

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**Suelen E. Bordignon**

**Análise da variabilidade cromossômica e distribuição geográfica de duas espécies de *Oligoryzomys* (Rodentia, Cricetidae) ocorrentes nos Estados de Santa Catarina e Paraná.**

**CURITIBA/2007**

**Suelen E. Bordignon**

**Análise da variabilidade cromossômica e distribuição geográfica de duas espécies de *Oligoryzomys* (Rodentia, Cricetidae) ocorrentes nos Estados de Santa Catarina e Paraná.**

Trabalho realizado como parte das exigências para a obtenção do grau de “Bacharel” no Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ives J. Sbalqueiro (DGEN – SCB/UFPR).

**CURITIBA/ 2007**

*Aos meus pais pela dedicação e incentivo durante todo curso, pelo amor e por tudo que significam para mim...*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Ives J. Sbalqueiro, pela dedicação, simpatia e presteza no auxílio às atividades e discussões sobre o andamento e normatização desta Monografia de Conclusão de Curso e pela oportunidade de estágio no Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal do Paraná.

Aos colegas de estágio e amigos Cristiani M. S. Justo e Guilherme Rabelo, pelo companheirismo e confiança desenvolvidos ao longo desse um ano de convivência.

A todos graduandos, mestrandos e doutorandos do Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal do Paraná, pelo coleguismo, incentivo e auxílio em várias dúvidas durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de graduação, em especial Cristiani M. S. Justo e Leonardo K. Sampaio, por compartilharem os momentos de alegria e dificuldade durante esses quatro anos de curso.

A todos os professores da graduação, por me acrescentarem conhecimentos não apenas para a vida profissional, mas também para toda a vida, em especial o professor Elias Karam Jr. Aos demais idealizadores, coordenadores e funcionários da Universidade Federal do Paraná.

À minha família pelo amor, dedicação e paciência em tolerar todos os momentos de ausência durante o curso.

Finalmente, a Deus pela oportunidade e privilégio que me foi dado de estar presente nesta Universidade e adquirir tal experiência, e ao frequentar este curso,

perceber e atentar para a relevância de temas que não faziam parte, em profundidade, da minha vida.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
-------------	-----

### 1 INTRODUÇÃO

1.1 Ordem Rodentia.....	01
1.2 O gênero <i>Oligoryzomys</i> .....	04
1.3 Citogenética na identificação de espécies.....	05
1.4 A espécie <i>Oligoryzomys nigripes</i> .....	05
1.5 A espécie <i>Oligoryzomys flavescens</i> .....	06

2 OBJETIVOS.....	08
------------------	----

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais.....	09
3.2 Métodos.....	09
3.2.1 Coleta dos animais.....	09
3.2.2 Preparação mitótica.....	09
3.2.3 Preparação das lâminas.....	10
3.2.4 Coloração comum.....	10
3.2.5 Bandamentos C e G.....	10
3.2.5.1 Bandamento C.....	11
3.2.5.2 Bandamento G.....	11
3.2.6 Análise das lâminas e montagem dos cariogramas.....	12
3.2.7 Taxidermia.....	12

### 4 RESULTADOS

4.1 caracterização dos cariótipos.....	15
4.1.1 <i>Oligoryzomys nigripes</i> .....	15
4.1.2 <i>Oligoryzomys flavescens</i> .....	19
4.2 Distribuição geográfica das espécies.....	23

<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
5.1 Variabilidade cromossômica em <i>O. nigripes</i> .....	25
5.2 Variabilidade cromossômicas em <i>O. flavescens</i> .....	28
5.3 Variabilidade cariotípica X Distribuição geográfica.....	29
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>32</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>34</b>

## RESUMO

A partir do levantamento dos dados citogenéticos de exemplares das duas espécies de *Oligoryzomys* presentes nos acervos dos Laboratórios de Citogenética Animal (UFPR) e Biologia (FURB), associados às coletas em S. José dos Pinhais, foram estudados 129 animais coletados em 16 localidades (13 no Paraná e três em Santa Catarina), sendo 107 (75M:32F) de *Oligoryzomys nigripes* e 22 (14M:8F) de *Oligoryzomys flavescens*. Objetivando caracteriza-los cariotipicamente e associando-os às diferentes regiões de sua distribuição, foram aplicadas diferentes metodologias, desde a captura de exemplares, preparação citológica, aplicação de diferentes técnicas de colorações (comum em Giemsa e bandamentos C e G) e análise ao fotomicroscópio. A espécie *Oligoryzomys nigripes*,  $2n=62$ , mostrou um cariótipo altamente polimórfico, como consequência de variações no par 3 e nos cromossomos sexuais. Três estados cariomorfológicos foram detectados com relação às diferentes combinações dos dois tipos de cromossomos do par 3 (MM; MA e AA), que refletiram em uma variação no número de braços dos autossomos ( $NA = 80$  a  $82$ ). Pelo padrão de bandamento G confirmou-se a suspeita de uma inversão pericêntrica como responsável pela variação morfológica no cromossomo 3. Tanto o cromossomo X (M e SM) como o Y (SM, M e A) mostraram-se também polimórficos. Entre os 22 exemplares de *Oligoryzomys flavescens*, verificou-se uma variação no  $2n$  ( $64$  a  $66$ ), como decorrente da presença de até dois cromossomos B ( $NA = 66$  a  $68$ ). O número de exemplares com e sem cromossomos B foi idêntico (50%), mostrando ser esta uma característica marcante desta espécie. Os padrões de bandamento C, mostraram a heterocromatina constitutiva fortemente marcada e restrita à região pericentromérica dos autossomos, braço curto do X, todo o Y, este com duas marcações com tonalidades diferentes, e B todo corado. Considerando-se os 13 locais de coleta no Paraná, *O. nigripes* teve uma distribuição mais ampla (12 localidades) do que *O. flavescens* (cinco). Em cinco dos locais de coleta, sendo quatro no Paraná e uma em Santa Catarina, as duas espécies ocorreram em simpatria.



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ORDEM RODENTIA

A ordem Rodentia é a mais numerosa dentre os mamíferos, contendo mais de 2000 espécies, o que corresponde a cerca de 40% das espécies da Classe Mammalia. Os representantes desta ordem possuem uma ampla distribuição geográfica, sendo a Antártica o único lugar do globo em que os roedores não são encontrados (REDFORD e EISENBERG, 1992).

Praticamente todas as ordens de mamíferos apresentam alguma dificuldade quanto à classificação taxonômica, mas nenhuma delas se compara às da Ordem Rodentia, pois existem grandes problemas na elucidação precisa de suas relações filogenéticas (SILVA, 1994). Um dos principais problemas sistemáticos refere-se ao fato de que alguns autores reúnem todos os grupos da Superfamília Muroidea em uma única família: Muridae (THOMAS, 1896 apud CARLETON, 1980; ELLERMAN, 1940; CARLETON e MUSSER, 1984), enquanto que outros (SIMPSON, 1945; CHALINE *et al.*, 1977), os distribuem em outras famílias, entre as quais, Cricetidae e Muridae (SILVA, 1994).

REIG (1980, 1984), para os Cricetídeos, definiu uma separação básica entre os característicos da América do Sul e os da América do Norte, que diferem quanto à glândula peniana, e, uma vez assumida esta posição, o autor sugere considerar duas Subfamílias para a Família Cricetidae: Sigmodontinae, distribuída principalmente na América do Sul, e Neotominae, na América do Norte. Alguns estudos revelaram a existência de novos táxons fósseis em ilhas, tanto de maneira genérica (CARLETON e OLSON, 1999), como especificamente (MCFARLENE e DEBRUT, 2001), mostrando uma vasta paleodiversidade das radiações de sigmodontíneos em regiões insulares (PARDIÑAS *et al.*, 2002). Atualmente, os sigmodontíneos vivos estão incluídos em 74 gêneros e 380 espécies (CARLETON e MUSSER, 2005).

A chegada dos sigmodontíneos à América do Sul é um assunto que já gerou muito debate entre os pesquisadores, os quais formularam algumas hipóteses. PASCUAL e PATTERSON (1968) e SIMPSON (1950, 1969), baseando-se nos registros fósseis, apóiam a hipótese de que os sigmodontíneos seriam relativamente recentes na América do Sul, vindos durante a fase de mudança da paleofauna Norte-Americana, entre o Plio e o Pleistoceno, logo após a formação do Istmo do Panamá. De acordo com PARDIÑAS *et.al* (2002), os primeiros roedores a chegar na América do Sul, durante o Plioceno Inferior, eram pertencentes às tribos Akodontini e Phyllotini.

Uma hipótese alternativa foi proposta por HERSHKOVITZ (1966, 1972), e apoiada por SAVAGE (1974) e REIG (1978), baseando-se na vasta diversidade dos sigmodontíneos neotropicais, sugere que estes devem ter entrado na América do Sul há pelo menos 20 milhões de anos, no Mioceno Inferior, trazidos por “embarcações” através da água, antes da formação do Istmo do Panamá. Já MARSHALL (1979), tendo um ponto de vista que difere dos dois últimos, propôs que a invasão dos sigmodontíneos Sul-Americanos teria ocorrido pela América Central, de 7 a 5 milhões de anos atrás, durante o rebaixamento do nível do mar.

Segundo REIG (1984), a Subfamília Sigmodontinae pode ser representada por sete tribos distintas: Oryzomyini, Akodontini, Phyllotini, Ichthyomyini, Scapteromyini, Sigmodontini e Wiedomyini, com as três primeiras diferindo acentuadamente em diversidade e correspondendo a 87,1% das espécies viventes (Oryzomyini com 44,2% das espécies, Akodontini com 24,9% e Phyllotini com 18%). PATTON e SMITH (1999), obtiveram evidências indicando que dois gêneros, *Scapteromys* e *Kunsia* colocados tradicionalmente em uma tribo separada, Scapteromyini (Massoia, 1979), entra na radiação dos akodontinos. Recentemente, D'ELÍA *et al.* (2003), expandiram esse resultado, através de estudos moleculares, colocando *Bibimys*, o terceiro gênero de Scapteromyini, também entre os akodontinos.

Existe grande divergência no que diz respeito ao número de gêneros e espécies plenas reconhecidas para a Subfamília Sigmodontinae e, de forma especial, para a tribo Oryzomyini. Este é o grupo de sigmodontíneos de maior distribuição geográfica, alcançando as três Américas, Galápagos, Andes e em um passado recente, também a ilha de Fernando de Noronha. A maioria dos Oryzomyini habita selvas tropicais e subtropicais, mas há alguns gêneros que invadiram áreas abertas de pasto, arbustivas e bosques (PARDIÑAS *et al.*, 2002).

