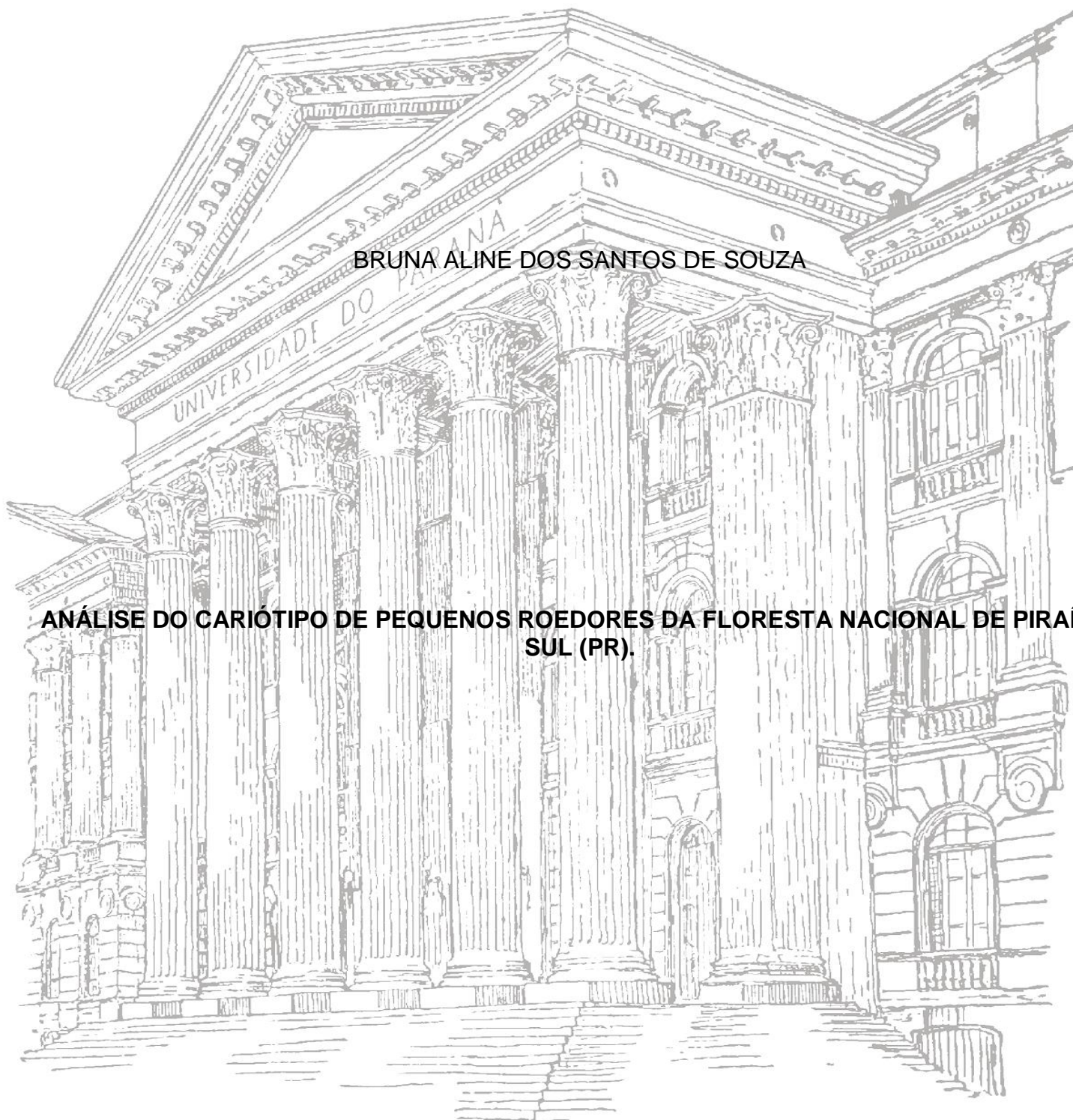


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA ALINE DOS SANTOS DE SOUZA

**ANÁLISE DO CARIÓTIPO DE PEQUENOS ROEDORES DA FLORESTA NACIONAL DE PIRAÍ DO SUL (PR).**



CURITIBA

2016

BRUNA ALINE DOS SANTOS DE SOUZA

**ANÁLISE DO CARIÓTIPO DE PEQUENOS ROEDORES DA FLORESTA  
NACIONAL DE PIRAÍ DO SUL (PR)**

Monografia apresentada como requisito parcial à  
conclusão do Curso de Ciências Biológicas-  
Bacharelado, Setor de Ciências biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iris Hass\*  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Liliani Tiepolo\*\*

\*Departamento de Genética, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

\*\* Setor Litoral, Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

2016

## **AGRADECIMENTOS**

Esse trabalho não foi desenvolvido por uma única pessoa, por isso venho agradecer a todos que ajudaram a construção desta monografia...

Primeiramente agradeço o apoio da minha família e amigos que estiveram presentes ao meu lado em toda a minha trajetória.

