

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA DE ARAÚJO SOARES

CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA EM ROEDORES DO PARQUE
ESTADUAL DO ACARAÍ, SÃO FRANCISCO DO SUL, SANTA CATARINA.

CURITIBA

2014

AMANDA DE ARAÚJO SOARES

CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA EM ROEDORES DO PARQUE
ESTADUAL DO ACARAÍ, SÃO FRANCISCO DO SUL, SANTA CATARINA

Monografia apresentada à
disciplina Estágio Supervisionado
em Biologia como requisito parcial
à conclusão do curso de Ciências
Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal
do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Iris Hass

Co-orientador: Prof. Dr. Ives José
Sbalqueiro

CURITIBA

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, que, sempre me apoiou e me ajudou, independente de minhas escolhas. Agradeço a minha mãe Walda, pelo apoio, amor, carinho e puxadas de orelhas quando necessário. Ao meu pai Samuel, pelo apoio, amor, incentivo tanto no lado acadêmico, quanto no lado das corridas. A minha irmã Francine, pelo ombro amigo sempre que precisei e pelo apoio.

Agradeço, ao meu noivo, Henrique, uma pessoa que hoje não consigo viver sem, que me apoia e me escuta, muito obrigado pelo amor. A família Massucheto, pelo apoio, carinho, amor e respeito com que sempre me acolheram.

Ao prof Dr Ives José Sbalqueiro, pela oportunidade, orientação, conversas e paciência. Á Prof Dr Iris Hass, pelo apoio, orientação e ajuda. Ao pessoal do Laboratório de Citogenética, especialmente aos estagiários do grupo de Citogenética de Mamíferos.

Ao pessoal da UNIVILLE, por ceder o material e permitir que essa monografia se realizasse. Ao Pedro Balieiro, por ceder o material e ajudar nas análises com os dados morfológicos.

A. Dra. Thelma Alvim Veiga Ludwig e ao Laboratório de Ficologia, por disponibilizar o fotomicroscópio, sem o qual parte dessa monografia não seria possível.

E a todos que ajudaram direta ou indiretamente na realização dessa monografia.

RESUMO

A Mata Atlântica, considerada um dos *hotspots* de biodiversidade do Mundo, tem somente 7% de sua formação original. Portanto, sua conservação é de grande importância para a manutenção da biodiversidade brasileira. A variabilidade cariotípica característica da ordem Rodentia, permite a identificação específica e estudos filogenéticos, interessantes para agregar conhecimentos à lista de mastofauna do sul do Brasil, sendo uma ferramenta eficaz e barata que pode ser amplamente utilizada em projetos de conservação e manejo de fauna. Este trabalho tem como objetivo analisar a variabilidade cariotípica em roedores do Parque Estadual Acaraí, através de técnicas de citogenética clássica - coloração comum em Giemsa, bandeamentos CTG, GTG e Ag-NOR. A amostra do presente trabalho, com 18 exemplares analisados citogeneticamente, revelou uma significativa presença de *Akodon montensis* (83,33%) e, na sequência, *Oligoryzomys nigripes* (11,11%) e *Euryoryzomys russatus* (5,55%). *Akodon montensis*, mostrou uma variação tanto no número de cromossomos ($2n = 24$ a 26) como no número de braços de autossomos ($NF_A = 42$ a 46), devido a ocorrência de um ou dois cromossomos Bs. Nas demais espécies não foram observadas alterações no complemento genômico. Na fêmea de *E. russatus* o número de cromossomos foi igual a 80, com o $NF_A = 86$, e nos dois machos de *O. Nigripes*, $2n=62$ e $NF_A=82$. No bandeamento Ag-NOR, em *A. montensis*, foram analisadas em média 10 células de cada indivíduo, sendo observadas marcações em vários dos autossomos, em especial nos pares 2 e 10 devido ao reconhecimento fácil dos mesmos. Em dois dos exemplares com $2n=25$ foram observadas marcações no cromossomo B: dupla (nas regiões teloméricas dos braços p e q) e simples (região telomérica do braço q). Na fêmea de *E. russatus* foram observadas em média 6 marcações Ag-NOR por célula, e em *O. nigripes*, face a problemas técnicos, não se obteve um padrão confiável.

ABSTRACT

The Atlantic Forest is considered one of the biodiversity hotspots of the world, has only 7% of its original formation. Therefore its conservation is of great importance for the maintenance of Brazilian biodiversity. The karyotype variability, characteristic of the Order Rodentia, allows, the specific identification and phylogenetic studies, wich adds knowledge to the list of mammals from southern Brazil, and is a vital tool in conservation projects and wildlife management. This work aims to analyze the karyotype variability in rodents of the Acaraí State Park, through techniques of classical cytogenetics - Common staining in Giemsa, CTG banding, GTG banding and Ag-NOR. The sample of this study, consists of 18 specimens. The cytogenetics analysis revealed a significant presence of *Akodon montensis* (83.33%) and, also, *Oligoryzomys nigripes* (11.11%) and *Euryoryzomys russatus* (5.55%). *Akodon montensis* showed a variation in both number of chromosomes ($2n = 24-26$) and the number of arms of autosomes (NFA = 42-46), due to the occurrence of one or two supernumerary chromosomes. In the other species, no changes were observed in the genomic complement. In the female of *E. russatus* the chromosome number was equal to 80, with the NFA = 86, and the two males of *O. nigripes*, $2n = 62$ and NFA = 82. Analysis of an average of ten cells of each individual, showed Ag-NOR staining in several autosomes, particularly in pair 2 and 10. In two specimen with $2n=25$, were observed Ag-NOR staining in the supernumerary chromosome, in one of them positive Ag-NOR staining was observed in both arms of the chromosome, in the other only the p arm was stained. In the specimen of *E. russatus* were observed an average of six Ag-NOR staining per cell. Due to technical problems, the banding pattern of *O. nigripes* was unsuccessful.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	8
1.2 MATA ATLÂNTICA.....	8
1.3 ORDEM RODENTIA	10
1.3.1 ROEDORES DA MATA ATLÂNTICA	11
1.4 CITOGENÉTICA DE ROEDORES.....	11
1.4.1 CROMOSSOMOS B (EXTRANUMERÁRIOS)	13
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 ÁREA DE ESTUDO	15
3.2 MÉTODOS DE CAMPO	16
3.3 MÉTODOS DE LABORATÓRIO	17
3.3.1 PREPARAÇÃO CITOLÓGICA.....	17
3.3.2 COLORAÇÃO COMUM	18
3.3.3 BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO	18
4. RESULTADOS	20
4.1 <i>Akodon montensis</i> (Thomas, 1913).....	20
4.2 <i>Euryoryzomys russatus</i> (Wagner, 1848).....	24
4.3 <i>Oligoryzomys nigripes</i> (Olfers, 1818)	26
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	31
7. REFERENCIAS	32

INDÍCE DE FIGURAS.

Figura 1: Localização do Parque Estadual Acaraí, na ilha de São Francisco do Sul, SC. (Fonte: Google Maps)	16
Figura 2: Cariótipo de <i>Akodon montensis</i> em coloração comum, com destaque aos cromossomos sexuais.	21
Figura 3: Classificação do tamanho dos cromossomos Bs, em relação aos pares 9 e 10.	21
Figura 4: Diferentes morfologias observadas nos cromossomos Bs de <i>A. montensis</i> . n= número de exemplares.	22
Figura 5: Metáfase em bandeamento GTG, em destaque o cromossomo B e o par sexual.	22
Figura 6: Cariótipo em bandeamento C, de um macho de <i>Akodon montensis</i> . Em destaque o par sexual e o cromossomo B.	23
Figura 7: Metáfases em Ag-NOR, mostrando marcações em autossomos e cromossomos B. Flechas incicando marcação no cromossomo extranumerário: nos braços p e q em um dos machos (a) e somente no braço p em outro macho (b).	24
Figura 8: Cariótipo em coloração comum de uma fêmea de <i>Euryoryzomys russatus</i> (2n=80; NF _A =86)	25
Figura 9: Metáfase em banda Ag-NOR na fêmea de <i>Euryoryzomys russatus</i> (flechas menores). Flecha maio mostrando associação.	26
Figura 10: Cariótipo em coloração comum de macho de <i>Oligoryzomys nigripes</i> (2n=62; NF _A =82)	27

INDÍCE DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos exemplares das três espécies de acordo com a subformação vegetal.....	15
Tabela 2: Achados citogenéticos quanto as 2n e NFA nas três espécies sob estudo.	20
Tabela 3: Ocorrência absoluta de cromossomos Bs na amostra de <i>Akodon montensis</i> do presente trabalho.	21
Tabela 4: Padrão Ag-NOR em <i>A. montensis</i> , considerando-se os 2n e os cromossomos marcados em 10 células/exemplar.....	23

1. INTRODUÇÃO

A ordem rodentia é considerada a ordem com maior número de espécies descritas (MUSSER E CARLETON ,2005; WEKSLER *et al*, 2009; COSTA *et al*, 2005; D'ELIA e PARDIÑAS, 2007) e apesar de apresentar uma grande variabilidade cariotípica, alguns gêneros possuem uma constância morfológica que dificulta a identificação específica. Os estudos citogenéticos são de grande importância tanto para a identificação específica confiável quanto para os estudos de variabilidade cariotípica das espécies, permitindo assim, verificar alterações nos complementos padrões dos organismos e possíveis alterações cromossômicas. Este trabalho estudou 18 roedores, provenientes do Parque Estadual Acaraí, SC, e visou realizar estudos citogenéticos para a identificação específica e para conhecer o padrão de bandejamento cromossômicos dos roedores do parque. O Parque Estadual Acaraí se encontra em uma região de Mata Atlântica nativa, e, devido ao avançado estado de degradação em que se encontra as regiões de Mata Atlântica, estudos para conhecimento dos animais ocorrentes nesta formação florestal é de vital importância para o desenvolvimento de planos de manejo e conservação eficientes.