Pela classificação de REIG (1980, 1984, 1986), o gênero *Oryzomys* é composto pelos subgêneros: *Oryzomys* (28 espécies); *Melanomys* (3 espécies); *Microrizomys* (1 espécie); *Macrurorizomys* (1 espécie); *Sigmodontomys* (1 espécie); *Oligorizomys* (11 espécies). Apesar de se declarar seriamente inclinado a considerá-lo como um gênero pleno, REIG (op. cit.) considera *Oligorizomys* como um subgênero de *Oryzomys*.

No presente trabalho será utilizada a classificação de CARLETON e MUSSER (1984), que consideram *Oligorizomys* como gênero válido. Estudos genéticos recentes, revelaram que as espécies pertencentes ao gênero *Oryzomys* possuem diferenças, à nível molecular, significativas daquelas pertencentes ao gênero *Oligorizomys* (PERINI, M.V. *et al.*, 2004). Além disso, WEKSLER (2006) propôs uma nova classificação para a tribo Oryzomyini, com a inclusão de dez novos gêneros, onde as espécies foram reorganizadas de acordo com caracteres morfológicos e moleculares, totalizando, desta forma, 28 gêneros atuais: *Aegialomys* (duas espécies), *Cerradomys* (quatro), *Eremorizomys* (uma), *Euryorizomys* (seis), *Hylaeamys* (seis), *Mindomys* (uma), *Mindomys* (13), *Oreorizomys* (uma), *Sooretamys* (uma), *Transandinomys* (duas), *Amphinectomys* (uma), *Handleyomys* (duas), *Holochilus* (quatro), *Lundomys* (uma), *Melanomys* (três), *Microrizomys* (duas), *Neacomys* (oito), *Nectomys* (quatro), *Nesorizomys* (quatro), *Oecomys* (18), *Oligorizomys* (24), *Oryzomys* (48), *Pseudorizomys* (duas), *Scolomys* (duas), *Sigmodontomys* (duas) e *Zygodontomys* (duas). Os dez

primeiros gêneros são os novos propostos pelo Weksler (2006), que também inclui dois outros já extintos: *Megalomys* e *Noronhomys*.

## 1.2 O GÊNERO *OLIGORYZOMYS*

Os roedores do gênero *Oligoryzomys* são muito delicados, de tamanho pequeno, pêlo marrom-amarelado, sendo curto em terras quentes e longo em clima frio; a cauda bem delgada normalmente possui o dobro do comprimento do corpo. São animais de hábitos noturnos, terrestres e solitários, sendo sua alimentação provavelmente composta por sementes, frutos e insetos. Estão distribuídos desde o México até a Terra do fogo (OLDS e ANDERSON, 1987; EMMONS e FEER, 1990). Vários estudos já foram realizados mostrando que algumas espécies podem ser hospedeiras do hantavírus (POWERS e col., 1999).

Alguns autores, como CARLETON e MUSSER (2005), propõem ser *Oligoryzomys* um gênero monofilético. Porém, tal afirmação ainda é controversa, pois é muito difícil relacionar hierarquicamente as espécies através dos caracteres morfológicos, polimorfismos de proteínas e de DNA ou mesmo por dados cariotípicos. De acordo com CARLETON e MUSSER (1984), há 5 grupos: Grupo 1 - **nigripes**, incluindo *O. nigripes*, *O. eliurus*, *O. destructor*, *O. longicaudatus* e *O. delticola*; Grupo 2 - **flavescens**, que inclui *O. flavescens*, *Oligoryzomys sp. A*, *Oligoryzomys sp. B* e *Oligoryzomys sp. C*; Grupo 3 – **fulvescens**, composto por *O. fulvescens*, *O. arenalis* e *O. vegetus*; Grupo 4 - **microtis**, representado por *O. microtis*; Grupo 5 – **andinus**, que engloba *O. andinus* e *O. chacoensis*. Em estudos mais recentes, baseados em dados morfológicos e cariotípicos relatados na literatura, PARESQUE *et.al*, (2007) consideram que *O. delticola* e *O. eliurus* como sinônimas de *O. nigripes*, tendo este preferência sobre os outros dois nomes por razões de antiguidade. Em termos cariotípicos essas três espécies possuem o mesmo cariótipo, com o número diplóide (2n) igual a 62 e número de braços autossômicos (NA) variando entre 78 e 82 que, segundo os autores supracitados, seriam todos pertencentes a *O. nigripes*.

### 1.3 CITOGENÉTICA NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES

No estudo de características genéticas, a citogenética pode, além de auxiliar – às vezes definitivamente (JACKSON, 1970) - na identificação das espécies, fornecer subsídios para inferências sobre as relações filogenéticas (ou de parentesco evolutivo) entre as espécies (PATTON e SHERWOOD, 1983). Assim como os cromossomos podem ser úteis para remontar a história evolutiva de grupos, acredita-se que eles possam ter ação no surgimento de novas espécies de alguns grupos (WHITE, 1978, KING, 1993). Muitas vezes podem-se identificar quais foram os eventos citogenéticos que ocorreram durante o processo evolutivo do grupo, através da diversidade cariotípica.

A citogenética de vertebrados teve início com os trabalhos de FORD e HAMERTON (1956), os quais estabeleceram técnicas para obtenção e coloração de cromossomos. No princípio, era prioritariamente descritiva, mas com o aprimoramento das técnicas de coloração – bandamentos – a partir dos estudos de CASPERSSON *et al.* (1968), abriram-se novas perspectivas, como o pareamento correto dos cromossomos homólogos; a elucidação de rearranjos cromossômicos; os estudos comparativos entre padrões de bandas de diferentes áreas geográficas, ou de diferentes espécies, possibilitando, desta maneira, a elaboração de propostas filogenéticas fundamentadas em dados cromossômicos.

### 1.4 A ESPÉCIE *OLIGORYZOMYS NIGRIPES*

Inúmeros estudos citogenéticos já foram realizados no grupo *Oligoryzomys*, através de diferentes tipos de colorações, incluindo o bandamento cromossômico. Assim, em *O. nigripes*, do Brasil, foi revelado um cariótipo com  $2n=62$  do Rio Grande do Sul ao Espírito Santo, sendo neste, encontrado em um único exemplar, um cariótipo com  $2n=61$  (NF=82) devido à presença de apenas um cromossomo sexual (no caso o X) (ZANCHIN, 1992). Apesar do número diplóide permanecer mais ou menos constante, foram encontrados 20 cariótipos diferentes, com

números fundamentais de braços (NF) iguais a 80, 81 e 82, provenientes de várias combinações cromossômicas. Tais combinações envolvem inversões pericêntricas incluindo três pares autossômicos (3, 4 e 8) e variações no tamanho e na morfologia dos cromossomos X e Y (ALMEIDA e YONENAGA-YASSUDA, 1980; SBALQUEIRO, 1989, ALMEIDA e YONENAGA-YASSUDA, 1991).

### 1.5 A ESPÉCIE *OLIGORYZOMYS FLAVESCENS*

Outra espécie de *Oligoryzomys* com dados citogenéticos significativos, *O. flavescens*, foi primeiramente estudada no Uruguai, por BRUM (1965), revelando o cariótipo  $2n=60$  (NF=60), sendo a maioria dos cromossomos acrocêntricos. Posteriormente alguns estudos foram realizados no Uruguai e Argentina (BRUM-ZORILLA *et al.*, 1988; VIDAL-RIOJA *et al.*, 1988; ESPINOSA e REIG, 1991) e no Brasil (MATTEVI *et al.*, 1981; SBALQUEIRO, 1989; SBALQUEIRO *et al.* 1982; 1986; 1991).

No Rio Grande do Sul, foram encontrados espécimes de *O. flavescens* com número diplóide variando de  $2n=64$  a  $2n=66$  (NF=66 a 68), sendo resultado da presença de cromossomos supernumerários, heteromorfismo nos autossomos e nos cromossomos X. Nestes exemplares também foi observado um caso de mosaicismo cromossômico ( $2n=64/65$ ; NF=66/67) (MATTEVI *et al.* 1981; SBALQUEIRO, 1989; SBALQUEIRO *et al.* 1982; 1986; 1991). Segundo SBALQUEIRO *et al.* (1991), essa variação cromossômica em *O. flavescens*, de 64 e 66, é resultado da presença de cromossomos supernumerários e não de inversões pericêntricas, como foi proposto por BRUM-ZORILLA *et al.* (1988). Também a morfologia dos supernumerários mostrou-se diferente nos exemplares do Brasil em relação aos da Argentina e Uruguai, nestes locais os cromossomos são metacêntricos, e no Brasil, acrocêntricos. O cariótipo de  $2n=64-66$  também foi encontrado em *O. fornesi*, descrito por MASSOIA (1973) a partir de exemplares coletados no Paraguai. Posteriormente, SBALQUEIRO *et al.*(1991), através de

análises cromossômicas, considerou *fornesi* e *flavescens* como sendo pertencentes ao mesmo grupo citotaxonômico.

Devido a essa variabilidade cariotípica dentro do gênero, em especial nas duas espécies acima comentadas, bem como à incerteza das relações filogenéticas entre as espécies de *Oligoryzomys*, pretendemos fazer um levantamento dos diferentes citótipos de *O. nigripes* e *O. flavescens* ocorrentes no Paraná e Santa Catarina, e verificar se esta multiformidade cromossômica está, de alguma forma, associada à distribuição geográfica.

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho pretende caracterizar os cariótipos das espécies *Oligoryzomys nigripes* e *Oligoryzomys flavescens*, distribuídas em diferentes localidades dos Estados do Paraná e Santa Catarina.

Para tal, as seguintes etapas foram cumpridas:

- a) Análise cromossômica dos exemplares coletados na localidade de Barro Preto, Mun. de S. José dos Pinhais;
- b) Levantamento dos dados citogenéticos de exemplares tombados, das duas espécies, presentes nos Laboratórios de Citogenética Animal (UFPR) e Biologia (FURB);
- c) Análise de cariótipos, em coloração comum e de bandas, C e G, das duas espécies;
- d) Relacionar a variabilidade cariotípica com a distribuição geográfica das duas espécies.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

Além dos exemplares coletados na localidade Barro Preto, município de São José dos Pinhais – PR, foram utilizados dados fornecidos pelo Laboratório de Citogenética Animal da UFPR e também os provenientes de uma amostra cedida pelo Departamento de Biologia da Universidade Regional de Blumenau (FURB).

Conforme observa-se na Tabela 01, foram utilizados no presente trabalho 107 espécimes de *Oligoryzomys nigripes* e 22 espécimes de *Oligoryzomys flavescens*, coletados em 16 localidades, sendo 13 no Paraná e 3 em Santa Catarina.

