalia do Estado do Paraná. *Estudos de Biologia* (Universidade Católica do Paraná), (6): 1-30.

LAU, Y.F. and F. ARRIGHI, 1977. Comparatives studies of N-banding and silver staining of NORs in human chromosomes. In: DRETS, M.E. and cols., **Congresso Latino Americano de Genética**, 3, Montevideo, p. 49-55.

LIMA, J. F.S, 1998. **Diversidade cariológica de roedores de pequeno porte do Estado do Tocantins, Brasil**. Tese de doutorado, Rio Claro, SP, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências.

MIRANDA, J. A., 2000. **Os cariótipos dos orizominos e tomasominos do cerrado e de outros locais do Brasil**. Tese de doutorado, P. Alegre, RS, Departamento de Genética, UFRGS.

PARDIÑAS, J. F. U., D'ELIA G. e ORTIZ P. E., 2002. **Sigmodontinos fósiles (Rodentia, Muroidea, Sigmodontinae) de América Del Sur: Estado actual de su conocimiento e prospectiva**. *Mastozzologia Neotropical/ J. Neotrop. Mammal.*; 9(2): 209-252.

REIG, O.A., 1984. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sul-americanos (Cricetidae : Sigmodontinae) **Rev. Brasil. Genet.**, 7:333-65.

ROBBINS, L.W. and R.J. BAKER, 1981. An assessment of the nature of chromosomal rearrangements in 18 species of *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae). **Cytogenet. Cell Genet.**, 31:194-202.

SBALQUEIRO, I. J., 1989. **Análises cromossômicas e filogenéticas em algumas espécies de roedores da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre-RS, Tese de Doutorado, Departamento de Genética, UFRGS.

SBALQUEIRO, I. J. et al., 1991. **B chromosome system in populations of *Oryzomys flavescens* (Rodentia, Cricetidae) from southern Brazil**. *Acta Theriologica* 36 (1-2): 193-199.

SBALQUEIRO, I. J. e NASCIMENTO, A. P., 1996. **Occurrence of *Akodon cursors* (Rodentia, Cricetidae) with 14, 15 and 16 chromosome cytotypes in the same geographic area in Southern Brazil.** Brazilian Journal of Genetics, 19, 4 565-569.

SEABRIGHT, M., 1971. A rapid technique for human chromosomes, **Lancet.**, 21: 971-72.

SILVA, Maria José de J., 1994. **Estudos citogenéticos e de complexos sinaptonêmicos em roedores brasileiros da Tribo Oryzomyini (Cricetidae, Rodentia).** Tese de Mestrado. Instituto de Biociências – USP.

SUMNER, A. T., 1972. a simple technique for demonstrating centomeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 75: 304-6.

VAUGHAN, T.A., 1978. **Mammalogy.** 2.ed., Philadelphia, W.B. Saunders Company, 522p.

WHITE, M. J. D., 1978. **Modes of speciation.** San Francisco, W.H. Freeman and Company, 455.