1.2 MATA ATLÂNTICA

A Floresta Atlântica é um dos biomas mais ameaçados do Mundo e abriga grande parte da biodiversidade brasileira. A extensão da mata forma ambientes e ecossistemas quase contínuos por praticamente todo o litoral brasileiro, sendo presente desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul (VELOSO, 1991). Segundo MITTERMEIER *et al* (2004), a Mata Atlântica pode ser considerada um dos *hotspots* de biodiversidade mundial, devido seu alto nível de riqueza e endemismos.

Apesar do tamanho, a Mata Atlântica é dividida em somente duas regiões, sendo elas a Mata Atlântica *lato sensu* e *strito sensu*.

A Mata atlântica considerada como *lato sensu*, segundo VELOSO (1991), é a vegetação que apesar de fragmentada, ocorre ao longo de todo o litoral brasileiro, do Rio Grande do Sul ao Rio Grande do Norte com extensões

ao interior do país. Composta em sua maioria por Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila Mista e Densa, com algumas regiões de formação pioneira como manguezais, campos salinos e restingas. Enquanto a Mata Atlântica *lato sensu*, engloba 17 estados brasileiros. Já a mata *strito sensu*, fica estrita às áreas de floresta ombrófila densa litorânea, que se assentam em um relevo serrano, especialmente no sul e sudeste do país.

As formações vegetais encontradas na Mata Atlântica são as formações ombrófila mista, ombrófila densa e estacional semidecidual. Segundo VELOSO (1991), as formações Ombrófila Densa e Ombrófila Mista podem ser subdivididas em Formação Aluvial, Formação Terras Baixas, Formação Sub Montana, Formação Montana e Formação Alto Montana. Estas diferenciam-se pelo relevo, que pode ser serrano até planaltos, altitude e latitude.

Sofrendo influências antropológicas há séculos, a mata está reduzida a somente 7,9% de sua formação inicial (S.O.S MATA ATLÂNTICA, 2011). Isto evidencia que ações de conservação e manejo são extremamente necessárias se quisermos manter a riqueza da mata. Para que ações de manejo e conservação sejam possíveis, é de extrema importância que sejam feitos esforços para produzir materiais descritivos dos animais pertencentes à mata.

Para PAGLIA *et al* (2012), o Brasil possui 701 espécies de mamíferos, sendo que 298 espécies ocorrem na Floresta Atlântica e 90 são endêmicas. Observa-se que de todas as espécies de mamíferos ocorrentes, 98 pertencem à ordem Rodentia. BONVICINO *et al* (2002) sugerem a utilização dos roedores como bioindicadores de condições ambientais, podendo ser separados em dois grupos: as espécies sensíveis, que não ocorrem em ambientes modificados, e as resistentes, que ocorrem em ambientes modificados. Os representantes do primeiro grupo podem demonstrar o grau de alteração em que se encontra seu habitat, através do comportamento ou desaparecimento do ambiente. Este tipo de monitoramento ambiental, com estudo de animais, é necessário para o planejamento de ações de conservação e restauração das áreas, que precisam ser vistas como medidas prioritárias nas políticas de manejo e conservação dos governos.

1.3 ORDEM RODENTIA

Atualmente, com pouco mais de 2.277 espécies descritas (MUSSER E CARLETON, 2005; WEKSLER *et al*, 2009; COSTA *et al*, 2005; D'ELIA e PARDIÑAS, 2007), a ordem Rodentia possui a maior riqueza de espécies dentre os mamíferos placentários, incluindo desde camundongos e ratos, animais de pequeno porte, a capivaras. Os roedores são de extrema importância ecológica, sendo elemento chave em relações ecológicas entre diversos organismos. As numerosas radiações adaptativas bem sucedidas se devem a grande variedade de hábitos alimentares pois, apesar de predominantemente herbívoros, podem recorrer a dietas insetívoras, carnívoras, onívoras ou piscívoras (*apud* HASS, 2006).

A Ordem Rodentia está presente em praticamente todos os biomas terrestres e semi-aquáticos, exceto nos ambientes antárticos e inteiramente aquáticos. Isto mostra a grande diversidade desta Ordem tanto em habitats quanto em hábitos (CARLETON e MUSSER, 2005). A grande maioria dos roedores possui um tamanho corporal pequeno, se comparado com outros mamíferos, sendo a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (LINNAEUS, 1766) a maior representante da Ordem, já os menores representantes pertencem a Família Muridae (SAVAGE, 1986). Com relação às características morfológicas, a do crânio é fundamental da Ordem, onde tanto as maxilas quanto às mandíbulas são marcadas pela presença de um par de incisivos que possuem crescimento constante, com uma tendência na redução do tamanho dos pré-molares. Também podem ser analisados outros caracteres, como cor de pelos, tamanho dos olhos e orelhas, comprimento do corpo, cauda, microestrutura de pelos, entre outras.

Apesar do pequeno tamanho corporal da maioria dos exemplares, os roedores possuem uma enorme variabilidade cariotípica, como observado em gêneros como *Akodon*, que, juntamente com dados morfológicos, se apresentou como uma importante característica não só para determinação de espécies como também para a resolução de questões evolutivas (SBALQUEIRO, 1989; HASS, 2006; VENTURA, 2009; ROMANENKO *et al*, 2011).

1.3.1 ROEDORES DA MATA ATLÂNTICA

As espécies de roedores ocorrentes na Mata Atlântica são relativamente bem conhecidas. Segundo o GUIA DE IDENTIFICAÇÃO DE ROEDORES (BONVICINO *et al* 2008), ocorrem um gênero da Família Sciuridae e 20 gêneros da família Sigmodontinae, e segundo PAGLIA *et al* (2012) existem 98 espécies com registros na Mata Atlântica, sendo que 38 delas são endêmicas.

Segundo BALIEIRO (2012), são esperados para a região do Parque do Acaraí, animais das espécies *Akodon montensis*, *Akodon sp.*, *Delomys sublineatus*, *Euryoryzomys russatus*, *Nectomys squamipes* e *Oligoryzomys nigripes*. Este autor objetivou amostrar todas as espécies ocorrentes no Parque, salientando, entretanto, que o sucesso da coleta depende de vários fatores que podem afetar diretamente a amostragem de algumas espécies em detrimento de outras.

1.3 CITOGENÉTICA DE ROEDORES

Algumas espécies, provavelmente por estarem em processo inicial de diferenciação, não apresentam ainda caracteres morfológicos diagnósticos, entretanto, existem casos onde nem sempre as diferenças morfológicas são evidentes, mesmo com o processo de especiação completo (SBALQUEIRO, 1989). Também não é raro que tais espécies, com distribuições próximas, apresentem zonas de hibridações, como são os casos das espécies crípticas de *Akodon*, onde suas identificações tornam-se mais seguras com o uso da citogenética. JACKSON (1970) defende a aplicação da citogenética como de importância fundamental nos estudos de sistemática e taxonomia.

Existem, entretanto, grupos em que a diferença morfológica é muito mais acentuada entre as espécies, as quais podem ou não ter constância cariotípica. Isto verifica-se, entre os mamíferos, nos marsupiais (REIG *et al.*, 1981), quirópteros, pinipédios, cetáceos e camelídeos (BAKER e PATTON, 1967; ARNASON, 1972, 1974; ARNASON e BENIRSCHKE, 1973; TAYLOR *et al.*, 1968; BUNCH *et al.*, 1985; BIANCHI *et al.*, 1986; apud SBALQUEIRO, 1989). De um modo geral, os mamíferos apresentam grande variabilidade cariotípica.

Na ordem Rodentia, por exemplo, o número de cromossomos varia de 10 em *Akodon sp* (SILVA e YONENAGA-YASSUDA, 1998) até 102, em *Tympanoctomys barrerae*, pertencente à família Octodontidae (CONTRERAS *et al.*, 1990). Esta, inclusive, é considerada a espécie de mamíferos com o maior número de cromossomos.

A variabilidade cromossômica pode ser o resultado de alterações ocorridas tanto na estrutura como no número de cromossomos, ou em ambos (ROMANENKO *et al.*, 2011). A variabilidade cromossômica e morfológica é bastante evidente em certos grupos, mas há exemplos em que uma destas variabilidades se destaca em relação a outra, como por exemplo, a grande variabilidade cariotípica do gênero *Akodon*, defronte sua constância morfológica. A diversidade cariotípica permite, muitas vezes, identificar quais foram os eventos citogenéticos que ocorreram durante o processo evolutivo do grupo. ZANCHIN *et al.*(1992), verificaram que em *Delomys* há uma clara distinção cariotípica e de pelagem, contrastando com a similaridade de caracteres craniomorfológicos entre as espécies: *D. sublineatus* ($2n = 72$) e *D. dorsalis* ($2n = 82$). Contudo, neste caso, é difícil apontar quais foram os eventos citogenéticos que diferenciaram os dois cariótipos, pois além de fusões cêntricas e inversões pericêntricas outros rearranjos devem ter ocorrido.