#### 3.2 MÉTODOS

##### 3.2.1 COLETA DOS ANIMAIS

Para as coletas foram utilizadas armadilhas do tipo “Life-trap”, contendo iscas de milho com banana ou creme de amendoim. A cada espécime coletado foi designado um protocolo, sendo formado pela letra P, seguida de um número seqüencial que indica a quantidade de exemplares analisados pelo Laboratório. Os exemplares da FURB haviam sido protocolados nesta com a sigla FURB seguida do número correspondente ao animal coletado.

##### 3.2.2 PREPARAÇÃO MITÓTICA

Para obtenção de cromossomos metafásicos foi utilizado o método descrito por FORD e HAMERTON (1956), com modificações (SBALQUEIRO e NASCIMENTO, 1996), conforme descrição abaixo:

- 1) Injetar intraperitonealmente 1ml de solução de colchicina a 0,1 % para cada 100g de peso do animal.
- 2) Sacrificar o animal após uma a duas horas.
- 3) Retirar os fêmures, seccionando as epífises e injetar a solução hipotônica (0,075M/KCl) a 37° C) através da medula, deixando deslizar suavemente

pelas paredes do tubo de centrifuga esta solução bem como o material medular.

- 4) Ressuspender gentilmente e esperar por 10 minutos com o material em banho-maria a 37° C. Antes de centrifugar adicionar 0,5 ml de fixador Carnoy,( 3 metanol : 1 acido acético) sem ressuspender.
- 5) Centrifugar a 800 r.p.m. por 10 minutos.
- 6) Retirar praticamente todo o sobrenadante, deixando 1 ml, ressuspender Fixar o precipitado com 5ml de fixador (3 Metanol : 1 Ác, Acético); ressuspender e deixar em repouso por 30 minutos.
- 7) Trocar o fixador por três vezes, conforme descrito no passo número 6, sem a necessidade de manter em repouso.
- 8) Após a ultima centrifugação, deixar de 1 a 1,5 ml do fixador para montagem das lâminas.

### 3.2.3 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

As lâminas foram lavadas com detergente neutro e enxaguadas com água filtrada, eram armazenadas na geladeira imersas em álcool 70%.

No momento de utilizar, as lâminas foram secas ao ar, material era ressuspendido e duas gotas eram pingadas sobre a lâmina, que era mantida sobre um banho-maria a 60-65°C. Após a secagem “livre” ao ar era realizada a coloração com Giemsa, ou as lâminas eram envelhecidas em estufa para a realização de bandamento.

### 3.2.4 COLORAÇÃO COMUM

As lâminas foram coradas com o corante Giemsa, diluído em tampão fosfato pH 6,8 a 5% por um período de 8 minutos, à temperatura ambiente e, após, lavadas em água corrente, secadas ao ar e analisadas no microscópio.

### 3.2.5 BANDAMENTOS C e G

A obtenção das bandas C e G seguem as metodologias preconizadas por, respectivamente, SUMNER (1972), SEABRIGHT (1971), HOWELL e BLACK (1980), com modificações adaptadas às condições do nosso laboratório, conforme SBALQUEIRO (1989).

### 3.2.5.1 BANDAMENTO C

O bandamento C permite a visualização de regiões de heterocromatina constitutiva, usando para isso bário e Giemsa.

O seguinte protocolo foi obedecido:

- A lâmina pode ser preparada no dia ou envelhecida por 3 dias a 40°C.
- Passar em 0,2N HCl a 43-45°C por 2 minutos.
- Lavar em H<sub>2</sub>O destilada e secar.
- Mergulhar em solução de bário 5% a 43-45°C por 15 segundos, sendo que esse tempo pode ser aumentado ou diminuído conforme os resultados obtidos.
- Passar em 0,2N HCl a 43-45°C por 2 minutos.
- Lavar bem, com jatos de H<sub>2</sub>O destilada.
- Mergulhar em solução salina 2SSC pH 7,0 a 60-65°C por 15 minutos.
- Lavar em água destilada e corar conforme protocolo de coloração convencional.

### 3.2.5.2 BANDAMENTO G

Este procedimento evidencia bandas claras e escuras nos cromossomos, utilizando tripsina e Giemsa, o que permite o correto pareamento deles.

Seqüência do protocolo:

- Preparar as lâminas e envelhecer por 3-4 dias em estufa a 40°C.
- Incubar as lâminas em tampão fosfato pH 6,8 por 2 minutos.
- Incubar em solução de tripsina a 0,03% dissolvida em tampão fosfato pH 6,8 ou solução de Hanks por 30 segundos. Esse tempo pode ser aumentado ou diminuído conforme os resultados obtidos.
- Lavar rapidamente em água destilada, álcool absoluto e água destilada.

- Incubar em tampão fosfato pH 6,8 por 1 minuto.
- Corar com Giemsa (tamponado em pH 6,8) a 2,5% por 5 minutos.
- Lavar em água filtrada, esperar secar e observar ao microscópio.

### 3.2.6 ANÁLISE DAS LÂMINAS E MONTAGEM DOS CARIOGRAMAS

Em cada lâmina foram analisadas pelo menos 10 metáfases, sendo que as três melhores foram ou fotomicrografadas no microscópio Zeiss ou digitalizadas no sistema de captura de imagens da Applied Spectral Imaging, com o programa Case Data Manager e Bandview, da mesma empresa. Os cariogramas foram montados levando-se em conta a morfologia dos cromossomos, seu tamanho e comparação com a literatura.

### 3.2.7 TAXIDERMIA

Os animais analisados foram taxidermizados e tombados na Coleção Científica dos laboratórios de Citogenética animal da UFPR e Biologia da FURB.

Tabela 01 – Locais de coletas de exemplares das espécies *Oligoryzomys nigripes* e *O. flavescens*

	<b>Localidades</b>	<b><i>O. nigripes</i></b>			<b><i>O. flavescens</i></b>		
Nº	<b>Paraná (13 locais):</b>	<b>UFPR*</b>	<b>FURB*</b>	<b>COLETA*</b>	<b>UFPR</b>	<b>FURB</b>	<b>COLETA</b>
				*			
1	Araucária	5 (5/0)					
2	Piraquara	5 (1/4)			1 (1/0)		
3	São José dos Pinhais	14 (9/5)		2 (2/0)	2 (1/1)		1 (1/0)
4	Curitiba	3 (1/2)			10 (8/2)		
5	São Mateus do Sul	3 (2/1)			1 (0/1)		
6	Foz do Iguaçu	52 (38/14)					
7	Mandirituba	3 (2/1)					
8	Campo Largo	3 (3/0)					
9	Guaraqueçaba	2 (2/0)					
10	Jaguariaíva	1 (0/1)					
11	Tijucas do Sul	2 (2/0)					
12	Almirante Tamandaré	2 (2/0)					
13	Vila Velha				5 (2/3)		
	<b>Santa Catarina (3 locais)</b>						
14	Anitápolis		2 (2/0)				
15	São Domingos		4 (2/2)	1 (0/1)			2 (1/1)
16	Blumenau		3 (2/1)				
	<b>Total de exemplares</b>	95 (67/28)	9 (6/3)	3 (2/1)	19 (12/7)		3 (2/1)
	<b>Total localidades</b>	15			6		

OBS. - \* UFPR e FURB = dados obtidos através do material fornecido pelos laboratórios específicos de cada instituição; \*\* COLETA= material das coletas realizadas para o presente estudo; entre parêntesis o número de machos e fêmeas para cada local de coleta.



Figura 01- Mapas indicando os locais de coletas nos Estados: a) **Paraná**: 1 – Tomáz Coelho, Araucária, 2 – Fazenda Experimental UFPR, Piraquara, 3 – São José dos Pinhais, 4 – Centro Politécnico, Curitiba, 5 – Fluviópolis, São Mateus do Sul, 6 – Itaipu, Foz do Iguazu, 7 – Rio das Antas, Mandirituba, 8 – Rio Passaúna, Campo Largo, 9 – Guaraqueçaba, 10 – Jaguariaíva, 11 – Tijucas do Sul, 12 - Almirante Tamandaré, 13 – Vila Velha; b) **Santa Catarina**: 14 – Anitápolis, 15 - São Domingos, 16 – Blumenau.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS CARIÓTIPOS

#### 4.1.1 *Oligoryzomys nigripes*

Analisaram-se citogeneticamente 107 exemplares *O. nigripes* originados de 15 das 16 localidades onde uma ou as duas espécies de *Oligoryzomys* foram coletadas (Tabela 01)

A caracterização do cariótipo mostrou o número diplóide variando de  $2n=61$  a  $2n=62$ , com número de braços autossômicos (NA) variando de 80 a 82. O  $2n=61$  foi encontrado apenas em uma fêmea, devido a ausência de um dos cromossomos X ( $2n=61, X0$ ).

O cariótipo desta espécie (Figura 02), mostra, quanto à morfologia dos cromossomos, o par 1 grande e acrocêntrico; o par 2 formado por cromossomos grandes e submetacêntricos; o par 3, igualmente grande, formado por dois tipos morfológicos – metacêntrico ou acrocêntrico; o par 4 de tamanho médio, apresentou as forma metacêntrica; os pares de 5 a 11 são metacêntricos de tamanho médio a pequeno e os pares de 12 a 30 são acrocêntricos, que diminuem gradativamente de tamanho. Já o par sexual pode ser caracterizado pelo cromossomo X, de tamanho grande equivalente ao do par 2, metacêntrico ou submetacêntrico e o cromossomo Y, de tamanho médio - submetacêntrico ou metacêntrico -, ou pequeno e acrocêntrico, como mostra a figura 2c. Estas alterações, tanto nos autossomos como nos sexuais, estão relacionadas, respectivamente, nas Tabelas 02 e 03.