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 cromossômicas , p. ex., de uma mesma espécie coletada em diferentes áreas geográficas, ou de diferentes espécies, possibilitando, desta maneira, a elaboração de propostas filogenéticas fundamentadas em dados cromossômicos (SBALQUEIRO 1989). A partir do trabalho pioneiro de CASPERSSON *et al.* (1968), em bandamento Q, diversas técnicas alternativas foram desenvolvidas: bandas G (SEABRIGHT 1971, 1972); bandas R (DUTRILLAUX e LEJEUNE, 1971); bandas C (SUMNER, 1972); bandas T

(DUTRILLAUX, 1973); bandas N (MATSUI e SASAKI, 1973) e bandas NOR (HOWELL e BLACK, 1980).

Mais recentemente, têm sido aplicadas técnicas moleculares como a Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH), destacando-se, entre outras, pintura cromossômica recíproca, pintura cromossômica reversa e pintura cromossômica multidirecional em espécies silvestres (HASS, 2001, HASS *et al*, 2006; HASS *et al* 2008; HASS *et al* 2011; de OLIVEIRA, 2001; de OLIVEIRA *et al*; 2002, 2004, 2005a,b; VENTURA *et al.*, 2009; WIENBERG e STANYON, 1998).

1.4.1 CROMOSSOMOS B (EXTRANUMERÁRIOS)

Cromossomos extranumerários, também conhecidos como cromossomos B, são elementos genômicos extras ao complemento cromossômico padrão de uma espécie, e podem ocorrer em vários organismos. Os cromossomos B são amplamente distribuídos em plantas e animais, sendo que nestes foram observados em aproximadamente 25 espécies (*apud* YONENAGA-YASSUDA *et al*, 1985). Algumas das principais características que diferenciam os cromossomos B dos cromossomos do complemento básico são: seu tamanho variado, mas geralmente pequeno, seu comportamento instável durante a divisão celular, por falta de pareamento, instabilidade esta que pode levar a variações numéricas, mecanismos de acumulação ou perda e até uma segregação não mendeliana e a presença ou ausência dos cromossomos extranumerários não afeta, aparentemente, o fenótipo (SBALQUEIRO, 1989).

. Segundo JONES e REES (1982) e SBALQUEIRO (1989) os cromossomos extranumerários não devem portar genes estruturais e sim, possuem efeitos aditivos similares aos complexos poligênicos, que promovem modificações contínuas sobre o fenótipo. THOMPSON *et al* (1984) perceberam em *Rattus fuscipes assimilis*, um aumento significativo na frequência média de quiasmas nas células em que ocorriam cromossomo B, já células onde com mais que um cromossomo extranumerário não foram observadas efeitos aditivos sobre a frequência de quiasmas. Para JONES e REES (1982), a consequência deste fenômeno seria um aumento na variabilidade genética, pela geração de novas combinações genotípicas.

Em representantes Rodentia brasileiros, esses cromossomos já foram descritos em espécies de *Proechimys*, *Oligoryzomys*, *Nectomys* e *Akodon*. Embora sua função exata no complemento genômico seja desconhecida, existem evidências que o cromossomo B possui atividade durante o processo de divisão celular, visto que apresenta marcação Ag-NOR positiva em alguns exemplares (YONENAGA-YASSUDA *et al*, 1992).

2. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho objetiva identificar e estudar citogeneticamente uma amostra de espécies de roedores ocorrentes no Parque Estadual do Acaraí, em São Francisco do Sul, Santa Catarina.

2.1 OBJETIVOS ESPÉCIFICOS

2.1.1 – Confirmar as identificações específicas feitas através de dados morfológicos, comparando os cariótipos encontrados com os descritos na literatura

2.1.2 - Estabelecer seus padrões de bandamentos: C, G e regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NOR);

2.1.3 - Analisar a variabilidade cariotípica das espécies encontradas na região do presente estudo, caracterizando-as geograficamente e compará-las às descritas na literatura pertinente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A amostra do presente trabalho é composta por 18 exemplares, pertencentes a três espécies de cricetídeos, cujas as análises morfológicas apontam ser: *Akodon montensis* (AMO) – 11 machos e 4 fêmeas; *Euryoryzomys russatus* (ERU) – uma fêmea; *Oligoryzomys nigripes* (ONI) – dois machos, coletados em três diferentes áreas (subformação vegetal) do Parque Estadual Acaraí (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição dos exemplares das três espécies (caracterizadas morfológicamente) de acordo com a subformação vegetal.

Espécies	N	Campo	Terras baixas	Submontana
AMO	15	6	3	6
ONI	2	-	2	-
ERU	1	-	-	1

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A Ilha de São Francisco do Sul está situada no nordeste de Santa Catarina, no Sul do Brasil. O clima sofre grande influencia da umidade provinda do mar, o que faz com que a área apresente grande volume pluviométrico. O Parque Estadual Acaraí, juntamente com o arquipélago Tamboretes, é formado por uma área de aproximadamente 6.667ha (BALIEIRO, 2012). A Floresta Ombrófila Densa, que possui ampla distribuição no Brasil, pode ser dividida em cinco subformações (VELOSO 1991). Segundo BALIEIRO (2012), somente três destas ocorrem no Parque Acaraí: Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas, Floresta Ombrófila Densa Submontana e Floresta Ombrófila Densa Aluvial. Além destas, conforme ainda este autor, mais duas subformações são encontradas - Campo e Restinga.

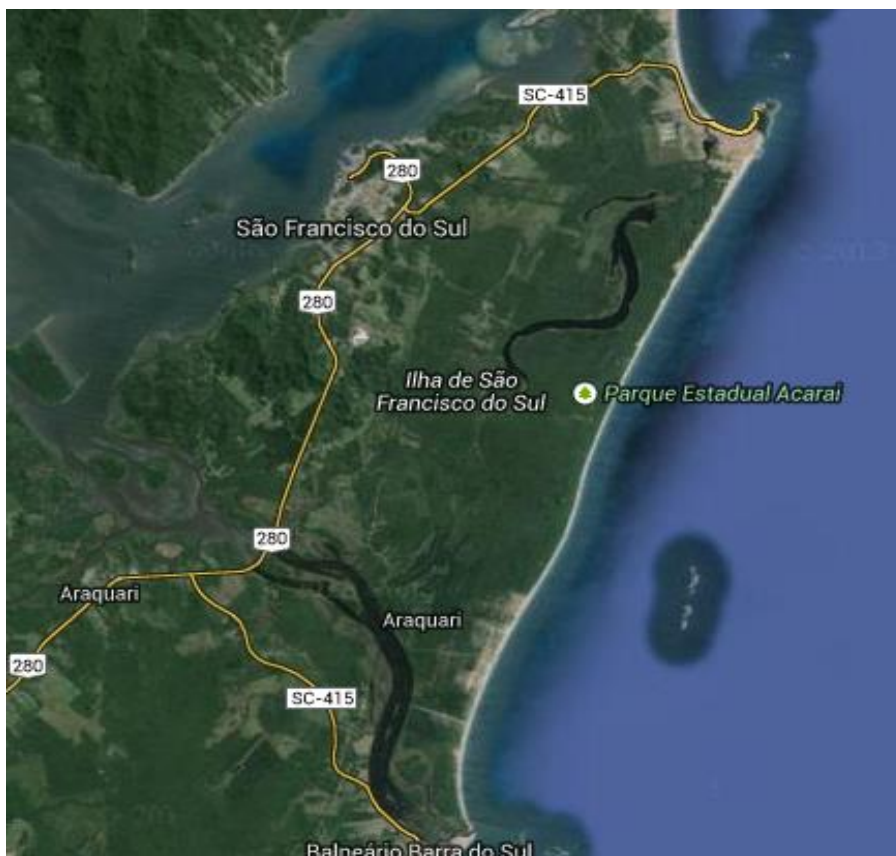


Figura 1: Localização do Parque Estadual Acaraí, na ilha de São Francisco do Sul, SC. (Fonte: Google Maps)

3.2 MÉTODOS DE CAMPO

Duas foram as campanhas de campo, com sete dias/noites, em Junho e Dezembro de 2012. A região amostrada estendeu-se por três áreas de formações distintas (Tabela-1). Em cada uma das regiões, foi plotada uma linha com 15 estações equidistantes em 20 metros; em cada estação foram colocadas duas armadilhas: uma no solo (Sherman, 43 x 12,5 x 14,5 cm) e a outra no sub-bosque a uma altura de aproximadamente 1,5m (Tomahawk, 45 x 16 x 16 cm), totalizando 30 armadilhas por linha. As armadilhas permaneceram abertas por sete dias consecutivos e, como iscas, utilizou-se uma mistura de banana, fubá médio, essência de abacaxi e pasta de amendoim, formando uma massa, para o modelo Sherman, ou rodelas de milho verde untados com a mesma massa para o modelo Tomahawk.

3.3 MÉTODOS DE LABORATÓRIO

3.3.1 PREPARAÇÃO CITOLÓGICA

A preparação citológica para obtenção de metáfases mitóticas, conforme SBALQUEIRO (1989), foi efetuada em duas etapas, sendo a primeira na Universidade Regional de Joinville (UNIVILLE) e a segunda no Laboratório de Citogenética Animal, Departamento de Genética/UFPR.

O seguinte procedimento foi obedecido.

Primeira Etapa (Joinville - UNIVILLE)

1 – Foi injetado intraperitonealmente em cada exemplar uma solução de 0,1% de colchicina (1 mL/100g peso animal); 2- Aguardou-se 60 minutos para aplicação de uma solução anestésica à base de quetamina (15mg/Kg) e xilazina (1mg/Kg); 3 – Após, o animal ser eutanasiado, foi iniciado o processo cirúrgico pelo qual foram retirados os fêmures do animal para obtenção do material da medula óssea; 4 – As epífises dos fêmures foram cortadas e, com uma seringa, através da medula, passadas 5 mL da solução hipotônica (0,075M KCl) a 37°C; 4 – Este material foi depositado em um tubo de centrifuga e ressuspendido gentilmente, com uma pipeta de Pasteur, até que a solução ficasse homogênea; 5 - Após 20 minutos em repouso o material foi centrifugado por 10 minutos e eliminado o sobrenadante; 6 – Na sequência, foram adicionados 5 ml de solução fixadora alcoólica (3 Metanol: 1 Ácido Acético) e ressuspendido o material. O material obtido foi mantido em freezer até o seu transporte a Curitiba.

Segunda Etapa (Curitiba - UFPR)

No Laboratório de Citogenética Animal foram realizadas pelo menos três trocas da solução fixadora (material ressuspendido, centrifugado, retirado sobrenadante e colocado 5ml de solução fixadora recém preparada), para, então, processar-se a montagem das lâminas (material citológico fixado em lâminas previamente lavadas e mantidas em álcool absoluto). Estas lâminas foram submetidas a diferentes tipos de colorações.

3.3.2 COLORAÇÃO COMUM

As lâminas com o material fixado foram mergulhadas em uma solução de corante Giemsa, pH 6,8, diluída em água destilada a 5% por 5 a 10 minutos, em temperatura ambiente.

3.3.3 BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO

3.3.3.1 BANDEAMENTO GTG

Modificada de SBALQUEIRO (1989), evidencia, faixas claras e escuras, ao longo do cromossomo, sendo que as faixas escuras representam áreas ricas em A-T, e condensam mais tardiamente na prófase.

- 1- Envelhecer lâminas em estufa a 40°C por 4 dias.
- 2- Incubar lâminas envelhecidas em solução 2SSC em temperatura ambiente por 3 minutos.
- 3- Mergulhar a lâmina em solução de 0,03% de tripsina (SIGMA), preparada em solução salina 0,9% por 20 segundos.
- 4- Lavar rapidamente em água destilada, seguida de solução salina 0,9% + Soro Bovino Fetal e água novamente.
- 5- Corar em Giemsa 2% tamponada com tampão fosfato pH 6,8 de 3 a 5 minutos.

3.3.3.2 BANDEAMENTO C

Modificadas de SBALQUEIRO (1989), proporciona a visualização das bandas C (regiões de heterocromatina constitutiva).

- 1- Envelhecidas em estufa a 42°C por 4 dias, as lâminas foram mergulhadas em solução de 5% de Hidróxido de Bário ($Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$) em banho-maria a 45°C durante 30 segundos a 2 minutos.
- 2- As lâminas foram lavadas em água destilada e secadas em temperatura ambiente.
- 3- Após secas as lâminas foram incubadas em solução de 2SSC (0,3M NaCl + 0,03Na₃C₆H₅O₇) por 15 minutos, em banho-maria a 60°C.

- 4- Lavadas em água destilada e coradas em Giemsa 5% tamponada com tampão fosfato pH 6,8, por 8 minutos.

3.3.3.3 BANDEAMENTO NOR

Foram realizadas segundo SBALQUEIRO (1989), evidencia as regiões organizadoras de nucléolo.

- 1- Incubar lâminas envelhecidas por 5 dias a 42°C, em HCl, 0,2N por 5 minutos Lavar bem com água destilada
- 2- Incubar em Tampão Borato pH 9,0 por 10 minutos.
- 3- Pingar duas gotas de solução coloidal e 4 de solução de Nitrato de Prata em cima da lâmina e misturar gentilmente com uma pipeta.
- 4- Colocar uma lamínula sob a lâmina, fazendo com que a mistura de soluções se espalhe pela lâmina.
- 5- Incubar em câmara úmida e escura a 70°C por, em média, 8 minutos.
- 6- Lavar a lâmina para retirar a lamínula e o excesso de solução.
- 7- Corar em Giemsa 2% (tamponada pH 6,8) por 30 segundos.

3.3.3.4 CAPTURA DE IMAGENS E MONTAGEM DE CARIÓTIPO

As imagens das metáfases apresentadas e/ou dos cariótipos no presente trabalho ficaram prejudicadas, tendo em vista os vários problemas com o fotomicroscópio da Zeiss Axiophot do Setor de Ciências Biológicas (SCB), dotado de um sistema de capturas de imagens apropriado para cariotipagem, que está desativado desde março de 2014, após ter sido molhado durante uma chuva, pois o telhado da sala de Microscopia do Setor encontra-se com problemas de goteira. Após o ocorrido foi verificada a impossibilidade de utilização da placa circuito do equipamento (fotomicroscópio da Zeiss Axiophot) que encontra-se em fase final de manutenção. Foram, então, tentadas as capturas dessas imagens em outros fotomicroscópios existentes em diversos laboratórios do SCB. As montagens de cariótipo, a partir das metáfases digitalizadas, foram realizadas utilizando o software Adobe Photoshop©.

4. RESULTADOS

Na Tabela 2 apresentamos os resultados das análises em coloração Giemsa quanto aos números de cromossomos (2n) e o número de braços dos autossomos (NFA), das três espécies estudadas. Saliente-se que todos os exemplares foram capturados com armadilhas Sherman, ou seja, no solo.

Tabela 2: Achados citogenéticos quanto as 2n e NF_A nas três espécies sob estudo.

Espécie	Sexo	2n	NFA	Total
<i>Akodon montensis</i>	Fêmea	24	42	1
		25	44	3
	Macho	24	42	3
		25	44	5
		26	46	3
<i>Euryoryzomys russatus</i>	Fêmea	80	86	1
<i>Olygoryzomys nigripes</i>	Macho	62	82	2
TOTAL DE EXEMPLARES				18

Akodon montensis foi a espécie que apresentou o maior número de capturas (15/18 = 83,33%), ao passo que as outras duas, *Olygoryzomys nigripes* e *Euryoryzomys russatus*, com 11,11% e 5,55%, respectivamente, com valores bem inferiores, e apenas *Akodon montensis* mostrou variações tanto no 2n (24 a 26) como no NF_A (42 a 46).

4.1 *Akodon montensis* (Thomas, 1913)

Akodon montensis (AMO) foi a espécie mais coletada na amostra, - 15 indivíduos -, e nas três subformações vegetais (Tabela 1). O cariótipo dessa espécie apresentou variação tanto no número diploide (2n) quanto no número de braços autossômicos (NF_A), devido a presença de cromossomos extranumerários (Tabela 3) em 73,33% dos indivíduos coletados desta espécie. A Figura 2 mostra o cariótipo de AMO que consiste de 12 pares de cromossomos, sendo 10 de autossomos que variam de meta- a submetacêntricos (pares 1 a 9 e 11), mais um par acrocêntrico (par 10). No par sexual, o cromossomo X é um acrocêntrico médio ao passo que o Y é acrocêntrico pequeno, de tamanho equivalente ao do par 11. Os cromossomos Bs apresentaram variações tanto no tamanho como na morfologia, em especial os de tamanho pequeno (Figura 3). A classificação do tamanho foi visual, levando-se em conta o dos cromossomos B em relação aos dos pares 9 e 10,

pelo fato daqueles se situarem entre estes no cariótipo. Dois foram os tamanhos tentativamente identificados (Figura 3): a) tipo-I – maior do que o par 9; b) tipo-II – tamanho equivalente ao par 10. Com relação à morfologia (Figura 4), esta variou de submetacêntrica a metacêntrica, em particular nos Bs de tamanho menor (tipo-II).

Tabela 3: Ocorrência absoluta de cromossomos Bs na amostra de *Akodon montensis* do presente trabalho.

sexo/n° B	0	1	2
Machos	3	5	3
Fêmeas	1	3	-
Total	4	8	3

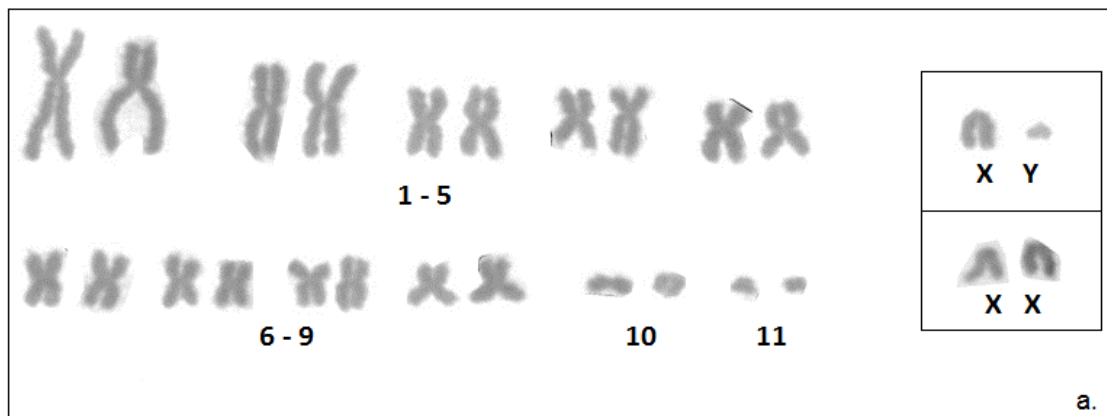


Figura 2: Cariótipo de *Akodon montensis* em coloração comum, com destaque aos cromossomos sexuais.