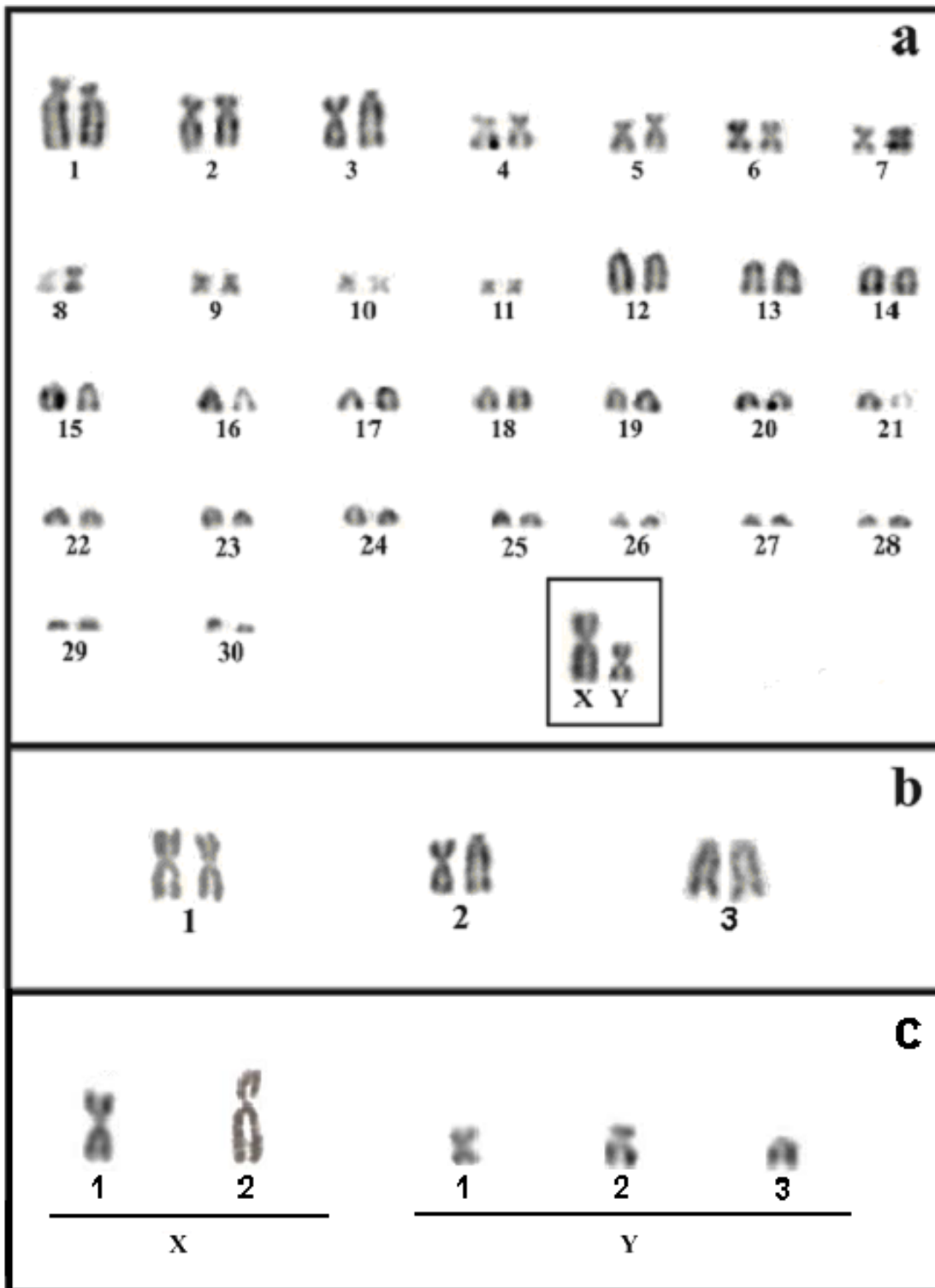


Figura 02. Cromossomos de *Oligoryzomys nigripes*: a) cariograma de exemplares com  $2n=62$  e  $NA=81$ ; b) Pares 1 e 3 em homocigose (metacêntrico e acrocêntrico, respectivamente) e par 2 em heterocigose para os dois tipos morfológicos; c) Variabilidade encontrada nos cromossomos sexuais X e Y.



Os dois tipos morfológicos – acrocêntrico e metacêntrico - observados nos cromossomos do par 3 (Figuras 2a e 2b, e Tabela 02), ocorreram tanto em homozigose como em heterozigose e respondem pela ocorrência de três citótipos distintos, conforme seja o NA, de 80 a 82.

Tabela 02 – Alterações encontradas no par 3 de *Oligoryzomys nigripes* e, respectivos números de exemplares

Citótipo*	2n	NA	Par 3*	n (M/F)
1	61	80	A	1 (0/1)
	62			26 (16/10)
2	62	81	H	56 (40/16)
3	62	82	M	24 (19/5)

OBS. - : \*Citótipos: 1 – A = Homozigoto Acrocêntrico; 2 – H = Heterozigoto (Acrocêntrico/Metacêntrico); 3 - M = Homozigoto Metacêntrico; n (M/F) = nº de exemplares machos e fêmeas.

A análise conjunta do número de exemplares de cada um dos três citótipos, quanto ao número de braços autossômicos, e admitindo-se que todas as localidades de coletas pertençam a uma única região, que os exemplares sejam da mesma geração e que os cruzamentos se dêem ao acaso, verificamos que as freqüências observadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $X^2 = 0,2546$ ; gl = 1;  $0,70 > P > 0,50$ ).

Considerando-se apenas os exemplares com 62 cromossomos, foi possível identificar 11 citótipos diferentes, associando as variações tanto nos NA (80 a 82) como nos pares sexuais, XX e XY. Na Tabela 03 são apresentadas as freqüências destes citótipos observados em 26 exemplares da amostra total de 107. Nota-se que no cromossomo X as forma M encontra-se em maior freqüência que a SM

(M = 62% e SM = 38%), enquanto que no Y, destaca-se a forma SM como a mais freqüente (71%), sendo a acrocêntrica observada em apenas um exemplar.

Tabela 03 - Diferentes citótipos observados em 26 exemplares, de acordo com NA e NF (ambos os sexos), morfologia dos sexuais e localidades correspondentes.

sexo	NA	NF <sub>♀</sub>	NF <sub>♂</sub>	X	Y	n <sub>♂</sub>	n <sub>♀</sub>	Localidades (n*)
F	80	84	-	M	-	-	2	6(2)
M	80	-	84	M	SM	3	-	3(1), 14(2)
				SM	SM	1	-	3(1)
F	81	85	-	M	-	-	3	6(3)
M	81	-	85	M	M	3	-	3(2), 4(1)
				M	SM	5	-	3(3), 4(2)
				SM	M	1	-	3(1)
				SM	SM	1	-	3(1)
F	82	86	-	SM	-	-	4	6(4)
M	82	-	85	SM	A	1	-	4(1)
			86	SM	SM	2	-	8(2)

Obs: n\*= locais de coleta, conforme a Figura 01

Na Figura 03 (a, b) são mostrados os padrões de bandas G em uma fêmea, homocigota para o par 3 acrocêntrico, e em um macho, homocigoto para a forma metacêntrica. Também se podem identificar perfeitamente outros pares, em especial os sexuais. Ao passo que na Figura 03c, as formas acrocêntrica e metacêntrica são mostradas, onde, pelo padrão de suas bandas, nota-se perfeitamente que a diferença entre os dois cromossomos são decorrentes de uma inversão pericêntrica (flechas indicativas).

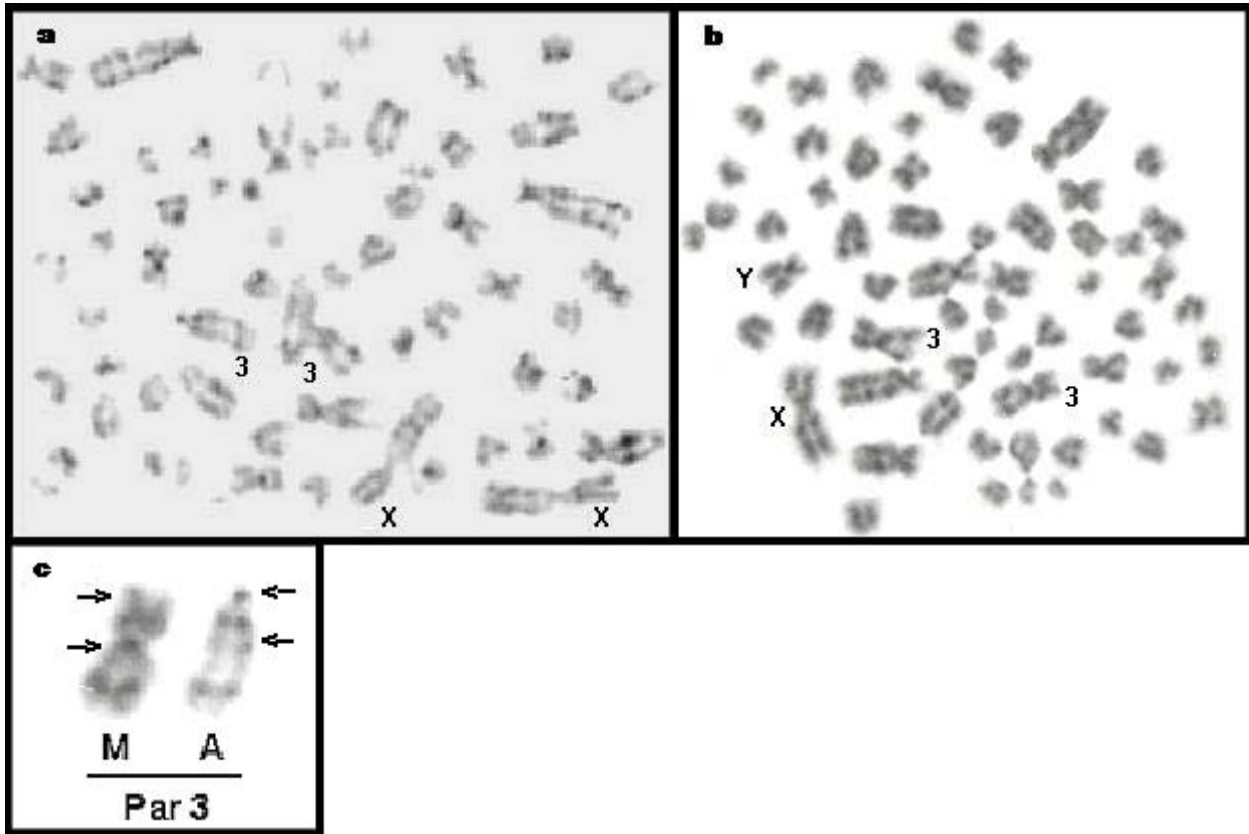


Figura 03 – Metáfases em banda G – a) Fêmea  $2n = 62$ ,  $NA = 80$ ; b) Macho  $2n = 62$ ,  $NA = 82$ . Os cromossomos do par 3, X e Y identificados nas próprias metáfases; c) Inversão pericêntrica no par 3, as flechas indicam as possíveis localizações de quebras.

Infelizmente a aplicação da técnica de bandamento C não resultou em um padrão satisfatório, o que impediu a sua análise na presente amostra.