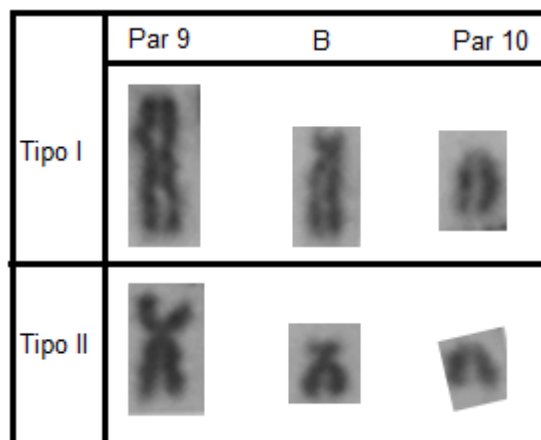


Figura 3: Classificação do tamanho dos cromossomos Bs, em relação aos pares 9 e 10.




	SubMeta		Meta
			
n	3	6	3

Figura 4: Diferentes morfologias observadas nos cromossomos Bs de *A. montensis*. n= número de exemplares.

Através do padrão das bandas G identificamos todos os pares cromossômicos do conjunto A, ao passo que nos cromossomos Bs não se detectou um padrão definido, conforme se observa na Figura 5.

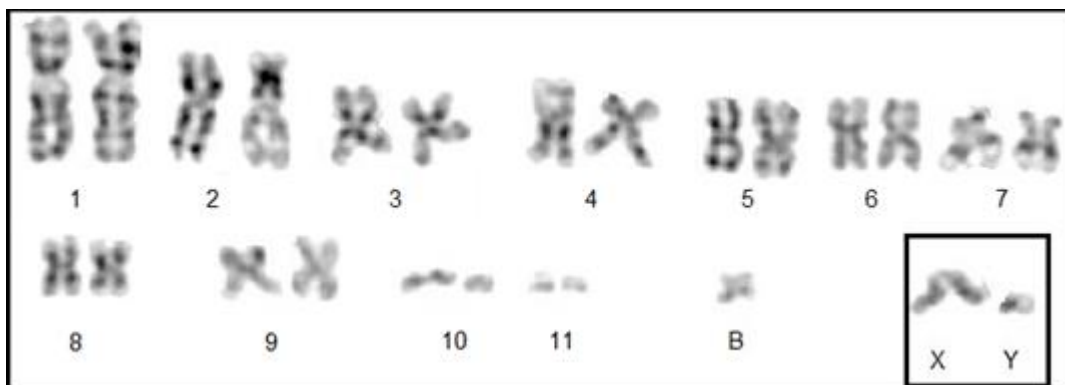


Figura 5: Metáfase em bandeamento GTG, em destaque o cromossomo B e o par sexual.

Na Figura 6 é possível observar que as marcações de heterocromatina constitutiva em *Akodon montensis* são bem discretas e restritas às regiões centroméricas, encontradas nos pares 2, 5, 7 e X, em contrapartida o cromossomo Y foi inteiramente marcado. Nos cromossomos Bs não se observou uma marcação que o distinguisse dos autossomos não marcados.

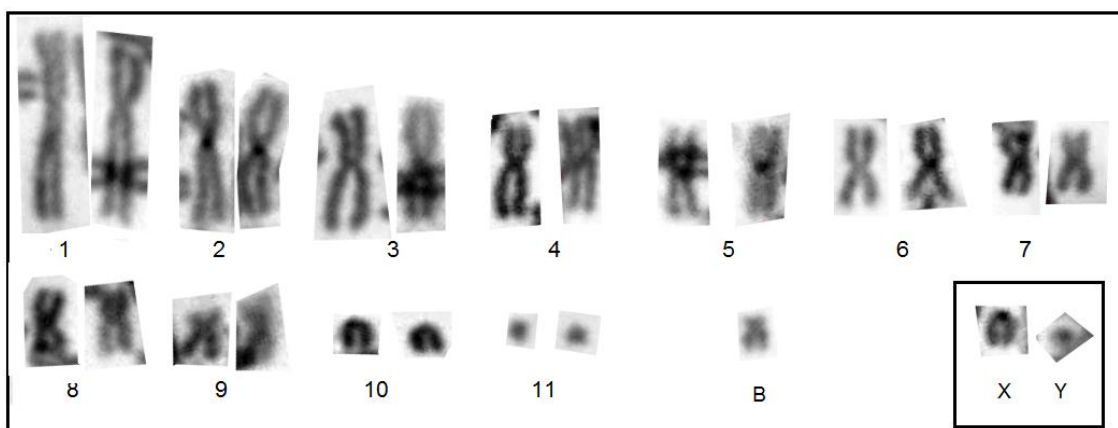


Figura 6: Cariótipo em bandeamento C, de um macho de *Akodon montensis*. Em destaque o par sexual e o cromossomo B.

Foram analisadas 10 células por exemplar, sendo que em todas ocorreu tal marcação, independente dos seus 2n (Tabela 4). Os cromossomos dos pares 2 e 10 foram, em média, os mais frequentemente marcados – $8,1 \pm 1,4$ e $8,7 \pm 1,5$, respectivamente. Nos cromossomos dos pares 3-9 foram evidenciadas marcações teloméricas no braço curto, ao passo que no par 10 e par 2, no braço longo. Em dois dos machos com cromossomo B foram observadas marcações Ag-NOR teloméricas, sendo que em um deles tanto o braço p como o q foram marcados, e no outro apenas no braço p (Figura 7).

Tabela 4: Padrão Ag-NOR em *A. montensis*, considerando-se os 2n e os cromossomos marcados em 10 células/exemplar.

Prot.	2n	cromossomo			
		2p*	3-9p*	10q*	B
ABI-373	24	7	8	8	-
ABI-382	24	7	8	6	-
ABI-383	24	6	-	6	-
ABI-385	24	9	10	9	-
ABI-374	25	8	10	10	-
ABI-374.2	25	7	6	7	-
ABI-375	25	9	8	8	-
ABI-376	25	7	7	10	8q*
ABI-377	25	6	-	7	-
ABI-381	25	10	10	10	10pq*
ABI-409	25	8	8	9	-
ABI-411	25	10	10	10	-
ABI-405	26	10	10	10	-
ABI-407	26	8	9	10	-
ABI-408	26	10	10	10	-
média±dp	-	$8,1 \pm 1,4$	$7,6 \pm 3,2$	$8,7 \pm 1,5$	$1,6 \pm 3,5$

OBS. * = braços cromossômicos

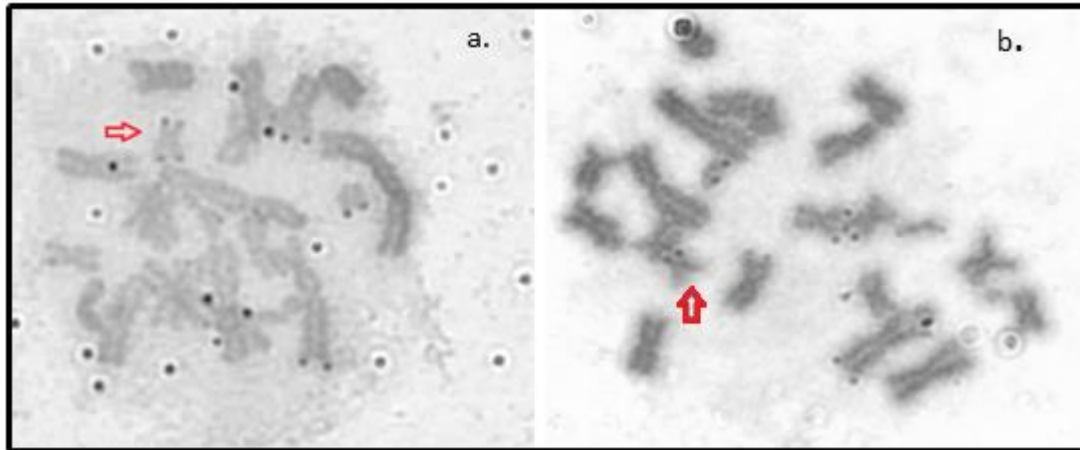


Figura 7: Metáfases em Ag-NOR, mostrando marcações em autossomos e cromossomos B. Flechas indicando marcação no cromossomo extranumerário: nos braços p e q em um dos machos (a) e somente no braço p em outro macho (b).

4.2 *Euryoryzomys russatus* (Wagner, 1848)

Foi capturado apenas um exemplar (fêmea) de *Euryoryzomys russatus* (ERU), na floresta ombrófila densa sub-montana. Esta apresentou $2n=80$ e o $NFA=86$, com 35 pares autossômicos acrocêntricos (pares 1 a 35) e quatro pares metacêntricos (pares 36 a 39), sendo que os dois cromossomos X apresentaram morfologia submetacêntrica (Figura 8).

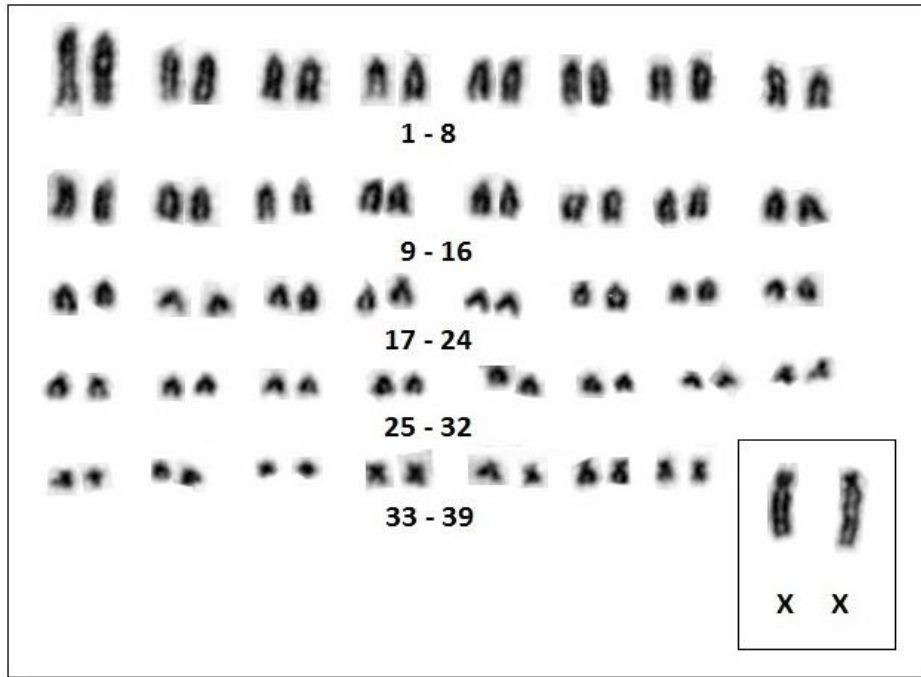


Figura 8: Cariótipo em coloração comum de uma fêmea de *Euryoryzomys russatus* ($2n=80$; $NFA=86$)

A análise do padrão de Ag-NOR baseou-se em 50 células, todas com marcação em vários autossomos, variando de 5 a 8 por célula ($\bar{x} = 6 \pm 0.8$) (Figura 9). Em 92% das células observadas houve a presença de uma associação entre dois cromossomos, revelado pela presença de uma forte marcação (Figura 9).

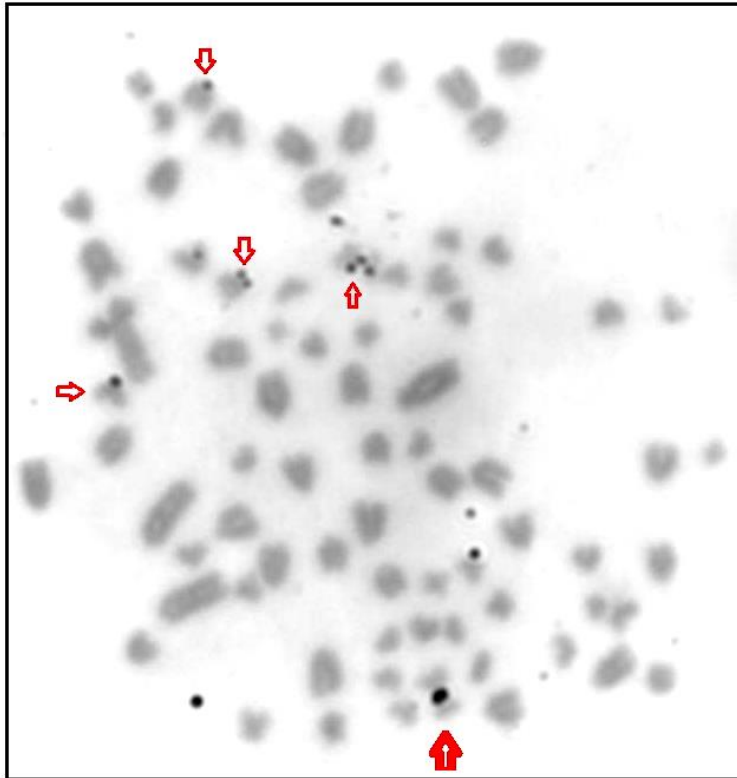


Figura 9: Metáfase em banda Ag-NOR na fêmea de *Euryoryzomys russatus* (flechas menores). Flecha maior mostrando associação.

4.3 *Oligoryzomys nigripes* (Olfers, 1818)

Foram capturados dois machos de *Oligoryzomys nigripes* (ONI), na floresta ombrófila densa de terras baixas. A análise citogenética, em coloração comum, revelou as presenças de 62 cromossomos (Figura 10), sendo, entre os autossomos, 11 pares de cromossomos meta-submetacêntricos (Pares 1 a 11) e 19 de acrocêntricos (pares 12 a 30), que resultou em $NF_A=82$. No par sexual, tanto o X como o Y mostraram-se submetacêntricos, onde o X apresentou tamanho entre os pares 1 e 2, ao passo que o Y entre os pares 4 e 5. Devido à baixa qualidade do material citológico, a aplicação das diferentes técnicas de bandamentos não resultou em padrões de bandas satisfatórias, por este motivo não foram apresentadas.

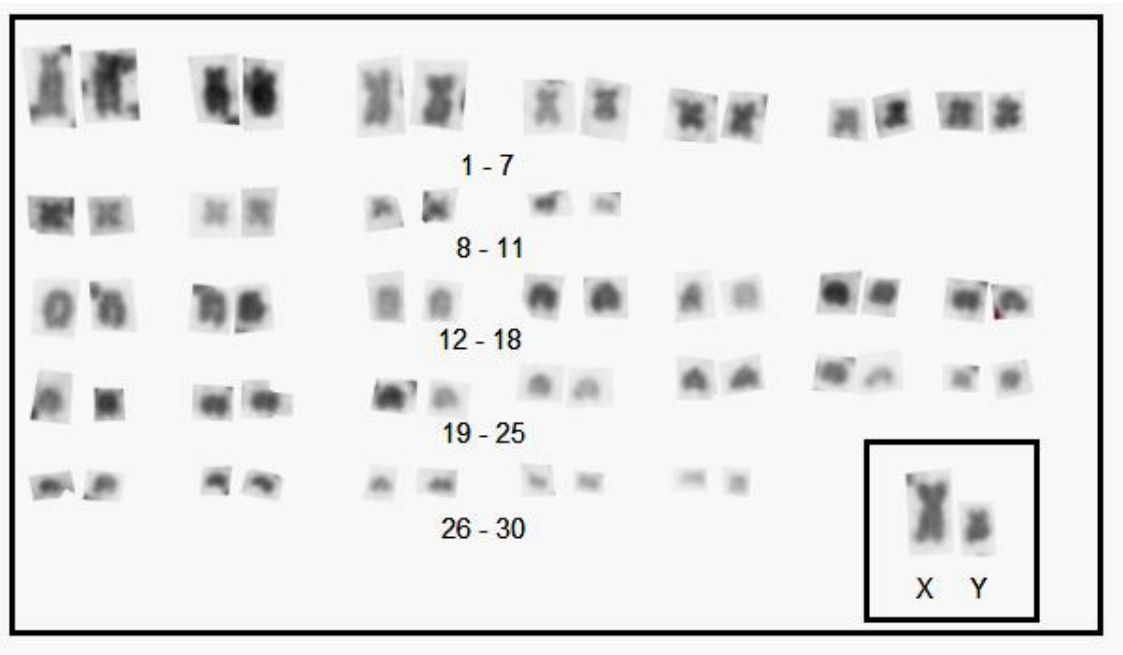


Figura 10: Cariótipo em coloração comum de macho de *Oligoryzomys nigripes* ($2n=62$; $NF_A=82$)