#### 4.1.2 *Oligoryzomys flavescens*

Três citótipos foram encontrados nesta espécie, sendo que o  $2n$  varia de 64 a 66 cromossomos, com  $NA$  variando de 66 a 68, devido à ocorrência de cromossomo B.

Na Figura 04 é mostrado o cariótipo de exemplares com  $2n = 66$  e  $NA = 68$ , onde os cromossomos autossômicos são quase todos acrocêntricos, sendo o primeiro par de tamanho grande, os pares de 2 a 29 de tamanho médio a

pequeno, diminuindo gradativamente, e os pares 30 e 31 são pequenos e metacêntricos. Nos cromossomos sexuais também não foram detectadas alterações, sendo todos os exemplares caracterizados por um cromossomo X submetacêntrico grande e um cromossomo Y, no caso dos machos, de tamanho médio também submetacêntrico.

A variabilidade cromossômica nesta espécie é consequência da adição de cromossomos supernumerários, chamados também de cromossomos B. Naqueles exemplares, deste estudo, em que foi detectado este tipo de cromossomo, eles variaram de um a dois, de tamanhos pequenos, menores do genoma e acrocêntricos (Figura 04).

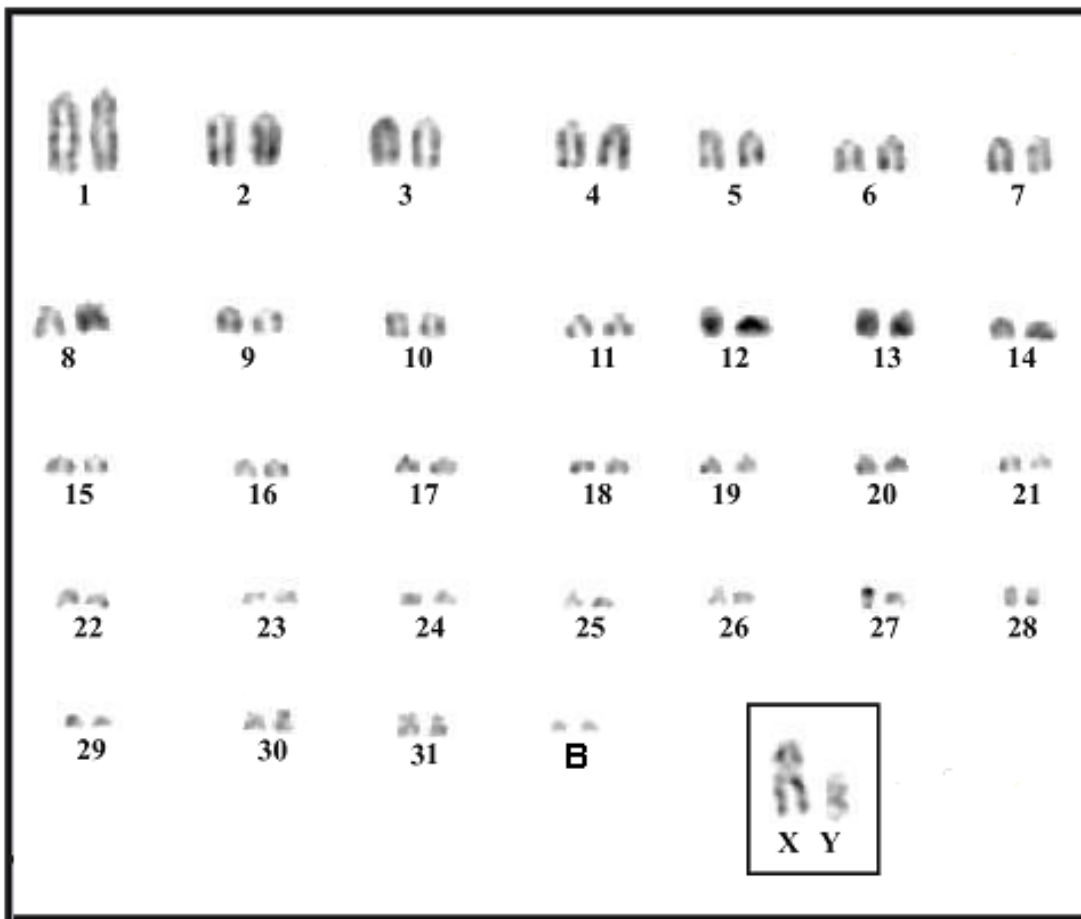


Figura 04 – Cariograma em coloração comum de um macho de *O. flavescens* ( $2n=64$ ;  $NA = 66$ ).

A adição de cromossomos B ao cariótipo de *O. flavescens* resulta em alterações tanto no 2n como no NA. Tais alterações estão relacionadas na Tabela 04.

Tabela 04 – Distribuição dos três citótipos em *O. flavescens*, de acordo com os números de cromossomos B ( $n^{\circ}$  B), de exemplares (n) e de machos (M) e fêmeas (F) por localidade

2n	NA	$n^{\circ}$ B	$n^*$	Localidades (M/F)
64	66	0	11	2 (1/0), 3 (1/0), 4 (5/1), 13 (0/2) e 15 (0/1)
65	67	1	5	4 (2/0), 5 (0/1) e 13 (1/1)
66	68	2	6	3 (1/1), 4 (1/1), 13 (1/0) e 15 (0/1)

Na Figura 05 é mostrado o padrão de banda C em *O. flavescens* ( $2n=66$ ;  $NA=68$ ), que é conspicuo e pericentromérico em todos os autossomos; marcação completa nos cromossomos B; e nos sexuais, todo o braço curto do cromossomo X é marcado, enquanto que no Y, ao longo do seu comprimento, destacam-se duas colorações: uma mais fraca, ao longo de quase todo o cromossomo, e outra mais forte, envolvendo a metade do seu braço longo.

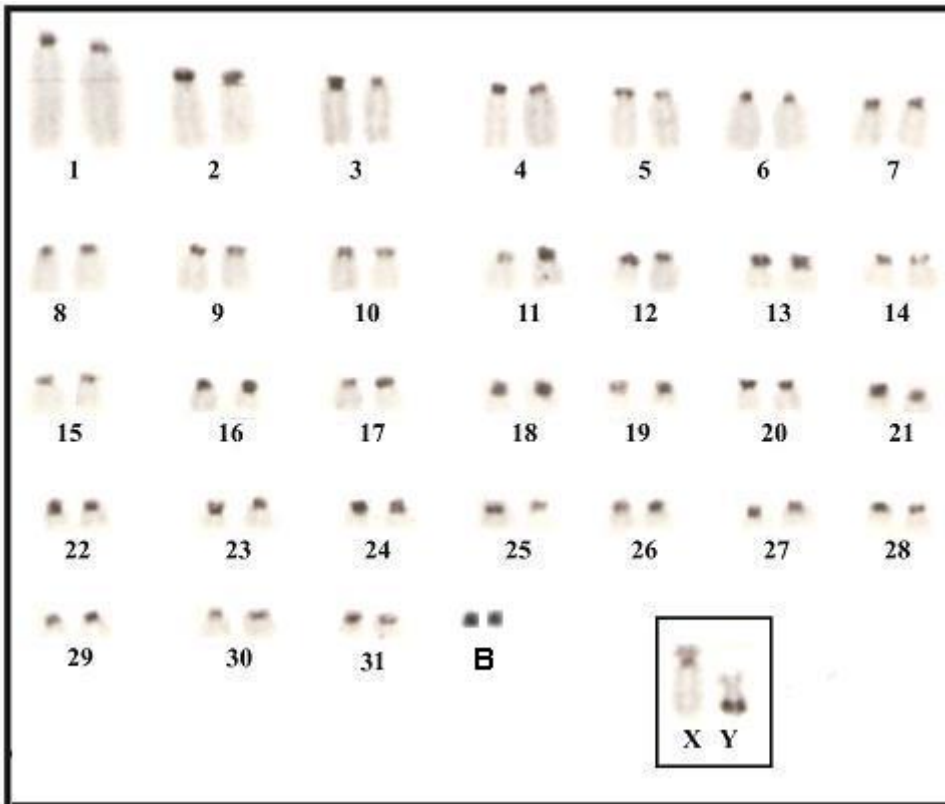


Figura 05 – Cariótipo em banda C, de um macho de *O. flavescens* com  $2n=66$ ;  $NA=68$ .

Na Figura 06 é mostrada uma metáfase, em banda G, de um macho com 65 cromossomos, onde se destacam as presenças dos cromossomos B (um), X e Y, além dos autossomos.

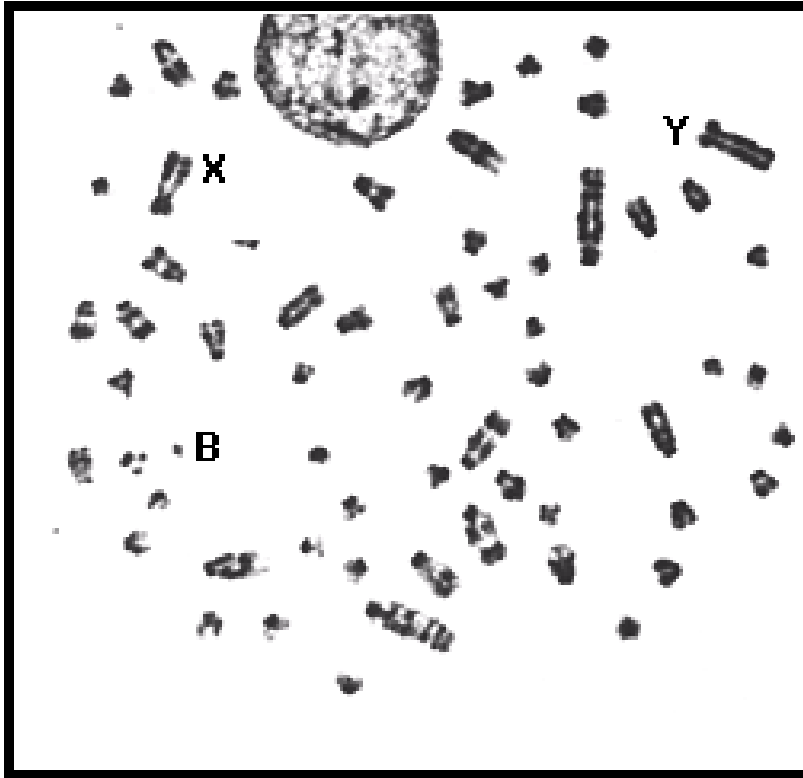


Figura 06 – Cariótipo de um macho de *O. flavescens* ( $2n=65$ ) em banda G; cromossomos B, X e Y indicados.

#### 4.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES

O levantamento realizado junto aos dados das amostras de exemplares de *Oligoryzomys*, disponibilizados pelos laboratórios de Citogenética Animal (UFPR) e Biologia (FURB – SC), somados àqueles das coletas realizadas no presente trabalho, totalizando 129 animais, conforme a Tabela 01, mostram 16 localidades, sendo 13 no Paraná e 3 em Santa Catarina.

No Estado do Paraná, foi registrada a presença *O. nigripes* em 12 das 13 localidades, estendendo-se de Leste (Guaraqueçaba) a Oeste (Foz do Iguaçu), Nordeste (Jaguariaíva) e Sul (S. Mateus do Sul), sendo a maior concentração de locais de coletas na região metropolitana de Curitiba. Não temos dados provenientes das demais regiões paranaenses.

Em Santa Catarina, com um menor acervo (11 exemplares) e locais de coletas (três), sua presença foi detectada em todos eles, incluindo uma região mais a Oeste (São Domingos) e as demais, mais a Leste, próximas ao litoral catarinense (Blumenau e Anitápolis).

Conforme ainda as Tabelas 01 e 05, em cinco dos locais (quatro paranaenses e um catarinense), as duas espécies mostram simpatria (respectivamente, Piraquara, S. José dos Pinhais, Curitiba, S. Mateus do Sul e S. Domingos). Além disso, a Tabela 05 discrimina as regiões de simpatria entre as duas espécies, conforme sejam seus respectivos citótipos e número de exemplares. Nota-se também que a localidade 3 (S. José dos Pinhais) registra o maior número de citótipos diferentes, praticamente todos em um total de oito, e na seqüência os locais 2, 4, 5 e 15.

Tabela 05 – Regiões de simpatria e alopatria entre *O. nigripes* e *O. flavescens*, considerando seus vários citótipos e número de exemplares

Espécies	2n	NA	n	REGIÕES	
				Simpatria (ns)	Alopatria
<i>O. nigripes</i>	61	80	1	3(1)	
	62	80	25	2(2), 3(4), 15(1)	6, 7, 12, 14, 16
	62	81	54	2(1), 3(7), 4(2), 5(3), 15(1)	1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 16
	62	82	24	2(2), 3(3), 4(1)	1, 6, 8
<i>O. flavescens</i>	64	66	10	2(1), 3(1), 4(6), 15(1)	13
	65	67	5	4(2), 5(1)	13
	66	68	4	3(2), 4(2), 15(1)	13
Localidades das Regiões em Simpatria				2, 3, 4, 5 e 15	

OBS. – n = nº total de exemplares; ns = nº de exemplares em simpatria; REGIÕES = localidades de coletas, conforme Fig. 01.



## 5 DISCUSSÃO

Em um total de 129 exemplares, sendo 107 de *Oligoryzomys nigripes* e 22 de *Oligoryzomys flavescens*, foram analisados citogeneticamente, através de vários tipos de colorações, e foram detectadas variabilidade cromossômicas que implicaram em variações nos números de cromossomos, no de braços de autossomos, e na morfologia dos sexuais.

### 5.1 VARIABILIDADE CROMOSSÔMICA EM *O. NIGRIPES*:

Foram avaliados 107 exemplares, distribuídos em 15 localidades (12 no Paraná e três em Santa Catarina), mostrando, principalmente, uma variação no número de braços, que implicou em diferentes NAs, tanto em machos como em fêmeas, de 80 a 82. Isto se deve à ocorrência de inversão pericêntrica no par 3, que se apresentou em três estados cariomorfológicos: homozigotos para as formas metacêntrica e acrocêntrica e heterozigoto contendo os dois tipos cromossômicos. O padrão de banda G (Fig. 03c) mostra claramente que as formas metacêntrica e acrocêntrica do autossomo 3 é conseqüência de uma inversão pericêntrica, o que corrobora com as proposições para o mesmo tipo de variação em exemplares de outras regiões brasileiras, entre as quais: no Rio Grande do Sul (SBALQUEIRO, 1989), São Paulo (ALMEIDA e YONENAGA-YASSUDA, 1991), Bahia, Goiás, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (ANDRADES-MIRANDA *et al*, 2001 e PARESQUE *et al*, 2007). Esta observação também se aos países limítrofes ao Brasil, como Paraguai, Uruguai e Argentina (MATTEVI e ANDRADES-MIRANDA, 2006). Destaque-se, ainda, que em solo brasileiro sua distribuição está ligada principalmente à Mata Atlântica, desde Pernambuco ao Rio Grande do Sul, e parte sul do Cerrado (Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo), o que demonstra ser esta uma espécie com uma ampla distribuição cariotípica.

Os três citótipos, conseqüentes dos dois tipos morfológicos no par 3, mostraram-se altamente freqüentes em nossa amostra (homozigotos A = 25%, M

= 23% e H = 52% ), mas não diferiram significativamente dos valores esperados ( $X^2 = 0,2546$ ; gl = 1;  $0,70 > P > 0,50$ ), o que demonstra ser um polimorfismo estabilizado nas condições ambientais atuais. Este mesmo estado de equilíbrio foi mostrado por SBALQUEIRO (1989) em exemplares do Sul do Brasil. Segundo este autor, citando KING (1993), este tipo de polimorfismo não tem implicações evolutivas, em termos de especiação, e pode ser considerado como neutro. Mesma opinião é manifestada por PARESQUE *et. al.*(2007), que considera o heteromorfismo do par 3 bastante comum nesta espécie. Ao que parece, tal variação, pode não ocasionar problemas para a sinapse e segregação dos cromossomos homólogos durante a meiose, pois não há qualquer evidência de redução de fertilidade para a espécie, conforme GREENBAUM e REED (1984) e HALE (1986). Trabalhos anteriores também sugerem alguns mecanismos genéticos que poderiam ser responsáveis por eliminar possíveis distúrbios decorrentes desse heteromorfismo durante a meiose, como a ocorrência de heterosinapses (FAGUNDES *et. al.*, 1998) e baixa frequência de quiasmas entre os segmentos invertidos (WANG *et. al.*, 2003a). Sendo o heteromorfismo do par 3 originado, portanto, por inversão pericêntrica, alguns dos mecanismos citados acima devem estar presentes em *O. nigripes*, reduzindo assim os possíveis efeitos deletérios.

Outro tipo de variação cariológica detectada em nossa amostra relacionou-se com diferentes tipos apresentados pelos cromossomos sexuais, onde tanto o X como o Y mostraram mais de uma forma. O X revelou duas, sendo a metacêntrica com 62% e a submetacêntrica com 38%, onde esta diferença morfológica pode ser consequência de inversão pericêntrica ou estar relacionada à quantidade de heterocromatina constitutiva (adição ou deleção) ou ainda, e menos provavelmente, a um grau de contração diferencial. SBALQUEIRO (1989), analisando uma amostra de exemplares do Sul do Brasil, verificou que o cromossomo X desta espécie apresenta um tamanho superior a 5% no complemento haplóide cromossômico e considerado como padrão aos mamíferos, sendo que o excesso a este valor, normalmente, é expresso no X como heterocromatina constitutiva. Quanto ao cromossomo Y, ele também foi

polimórfico, apresentando três tipos, onde as formas submetacêntricas (71%) e metacêntrica (23%) foram verificadas em maior número de machos do a acrocêntrica (6%). O Y polimórfico, conforme SBALQUEIRO (1989), deve ser conseqüência igualmente da ação de diferentes mecanismos, tal qual no na variabilidade do X, entre outros, inversão pericêntrica.

Essas variações morfológicas no cromossomo Y também foram encontrados em espécimes de *O. nigripes*, entre outras localidades, de São Paulo e Rio de Janeiro (ALMEIDA E YONENAGA-YASSUDA, 1991 *in* Paresque *et al.*, 2007) e Região Sul (SBALQUEIRO, 1989). Segundo ALMEIDA E YONENAGA-YASSUDA (1991), polimorfismos em cromossomos sexuais são comuns em Oryzomyini e normalmente estão associados a deleção ou adição de heterocromatina constitutiva ou inversões pericêntricas. Além de *O. nigripes*, outras espécies de *Oligoryzomys*: *O. magellanicus* (GALLARDO e PALMA, 1990), *O. longicaudatus* (GALLARDO e GONZÁLEZ, 1977), *O. flavescens* (ESPINOSA e REIG, 1991) e *O. fulvescens* (HAIDUK *et al.*, 1979), mostraram polimorfismo de cromossomos sexuais.

Segundo PARESQUE *et al.*(2007), existem 46 citótipos diferentes de *O. nigripes*, com  $2n=61-62$  e  $NF=78-82$ , em espécimes do Brasil e Uruguay. Os autores colocam *O. nigripes* como uma das espécies mais polimórficas dos roedores neotropicais, contendo alterações cromossômicas, como inversões pericêntricas, envolvendo os pares 2, 3, 4 e 8 e variações no tamanho e na morfologia dos cromossomos X e Y. Considerando todas as combinações de polimorfismos envolvendo tais pares cromossômicos, um total de 432 cariótipos diferentes eram esperados, porém apenas 46 dentre esses citótipos já foram observados.

O padrão de banda C não foi satisfatório para apresentação no presente estudo, mas segundo SBALQUEIRO (1989) e ANDRADES-MIRANDA *et al* (2000) os blocos heterocromáticos estão restritos às regiões pericentroméricas de alguns

cromossomos médios e pequenos, braço curto do cromossomo X, assim como todo o cromossomo Y.

## 5.2 VARIABILIDADE CROMOSSÔMICA EM *O. FLAVESCENS*

No presente estudo foram detectadas alterações tanto no  $2n$  como NA em decorrência da presença de até dois cromossomos B no cariótipo. Morfologicamente acrocêntricos e menores do genoma. Em bandamento C mostraram-se totalmente heterocromáticos e em banda G um padrão pouco ou nada definido. Este mesmo padrão foi descrito por SBALQUEIRO (1989) e SBALQUEIRO *et al* (1991), em exemplares do Sul do Brasil.