5. DISCUSSÃO

A presença expressiva da espécie *Akodon montensis* no parque estadual do Acaraí já foi descrita anteriormente por BALIEIRO (2012). A alta frequência de cromossomos extranumerários encontrados nos indivíduos de *A. montensis* é relativamente maior à encontrada em regiões continentais. O fato do parque do Acaraí ser localizado em uma ilha pode influenciar na frequência da ocorrência dos cromossomos extranumerários, devido ao isolamento da população insular em relação à população continental (PAESQUE et al, 2004; TESTONI, 2006,). O complexo genômico normal de *Akodon montensis* foi bastante constante, com 10 pares de cromossomos metacêntricos e um par de acrocêntricos pequenos, sendo os cromossomos sexuais dois acrocêntricos (SBALQUEIRO, 1989). Segundo BONVICINO et al (2008), AMO tem distribuição do Sul/Sudeste, tendo registro de cromossomos B em toda a área de distribuição de espécie (SBALQUEIRO, 1989; YONENAGA-YASSUDA et al, 1992; BALIEIRO, 2012; RABELO, 2007), estando a amostra dentro deste limite de distribuição geográfica. Os dados morfológicos coletados dos exemplares utilizados nesse trabalho não mostraram nenhuma diferença morfológica que pode ser relacionada à

presença do cromossomo B. Descreve-se nesta amostra uma variação quanto à morfologia dos cromossomos B: sub-metacêntrico tipo I, sub-metacêntrico tipo II e metacêntrico tipo II, fato não evidenciado em literatura específica relacionada a ocorrência de cromossomos B. YONENAGA-YASSUDA *et al* (1992) descreveu a presença de dois cromossomos extranumerários em AMO provenientes do Estado de São Paulo, juntamente com o padrão de marcação Ag-NOR. Os resultados do presente trabalho corroboram com YONENAGA-YASSUDA *et al* (1992) e com o ideograma apresentado por VENTURA *et al* (2009), onde as marcações NOR-Positivas mais frequentemente observadas estão em cromossomos dos pares 2, 4, 6, 7 e 10, VENTURA *et al* (2009) ainda coloca um ideograma com padrões de bandeamento GTG, que mostra que não houveram modificações nos padrões encontrados neste trabalho. Em relação ao bandeamento CTC, o padrão de marcações é bastante restrito à região centromérica dos pares 2, 5, 10 e X, sendo que o cromossomo Y é inteiramente marcado (SBALQUEIRO, 1989).

Também não foi encontrada na amostra uma relação de frequência de cromossomo B em machos e fêmeas. A frequência de marcações Ag-NOR positivas em cromossomos extranumerários foi de 18,18%, o que indica uma presença relativamente significativa de marcações Ag-NOR positivas, considerando que o único relato encontrado de marcação positiva na região organizadora de nucléolo foi de YONENAGA-YASSUDA *et al* (1992) em um exemplar proveniente do Estado de São Paulo. De acordo JONES e REES (1982) e SBALQUEIRO (1989), o cromossomo B não deve possuir genes estruturais, pois não alteram fenotipicamente os portadores, entretanto ROUSSEL *et al* 1994 coloca que, regiões marcadas positivamente com Ag-NOR, correspondem aos locais que estavam ativos precedendo a intérfase. Esta contradição entre os autores, pode ser devido a uma possível translocação envolvendo o cromossomo B, que então, passa a ser Ag-NOR positivo e possuir atividade pré-intérfase. Como somente dois indivíduos, de uma amostra de 18, apresentaram marcações positivas no cromossomo extranumerário a hipótese de uma translocação envolvendo o cromossomo B e um autossomo pode ser considerada.

Nos bandeamentos C, foi observado que alguns cromossomos extranumerários não eram completamente marcados, com o braço *p* com uma marcação muito tênue. Isso pode indicar a presença de eucromatina, o que evidenciaria uma provável atividade de transcrição gênica da região. Os indivíduos que apresentaram marcação Ag-NOR positiva para os cromossomos extranumerários também apresentaram marcação parcial de banda C nos mesmos. Os dois resultados mostram que, apesar de ainda desconhecida, o cromossomo B possui alguma atividade na célula, sendo que a atividade é provavelmente pré-intérfase (MILLER 1976).

Em *Euryoryzomys russatus* foram observados 35 pares de autossômicos acrocêntricos e 4 pares de metacêntricos (JUSTO, 2007), devido a captura de apenas um sexo, não se pode inferir a ausência de heteromorfismo sexual. Segundo BONVICINO *et al* (2008) *E. russatus* ocorre desde a região norte do Rio Grande do Sul, passando pela região litorânea de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia, ocorrendo também na região oeste de Minas Gerais, sendo que o exemplar aqui estudado, localiza-se na área de distribuição. Foram observadas uma média de seis marcações Ag-NOR em ERU, todas em cromossomos autossômicos.

A característica mais marcante a ser levada em consideração das regiões organizadora de nucléolo é o polimorfismo observado, que apesar de poder ser devido a eficiência da técnica de marcação (CHEUNG *et al*, 1989) muitas vezes se deve a diferença de atividade dos cromossomos durante a divisão celular e a presença de rDNA nos cromossomos (YONENAGA-YASSUDA *et al*, 1992).

Em *Oligoryzomys nigripes* foram observados 11 pares de cromossomos meta-submetacêntricos e 19 de acrocêntricos, não foi identificado heteromorfismo em nenhum par cromossômico, como descrito na literatura para os pares 2, 3 e par sexual (SBALQUEIRO, 1989). BONVICINO *et al* (2008) mostra que ONI ocorre desde o Sul do Estado de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Minas Gerais, verificando que nossa amostra ocorre nos limites desta distribuição geográfica.

6. CONCLUSÃO

A análise citogenética, através da aplicação de diferentes técnicas de Coloração comum e bandamentos C, G e Ag-NOR -, em uma amostra de 18 exemplares de roedores cricetídeos coletados no Parque Acaraí, revelou o seguinte:

1 – A importância da aplicabilidade da citogenética, como uma ferramenta auxiliar, na identificação taxonômica dos exemplares coletados, em especial na caracterização das espécies *Akodon montensis* e *Oligoryzomys nigripes*;

2 – Existência significativamente marcante de *Akodon montensis* (83,33%), em relação às demais espécies capturadas, *Oligoryzomys nigripes* e *Euryoryzomys russatus* e confirmação da distribuição geográfica destas espécies para o Estado de Santa Catarina;

3- Em bandeamento C os cromossomos Bs (sub-metacêntrico tipo I e sub-metacêntrico tipo II) mostraram marcação tênue nos braços curtos, local de ocorrência simultânea à banda Ag-NOR, podendo revelar ocorrência de regiões eucromáticas nestes cromossomos;

4- Necessidade de estudos mais específicos envolvendo os cromossomos B, tanto com aplicação de técnicas de hibridação *in situ* quanto com sondagem de sequência de bases das regiões de marcação de Ag-NOR.

7. REFERENCIAS

- ARNASON, U.** *The role of chromosomal rearrangement in mammalian speciation with special reference to Cetacea and Pinnipedia.* Hereditas, 70, p. 113-118, 1972.
- ARNASON, U.; BENIRSCHKE, K.** *Karyotypes and idiograms of sperm and pygmy sperm whales.* Hereditas, 75, 67-74, 1973.
- ARNOLD N. et al.** *Identification of complex chromosome rearrangements in the gibbon by FISH of a human chromosome 2q microlibrary, yeast artificial chromosomes and reciprocal chromosome painting.* Cytogenet Cell Genet, 74, 80–85, 1996.
- BAKER, R.J.; PATTON, J.L.** *Karyotype and karyotypic variations of North American Vespertilionidae bats.* J. Mamm., 48, 270-283, 1967.
- BALIEIRO, P.** *Diversidade de cariótipo de pequenos mamíferos não-voadores do Parque Estadual do Acaraí, São Francisco do Sul, SC.* Tese de monografia, UNIVILLE. 2012.
- BIANCHI, N.O.; CAMELO, J.S.L.; OLIVEIRO, O.A.; LOPRETTO, E.C.** *Karyological conservatism in South American camelids.* Experientia. 42, 622-624. 1986.
- BONVICINO, C., R.; LINDBERGH, S., M.; MAROJA, L., S.** *Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic Forest and Cerrado: comments on their potencial use for monitoring environment.* Braz. J. Biol. [online]. 62, 765-774. 2002.
- BUNCH, T.D.** *Chromosome banding patterns homologies and NORs for the Bactrian camel, guanaco, and llama.* J. Hered., 76, 115-118, 1985.
- CARLETON, M.D. & MUSSER, G.G.** Order Rodentia. In: Wilson, Don E. and Reeder, D. M., *Mammal Species of the World, Third Edition.* The Johns Hopkins University Press, pp.745-752, 2005
- CASPERSSON, T.** et al. *Chemical differentiation along metaphase chromosomes.* Exptl. Cell Res., 49, 219-222, 1968.
- CASTRO, E. C.** *Ocorrência e caracterização cromossômica de roedores Akodontinos no Rio Grande do Sul.* Tese de Mestrado, UFRS. 1989
- CHEUNG, S.W.; SUN, L.; FETHEATHERSTONE, T.** *Visualization of NORs in relation to the precise chromosomal localization of ribosomal RNA genes.* Cytogenetics. P93-97. 1989.

CONTRERAS, L.C.; TORRES-MURA, J.C.; SPOTORNO, A.E. *The largest known chromosome number for a mammal, in a South American desert rodent.* *Experientia*, 46, 506-508, 1990.

COSTA, L. P.; LEITE, Y.L.R; MENDES, S. L.; DITCHFIELD, A. D. *Mammal conservation in Brazil*, *Conservation Biology* 19(3): 672-679. 2005

D'ELIA E PARDIÑAS et al. *Definition and diagnosis of a new tribe of Sigmodontine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae) and a revised classification of the subfamily*, 2007

DE OLIVEIRA, E. H. C. *Filogeneia da subfamília Atelidae (Primates, Platyrrhini): Análise comparativa por pintura cromossômica.* Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2001.