O cariótipo A, em contraste ao cromossomo B, mostra em coloração de banda C uma marcação forte e pericentromérica em todos os autossomos, braço curto do X e todo o Y, este com duas marcações, uma mais forte abrangendo cerca da metade do braço longo e a outra, mais tênue, o restante do cromossomo. Este padrão de marcação é o mesmo descrito em exemplares de outras regiões de sua distribuição (SBALQUEIRO, 1989; SBALQUEIRO *et al*, 1991; e ANISKIN e VOLOBOUEV, 1999)

Apesar dos nossos dados mostrarem, em geral, a mesma estrutura cariotípica evidenciada anteriormente para esta espécie, não detectamos variações nas morfologias tanto dos cromossomos sexuais como dos B, que diferentes autores os descreveram (BRUM-ZORILLA *et. al.*, 1988; ESPINOSA e REIG, 1991 e SBALQUEIRO *et. al.*, 1991). Além disso, cariótipos idênticos ao de *O. flavescens* foram encontrados em espécies inicialmente chamadas de *Oryzomys sp* no Brasil (YONENAGA-YASSUDA *et. al.*, 1976 e KASAHARA e YONENAGA-YASSUDA, 1984) e *O. fornesi* no Paraguai (MYERS e CARLETON, 1981). SBALQUEIRO *et. al.*(1991), baseando-se na similaridade das variações cariotípicas, passou a considerar *Oryzomys sp.*, *O. fornesi* e *O. flavescens* como sendo pertencentes à mesma espécie, distribuída pelo Paraguai, Sul e Sudeste do Brasil, Uruguai, Argentina e Bolívia (ANISKIN e VOLOBOUEV, 1999; BRUM-ZORILLA *et.al.*, 1988; SBALQUEIRO *et.al.*, 1991; VIDAL-RIOJA *et.al.*, 1988).

Os cromossomos supernumerários, ou cromossomos B, possuem propriedades que facilmente os distingue dos demais cromossomos do cariótipo; podem mostrar grande variedade quanto à forma, tamanho e número e, a maioria, é constituída por heterocromatina constitutiva (JONES e REES, 1982).

Esses cromossomos apresentam grande instabilidade mitótica e meiótica. Nas divisões celulares mitóticas pode ocorrer não disjunção das cromátides irmãs, originando células com diferentes números de Bs. Na meiose são caracterizados por não emparelharem com os autossomos e, além disso, esses cromossomos podem sofrer mecanismos de acumulação que levam ao aumento no seu número (VOLOBUJEV, 1981). Para que esses cromossomos sejam mantidos na população, sem gerar problemas aos seus portadores, algum mecanismo como supressão ou perda de atividade gênica deve estar atuando. A heterocromatinização representaria uma saída, sem que tivessem ocorrido grandes modificações na sua organização molecular e cromossômica (SILVA, 1994).

Embora os cromossomos supernumerários geralmente não apresentem genes estruturais, eles não são necessariamente inertes. Alguns podem ser portadores de RONS (GREEN, 1990; LÓPEZ-LEÓN *et. al.*, 1991; YONENAGA-YASSUDA *et.al.*, 1992).

### 5.3 VARIABILIDADE CARIOTÍPICA X DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

De acordo com as informações dos bancos de dados dos Laboratórios de Citogenética Animal da UFPR e Biologia da FURB, a distribuição de *Oligoryzomys nigripes* no Paraná e Santa Catarina é mais ampla do que a observada em *Oligoryzomys flavescens*, pois a primeira foi encontrada em 15 das 16 localidades de coletas. Em princípio estes resultados não refletem a realidade de ambos Estados, pois correspondem apenas aos poucos locais de coletas. Mas de qualquer forma, pelo menos no Paraná, nossos dados são sugestivos de que *O. nigripes* tem uma distribuição mais ampla do que *O. flavescens*, que é um reflexo do que ocorre a nível nacional. Ambas ocorrem na Mata Atlântica, sendo que a

primeira é descrita desde Pernambuco até o Rio Grande do Sul, parte Sul do Serrado e nos Estados de Minas Gerais, S. Paulo e Distrito Federal, ao passo que *O. flavescens*, apesar de também ser ampla, mas é mais restrita que a outra espécie, pois distribui-se do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul, e por isso mesmo não é de se estranhar a ocorrência em simpatria entre elas. Nossos dados corroboram em parte esta afirmação, pois no Paraná, em quatro das 13 localidades elas coabitam. Em Santa Catarina, apesar do pequeno número de locais de coletas consideradas (três), apenas em São Domingos observou-se simpatria. No Paraná, chama a atenção o fato de que em Foz do Iguaçu, com 52 exemplares de *Oligoryzomys* coletados, nenhum foi de *O. flavescens*, enquanto que nos quatro locais de simpatria este número de exemplares foi significativamente menor, sugerindo, de alguma forma e que não temos como testar ou comprovar, uma certa influência ambiental restringindo a presença de *O. flavescens* no oeste paranaense. Seriam necessárias maior número de coletas, não só em Foz do Iguaçu, como nas cercanias desta localidade.

Achados similares entre estas duas espécies foram descritos por ANDRADES-MIRANDA *et.al.* (2001) em quatro localidades do sul do Brasil (Costa de Dentro - SC, Tainhas, Charqueadas e Quintão – RS). mostrando que nos três Estados sul-brasileiro (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) as duas espécies são comumente encontradas no mesmo tipo de habitat

Com relação aos diferentes cariótipos em cada uma das espécies, se observa que para *O. nigripes*, os três citótipos ( $2n = 62$ ;  $Na = 80$  a  $82$ ) estão presentes em três localidades (Piraquara, S. José dos Pinhais e Foz do Iguaçu), enquanto que os três de *O. flavescens* ( $2n = 64$  a  $66$ ;  $NA = 66$  a  $68$ ), em duas (Curitiba e Vila Velha). Saliente-se que são reduzidas as informações citogenéticas destas duas espécies, em especial para o Paraná, restringindo-se, principalmente, aos trabalhos de SBALQUEIRO (1989) e SBALQUEIRO *et al.* (1991), o que vem a reforçar importância dos achados citogenéticos aqui relatados, que amplia o conhecimento da distribuição destas espécies em nosso Estado.

A distribuição das duas espécies de *Oligoryzomys* no Paraná, por outro lado, pode estar refletindo os locais aonde as mesmas se originaram, pois PARESQUE *et.al.*(2007), ao sugerirem que o cariótipo com  $2n=62$  e  $NA=80$  seria o mais primitivo para *O. nigripes*, admitiram a idéia de que as “terras baixas” do Oeste do Brasil e pradarias do Paraguai poderiam ser as regiões em que o gênero *Oligoryzomys* se originou, conseqüentemente as populações dessas áreas conteriam os caracteres mais primitivos do gênero. Subseqüentemente, ainda segundo estes autores, espécimes mostrando variações e heteromorfismos nos pares 2, 3, 4 e 8, devem ter sido originados durante a radiação do grupo ancestral em direção às baixadas do Sudeste brasileiro, Uruguai e Argentina, alcançando a costa Atlântica do Sudeste e Nordeste do Brasil.

## 6 CONCLUSÕES

Foram estudados citogeneticamente 129 exemplares coletados em várias localidades do Paraná e Santa Catarina, sendo 109 (75M:32F) de *Oligoryzomys nigripes* e 22 (14M:8F) de *Oligoryzomys flavescens*, através das colorações comum (Giemsa) e bandamentos C e G, e concluímos que::

01 – Em *Oligoryzomys nigripes* o 2n mais freqüente foi igual a 62, no entanto o número de braços autossômicos (NA) variou de 80 a 82;

02 – O polimorfismo em equilíbrio verificado no par 3 é indicativo de que a inversão pericêntrica não está atuando como uma barreira meiótica;

03 – Variabilidade morfológica foi também identificada nos cromossomos X e Y;

04 - Em *Oligoryzomys flavescens* variações verificadas tanto no 2n (64 a 66) como no NA (66 a 68) foram conseqüências das presenças de cromossomos B;

05 – Não foram verificadas variações morfológicas nos cromossomos X e Y;

06 – A heterocromatina constitutiva mostrou-se pericentromérica nos autossomos, braço curto do X e envolvendo inteiramente os cromossomos Y e B;

07 – No gênero *Oligoryzomys*, considerando-se as duas espécies e os 16 locais de coletas (13 no Paraná e 3 em Santa Catarina), *O. nigripes* teve uma distribuição geográfica mais ampla (15 = 12PR:3SC) do que *O. flavescens* (5 = 4PR:1SC);

08 – Simpatria entre as duas espécies foi verificado em cinco dos locais de coletas (Piraquara, São José dos Pinhais, Curitiba e São Mateus do Sul no Paraná, e São Domingos em Santa Catarina);



09 – Consideramos importantes os dados citogenéticos apresentados no presente trabalho, não só porque ampliam a distribuição geográfica desses dois táxons no Brasil, em especial no Paraná, mas também pela escassez de informações disponíveis na literatura pertinente. sobre os mesmos em nossa terra.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.J.C. e YONEGA-YASSUDA, Y. Polimorfismo dos cromossomos sexuais em *Oryzomys nigripes* (Cricetidae, Rodentia). **Cienc. Cult.** 32:718, 1980.

ALMEIDA, E.J.C e YONEGA-YASSUDA, Y. Pericentric inversions and sex chromosome heteromorphisms in *Oryzomys nigripes* (Cricetidae, Rodentia). **Caryologia**, 44 (1):63-73, 1991.

ANDRADES-MIRANDA, J. et.al. Chromosome studies of seven species of *Oligoryzomys* (Rodentia, Sigmodontinae) from Brazil. **Journal of Mammalogy**, 82(4): 1080 –1091, 2001.

ANISKIN, V.M. e VOLOBOUEV, V.T. Comparative chromosome banding of two South-American species of rice rats of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia, Sigmodontinae). **Chromosome Research** 7: 557-562, 1999.

BRUM-ZORILLA, N.; FRONZA, T.G. de; WAINBERG, R.; VIDAL-RIOJA, L. E ZWINRGER, N. *Oryzomys flavescens* and *O delticola* chromosomes (Rodentia, Cricetidae) from Uruguay and Argentina. **Caryologia**, 41 (3-4):275-288, 1988.

CARLETON, M.D e MUSSER, G.G. Muroid Rodents. In: Anderson. S.& JONES, j.k., Jr (eds.) **Orders and families of recent mammals of the world**. New York. John Wiley. Pp. 289-379, 1984.

CARLETON MD, OLSON SL Amerigo Vespucci and the rat of Fernando de Noronha: a new genus and species of Rodentia (Muridae: Sigmodontinae) from a volcanic island off Brazil's continental shelf. **American Museum Novitates** 3256: 1-59, 1999.

CASPERSSON T, FARBER S, FOLEY GE, KUDYNOWSKI J, MODEST EJ, SIMONSSON E, WAGH U, ZECH L. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. **Exp Cell Res** 49:219–222, 1968.

CHALINE. Essai de biostratigraphie et de correlations climatiques du Pleistocene in & ieur et moyen continental holarctique d'apres l'evolution et la dynamique des migrations de rongeurs. **Bull. Assoc. Fr. Etude Quaternaire [Suppl.]** 1:349-36 1, 1977.

D'ELÍA, G. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. **Cladistics** 19: 307-323, 2003.

D'ELIA, G., LUNA, L., GONZALEZ, E. M. e PATTERSON, B. D. On the Sigmodontinae radiation (Rodentia, Cricetidae): An appraisal of the phylogenetic position of *Rhagomys*. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 38: 558-564, 2006.

EMMONS, L.H. & F. FEER. Neotropical Rainforest Mammals: a field guide. Chicago, **The University of Chicago Press**, 290p, 1990.

ENGEL, S. R., HOGAN, K. M., TAYLOR, J. F., DAVIS, S. K. Molecular Systematics and Paleobiogeography of the South Americano Sigmodontine Rodents. **Mol. Biol. and Evol**, 15: 35-49, 1998.

ESPINOSA, M.B. e REIG, O.A. Cytogenetics and karyosystematics of South American oryzomyine rodents (Cricetidae, Sigmodontinae). III. Banding karyotypes of Argentinean *Oligoryzomys*. **Zeitschrift für Säugetierkunde** 56:306-317, 1991.

FORD, C.E.; HAMERTON, J. L. A cochicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosome. **Stain Tech.**, v. 31, p. 247-51, 1956.

FREITAS, T.R.O; VIEIRA, E.; PACHECO, S.; CHRISTOFF, A. **Mamíferos do Brasil: genética, sistemática, ecologia e conservação**. São Carlos/ SP: Suprema. p.114, 2006.

GALLARDO. N.M. e GONZÁLEZ, L.A. Sex chromosome polymorphism in *Oryzomys longicaudatus philippii* (Rodentia, Cricetidae). **Experientia**, **30**:312-314., 1977

GALLARDO, M. H. E PALMA, E. Systematics of *Oryzomys longicaudatus* (Rodentia: Muridae) in Chile **Journal of Mammalogy**, Vol. 71, No. 3 (Aug., 1990), pp. 333-342 doi:10.2307/1381943. 1990.

GREENBAUM, I.F., e REED, M.J. Evidence for heterosynaptic pairing of the inverted segment in pericêntrica inversion heterozygotes of the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). **Cytogenet. Cell Genet.**, 38:106-111., 1984.

HAIKUN, M.W.; BICKHAM, J.W. e SCHMIDLY, D.J. Karyotypes of six species of *Oryzomys* from Mexico and Central America. **J. Mammal.**, **60**: 610-615., 1979.

HALE, D.W. Heterosynapsis and suppression of chiasmata within heterozygous pericêntrica inversions of the Sitka deer mouse. **Chromosoma** (Berl.), **94**: 425-432., 1986.

HERSHKOVITZ, P. The recent mammals of the Neotropical Region. In *Evolution, Mammals and Southern Continents*, ed. A. F. Keast, F. C. Erk, and B. Glass. State Univ. of New York Press. Pp. 311-431. 1972.

JONES, R.N. e REES, H. B chromosomes. **Academic**. 266 p., 1982

KASAHARA, S. e YONENAGA-YASSUDA, Y. A progress report of cytogenetic data on Brazilian rodents. **Rev. Bras. Genet. VII** (3): 509-533. São Paulo – SP, 1984.

KING, M. **Species Evolution. The role of chromosome change**. Cambridge Univ.Press, 336pp, 1993.

LÓPEZ-LEÓN, M.D.; CABRERO, J. e CAMACHO, J.P.M. A nucleolus organizer region in a B chromosome inactivated by DNA methylation. **Chromosoma**, **100**: 134-138., 1991.

MARSHALL, L. G. A model for paleobiogeography of South American cricetine rodents. **Paleobiology** 5: 126-32. 1979.

MASSOIA E. Descripción de un género y especie nuevos: *Bibimys torresi* (Mammalia – Rodentia – Cricetidae – Sigmodontinae – Scapteromyini). **Physis** 38:1-7. 1979.

MATTEVI, M. S. ; PINHEIRO, C. E. A. ; ERDTMANN, B. ; FLORES, R. Z. ; SALZANO, F. M. . FAMILIAL PERICENTRIC INVERSION OF CHROMOSOME 2. **American Journal of Primatology**, v. 29, p. 161-169, 1981.

MUSSER, G.G. e M.D. CARLETON. Superfamília Muroidea. Pp. 894-1531 in **Mammal Species of the World a Taxonomic and Geographic Reference D.E. Wilson and D.M Reeder eds**. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2005.

MYERS, P. E CARLETON, M.D. The species of *Oryzomys* (*Oligoryzomys*) in Paraguay and the identity of Azara's "rat sixieme ou rat à tarse noir". **Misc Publ. Mus. Zool. Univ. Mich.**, **161**:1-41., 1981

OLDS, N e ANDERSON, S. Notes on Bolivian Mammals 2. Taxonomy and distribution of rice rats of the subgenus *Oligoryzomys*. **Fieldiana: Zoology**, **39**:261-281, 1987.

PARDINAS, U.F.J; D'ELÍA, G.; ORTIZ, P.E. Sigmodontinos fósiles (Rodentia, Muroidea, Sigmodontinae) de América del Sur: Estado Actual de su conocimiento y prospectiva. **J. Neotrop. Mammal.**; **9**(2): 209-252, 2002.

PARESQUE, R; SILVA, M.J.J; YONEGA-YASSUDA, Y. e FAGUNDES, V. Karyological geographic variation of *Oligoryzomys nigripes* Olfers, 1818 (Rodentia, Cricetidae) from Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, **30**, 1, 43-53, 2007.

PATTON, J.L. e SHERWOOD, S.W. Chromosome evolution and speciation in rodents. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, **14**:139-158, 1983.

PERINI, M.V.; WEIMER, T.A.; CALLEGARI, J.S.M; MATTEVI, M.S. Biochemical polymorphisms and genetic relationships in rodents of the genera *Oryzomys* and *Oligoryzomys* (Sigmodontinae) from Brazil. **Biochem. Genet.** **42**(9-10): 317-29, 2004.

PASCUAL, R. e PATTERSON, B. The Fossil Mammal Fauna of South America **The Quarterly Review of Biology**, Vol. 43, No. 4 , pp. 409-451. 1968.

POWERS A, MERCER D, WATTS D, GUZMAN H, FULHORST C, POPOV V, TESH R. Isolation and genetic characterization of a hantavirus from a rodent, *Oligoryzomys microtis* (Muridae), collected in northeastern Peru. **Am J Trop Med Hyg** ; **61**: 92-8. 1999.

REDFORD, K.H.; EISENBERG, J.F. Mammals of the Neotropics: The southern cone. Chicago, **The University of Chicago Press** Vol. 2, 430 pp. 1992

REIG, O. A. Roedores cricetidos del plioceno superior de la Provincia Buenos Aires (Argentina). **Pub. Mus. Minic. Cienc. Nat.**, Mar Del Plata 2:164-90. 1978

REIG, O.A. A new fossil genus of South America cricetid rodents allied to *Wiedomys*, with an assessment of the Sigmodontinae. **J. Zool.**, 181:227-241, 1980.

REIG, O.A. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sul-americanos (Cricetidae: Sigmodontinae). **Ver. Bras. Gent.**, VII(2): 333-365, 1984.

REIG, O.A. Diversity patterns and differentiation of high Andean rodents. In: Vuilleumier, F. E Monasterio (eds.) **High altitude tropical biogeography**, New York, Oxford Univ.:404-439, 1986.

REIG, O. A. An assessment of the systematics and evolution of the Akodontini, with the description of new fossil species of *Akodon* (Cricetidae: Sigmodontinae). **Fieldiana Zool.**, v. 39, p. 347-99, 1987.

SAVAGE, J. M. The isthmian link and the evolution of neotropical mammals. Natural History Museum, Los Angeles County, **Contributions in Science** 260:1-51. 1974.

SBALQUEIRO, IJ.; MATTEVI, M.S.; OLIVEIRA, L.F.B. e FREITAS, T.R.O. Analises cariotípicas de duas espécies do gênero *Oryzomys* (Rodentia) coletadas no extremo sul do Brasil. **Ciênc. Cult. (Supl.)**, 34:749, 1982.

SBALQUEIRO, I.J; KIKU, M; LACERDA, M; ACHKAR, D.E. e ARNT, L.R. Estudos cromossômicos em roedores da família Cricetidae coletados no Paraná. **Ciênc. Cult. (supl.)**, 38:926, 1986.

SBALQUEIRO, I. J. Análises cromossômicas e filogenéticas em algumas espécies de roedores da Região Sul. Porto Alegre. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1989.

SBALQUEIRO, I.J.; SUÑE-MATTEVI, M.; OLIVEIRA, L.F.B.e SOLANO, M.J.V. B chromosome system in populations of *Oryzomys flavescens* (Rodentia, Cricetidae) from Southern Brazil. **Acta Theriologica**, 36 (1-2):193-199, 1991.

SILVA, M.J.J; PERCEQUILLO, A.R.; YONEGA-YASSUDA, Y. Cytogenetics with systematic approach on a new *Oryzomys* species, of *nitidus* group (Sigmodontinae, Rodentia) from Northeastern Brazil. **Caryologia**, 53 (3-4):219-226, 2000.

SIMPSON, G.G. The principles of classification and a classification of mammals. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, 85: 1-350, 1945.

SIMPSON, E. S. W. The geology and mineral resources of Mauritius.-Colon. **Geol. Miner. Resource** 1(3), 217–235. 1950.

SMITH, M. F., AND J. L. PATTON. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b. **J. Mamm. Evol.**, 6:89-128. 1999.

VIDAL-RIOJA, L.; FRONZA, T.G.; WAINBERG, R.; BRUM-ZORILLA, N.; WALLACE, F. e ZAMBELLI, A. C-banding pattern and satellite DNA localization on the chromosomes of *Oryzomys flavescens* (Rodentia, Cricetidae). **Caryologia**, 41(3-4): 323-328., 1988.



VOLOBUJEV VT: B-chromosome system of the Mammals. **Caryologia**. 34:1-23 .  
49. 1981

WANG, H.; BICAI, Z.; HUAN G.; JUNFANG, G.; YONG, Z.; YUWEI, D.; JINHUI,  
H.; XINSHENG N. The origin of the genetical diversity of *Microtus mandarinus*  
chromosomes **Hereditas**. 139 (2), 90–95. 2003

WEKSLER, M *et al.* Tenm New Genera of Oryzomynine Rodents (Cricetidae:  
Sigmodontinae). **American Museum Novitates** 3537: 1-29, 2006.

ZANCHIN, N.I.T.; LANGGUTH, A. e MATTEVI, M.S. Karyotypes of Brazilian  
species of Rhipidomys (Rodentia, Cricetidae). **J. Mamm.**, 73: 120-122, 1992.