DE OLIVEIRA, et al. *The phylogeny of howler monkeys (Alouatta, Platyrrhini): Reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting.* *Chromosome Research*, 10, 669-683, 2002.

DE OLIVEIRA et al. *Phylogenetic inferences of Atelinae (Platyrrhini) based on multidirectional chromosome painting in Brachyteles arachnoides, Ateles paniscus paniscus and Ateles b. marginatus.* *Cytogenetic Genome Res.*, 108, 183-190, 2005a.

DE OLIVEIRA et al. *Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotype of the world's largest (Harpy eagle, Harpia harpyja) compared to that of the chicken (Gallus gallus).* *Chromosoma*, 14, 338-343, 2005b.

DUTRILLAUX, B. *Nouveau système de marquage chromosomique: les bandes T.* *Chromosoma*, 41, 395-402, 1973.

DUTRILLAUX, B.; LEJEUNE, J. *Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain.* *C. R. Acad. Sci.*, 272, 2638-2640, 1971.

FAGUNDES, V.; CHRISTOFF, A. U.; YONENAGA-YASUDA, Y. *Extraordinary chromosomal polymorphism with 28 different karyotypes in the neotropical species Akodon cursor (Muridae, Sigmodontinae), one of the smallest diploid number in rodents (2n = 16, 15 and 14).* *Hereditas*. V. 129, p. 263-274, 1998a.

FAGUNDES, V.; YONENAGA-YASSUDA, Y. *Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents Bolomys and Akodon (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion.* *Chromosome Research*, 6, 643-648, 1998b.

FORD, C., E.; HAMERTON, J.L. *A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosome.* Stain. Tech., 31, 247-251, 1956.

GOUREAU, A.; YERLE, M.; SCHMITZ, A. et al. *Human and porcine correspondence of chromosome segments using bidirectional chromosome painting.* Genomics, 36, 252-262, 1996.

HASS, I. *Polimorfismos anônimo de DNA em seis espécies de Akodon (Rodentia:Muridae) da região Sul do Brasil.* Dissertação de mestrado. 2001, UFPR.

HASS, I. *Análise filogenética por pintura cromossômica multicolor, em roedores de tribo Akodontini, (Rodentia, Cricetidae) ocorrentes na região sul do Brasil.* Tese de Doutorado, UFPR, 2006.

HASS, I.; SBALQUEIRO, I.J.; MÜLLER, S. *Chromosomal phylogeny of four Akodontini species (Rodentia, Cricetidae) from Southern Brazil established by Zoo-FISH using Musmusculus (Muridae) painting probes.* Chromos. Res., 16:75-88, 2008.

HASS, I.; MULLER, S.; SBALQUEIRO, I. J. *Comparative chromosomemaps of Neotropical rodents Necromys lasiurus and Thaptomys nigrita (Cricetidae) established by Zoo-FISH.* Cytogenet. Genome Res., 135,42-50, 2011

HAYES, H. *Chromosome painting with human chromosome-specific DNA libraries reveals the extend and distribution of conserved segments in bovine chromosomes.* Cytogenet. Cell Genet., 71,168-174, 1995.

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

JACKSON, R. C. *The karyotype in systematics.* Ann. Rev. Ecol. System., 1, 327-368, 1970.

JUSTO, C. M. S. *Caracterização citogenética de exemplares de Oryzomys russatus (Rodentia, Cricetidae) ocorrentes no Paraná.* Trabalho de Monografia, UFPR. 2007

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. *Quantas espécies há no Brasil?.* Megadiversidade, São Paulo, 2005

LIETCHTY, M.C. et al. *Mouse chromosome-specific painting probes generated from microdissected chromosomes.* MammalGenome, 6, 592-594, 1995.

MATSUI, S.I.; SASAKI, M. *Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes.* Nature, 246,148-150, 1973.

MILLER, O. J.; MILLER, D. A.; DEV., .V.G; TANTRAVAH, R.; CROCE, C. L. *Expression of human and suppression of mouse nucleolus organ izer activity in mouse-human somatic cell hybrids.* Proct. Nat. Acad. Sci. USA. 1976

MITTERMEIER, R. A. et al. *Hotspots revisited.* CEMEX, Mexico City, 2004.

MÜLLER, S. et al. *A novel source of highly specific chromosome painting probes derived from primate chromosomes for human karyotype analysis.* Hum Genet, v. 101, p. 149-153, 1997.

RABELO, G. P. *O gênero Akodon (Rodentia:Cricetidae)-Principais mecanismos responsáveis pela variabilidade cariotípica e sua possível implicação na distribuição das espécies ocorrentes no estado do Paraná.* Monografia, UFPR. 2007

PAGLIA, A.P., et al. *Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals.* 2ª Edição / 2nd Edition. Occasional Papers in Conservation Biology, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. 76pp. 2012.

PARESQUE, R.; SOUZA, W. P.; MENDES, S. L.; FAGUNDES, V. *Composição cariotípica da fauna de roedores e marsupiais de duas áreas de Mata Atlântica do Espírito Santo, Brasil.* Bol. Mus. Biol., 2004.

REIG, O. A.; *Teoria del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de América del Sur.* Mus. Mun. Cienc. Nat. "Lorenzo Scaglia", (1) : 1-161, 1971.

ROMANENKO, S. A.; PERELMAN, P. L.; TRIFONOV, V. A.; GRAPHODATSKY, A. S. *Chromosomal evolution in Rodentia.* Heredity, 4-16, 2011

ROUSSEL, P; HERMANDEZ-VERDUN, D. *Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity.* Experimental Cell Research, 1994.

SAVAGE, R.J.G.; LONG, M.R. *Mammal Evolution.* British Museum (Natural History). Cromwell Road, London, 259p., cap.9, p. 113-129.1986

SBALQUEIRO, I.J. *Análises cromossômicas e filogenéticas em algumas espécies de roedores do sul do Brasil.* Tese de doutorado, UFRS, 1989.

SEABRIGHT, M., *A rapid technique for human chromosomes*. Lancet., 2 : 972 – 2. 1971

SEABRIGHT, M., *The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man*. Chromosoma, 36 : 204 – 10. 1972.

SILVA, M. J. & YONENAGA-YASSUDA, Y. *Karyotype and chromosomal polymorphism of undescribed Akodon from Central Brazil, a species with the lowest known diploid chromosome number in rodents*. Cytogenet. Cell Genet., 81: 46-50, 1998.

SMITH, M.A. *Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four Akodon species (Rodentia; Cricetidae) resolved by reciprocal chromosome painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents*. Chromosome Research, 17:1063-1078. 2009.

SOS Mata Atlântica. *Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2008-2010*. São Paulo. 2011.

SUMNER, A., T., *A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin*. Exp. Cell Res, 75: 304 – 6. 1972.

TESTONI, A. F. *Análise citogenética de Rodentia e Didelphimorphia no Parque Natural Municipal Nascentes do Garcia, Blumenau-SC*. Monografia Universidade Regional de Blumenau, 2006.

VELOSO, H., P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. *Classificação vegetal Brasileira, adaptada a um sistema universal*. IBGE, Rio de Janeiro, 1991.

VENTURA, K.; O'BRIEN, P. C. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; FERGUSON-SMITH, M. A. *Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four Akodon species (Rodentia, Cricetidae) resolved by reciprocal chromosome painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents*. Chromosome Research, 2009.

VENTURA, K. *Estudos de citogenética e de filogenia molecular em roedores da tribo Akodontini*. Tese de Doutorado, USP. São Paulo, 2009.

VENTURA, K.; O'BRIEN, P.C.M.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; FERGUSON-TAYLOR, K., M. et al. *Uniformity of karyotypes in the Camelidae*. Cytogenetics. 7 : 8 - 15. 1968.

VERA y CONDE, C.F. & ROCHA, C.F.D. *Habitat disturbance and small mammal richness and diversity in an Atlantic rainforest area in southeastern Brazil* .Braz. J. Biol. 66(4):983-990. 2006.

WESKLER, M.; PERCEQUILO, A.R; VOSS, R.S. *Ten new genera of oryzomyinae Rodents (Cricetidae: Sigmodontinae)*. American Museum of Natural History 3537: 1-29. 2006

WIENBERG J.; STANYON R.; NASH W.G. et al. *Conservation of human vs. feline genome organization revealed by reciprocal chromosome painting*. Cytogenet Cell Genet., 77, 211-217, 1997.

WIENBERG J.; STANYON R. *Comparative chromosome painting of primate genomes*. ILAR Journal, 39, 77-91, 1998.

YONENAGA-YASSUDA, Y.; ASSIS, M. F. L.; KASAHARA, S.; L'ABBATE, M.; SOUZA, M. J. *Nucleolar organizer regions in Akodon arviculoides (Cricetidae, Rodentia): evidence of the activity of rDNA genes in both X chromosome*. Cytogenetics Cell Genetics 143-147. 1983.

YONENAGA-YASSUDA, Y.; ASSIS, M. F. L.; KASAHARA, S. *Variability of nucleolus organizer regions and the presence of the rDNA gene in the supernumerary chromosome of Akodon aff. Arviculoides (Cricetidae, Rodentia)*. Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics. P163-174. 1992

ZANCHIN, N. et al. *Karyotype and species diversity of the genus Delomys (Rodentia, Cricetidae) in Brazil*. ActaTheriologica, 37, 163-169, 1992.