Agradeço pela oportunidade singular dada pela minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Iris Hass, de atuar no laboratório de Citogenética e Genética da Conservação Animal e por ter aceitado orientar e a Prof<sup>a</sup> e Dr<sup>a</sup> Liliani Tiepolo por aceitar prontamente a coorientação do presente trabalho.

Ao pessoal do laboratório pelo apoio e conversas, em especial a Amanda de Araújo Soares pelas incansáveis horas de apoio para a concretização do trabalho.

Quero agradecer a todos os meus amigos da graduação, Luzianna Celeste Schuindt por ter me acompanhado em todos esses anos de graduação, tanto nas horas boas quanto nas horas ruins, amiga obrigada por estar sempre presente.

Agradeço também a Paloma, Viviana, Alice, Raul pelo incentivo e acreditarem que todos somos capazes de mudar uma porção desse mundo.

As minhas amigas Tatiane, Dania, Talita e Viviany pelo apoio incondicional nos momentos difíceis.

*“As vontades fracas traduzem-se em discursos;  
as vontades fortes em ações”*

*Gustave Le Bon*

## RESUMO

Os roedores pertencem à Ordem Rodentia, representam o maior número de espécies, cerca de 40% da biodiversidade mundial dos mamíferos, dispõe de uma alta plasticidade genética e morfológica, características que podem influenciar respostas à pressão de seleção de diferentes ambientes, permitindo o sucesso evolutivo deste grupo. Por meio da Citotaxonomia (taxonomia com auxílio da Citogenética), foram identificadas, neste trabalho, espécies de roedores pequeno, coletados na Floresta Nacional de Piraí do Sul, localizada na região centro-leste do Estado do Paraná, unidade de conservação com aproximadamente 153 hectares. O projeto foi realizado em parceria com professores e alunos do Programa de Pós-Graduação em Zoologia da UFPR. No Laboratório de Citogenética e Genética da Conservação Animal (CGC Animal - UFPR), foram realizadas as análises do material coletado e processado em campo. O objetivo do trabalho foi caracterizar citogeneticamente os exemplares utilizando análise e técnicas citogenéticas de coloração comum (Giemsa), bandamento G e NOR e verificar se há correspondência numérica e morfológica dos cromossomos com o descrito na literatura. Esses materiais foram fixados em solução ácido-alcoólica e preparados em lâminas de microscopia para serem corados convencionalmente ou bandeados. Alguns pontos com metáfases, normalmente três de cada dez metáfases mascadas por lâmina analisada, foram documentados através da captura de imagem e cariotipados em um programa de análise cromossômica. As espécies encontradas citotaxonomicamente foram *Nectomys squamipes* com  $2n=56$  com  $NA=54$ , *Thaptomys nigrita* com  $2n=52$  com  $NA=52$ , *Oligoryzomys nigripes* com  $2n=62$  com  $NA=82$ , *Brucepattersonius iheringi* com  $2n=52$  com  $NA= 50$  e  $51$  e *Akodon montensis* com  $2n=24$  e  $25$  com  $NA=40$  e  $NA=42$  respectivamente, devido à presença de cromossomos extranumerários. Foi realizado o bandamento de Regiões Organizadoras de Nucléolo (a sigla NOR, em inglês) com Nitrato de Prata, para o gênero *Brucepattersonius*, evidenciando uma marcação NOR-Ag no par cromossômico 20.

Palavras chaves: Floresta de Piraí do Sul, Rodentia, Citogenética.

## ABSTRACT

Rodents belong to the *Rodentia* order, that represent the largest number of the species, over 40% of mammal world biodiversity, it possess a high genetic and morphologic plasticity and these attributes reflects on the response of selection pressure from different environments, allowing the success of it's group's evolution. Through Cytotaxonomy (taxonomy assisted by Citogenetics), were identified, in this paper, species small rodents, collected in the Piraí do Sul State Forest, located in the eastern central of Paraná State, this preservation unit is 153 hectares. This research was performed with the cooperation of the UFPR zootechny Professors and Post-Graduation. In the Animal Preservation Cytogenetic and Genetic Laboratory, the analyzes of the material collected and processed in the field were carried out. The purpose of this study is to typify cytogenetically the specimens using common coloration cytogenetic analysis and techniques (Giemsa), layering C, layering G and NOR and to verify if there is numeric and morphologic conformity of the chromosomes with the ones found in published research papers. These samples were laid in na acid-alcoholic solution and exposed in microscopy blades to be conventionally stained or layred. Some points with metaphases, usually three out of ten chewed metaphases per slide analyzed, were documented through images captured and karyotyped in a chromosomal programme analysis. The cytotaxonomical species found were, *Nectomys squamipes* with  $2n=56$  with  $NA=54$ , *Thaptomys nigrita* with  $2n=52$  with  $NA=52$ , *Oligoryzomys nigripes* with  $2n=62$  with  $NA= 82$ , *Brucepattersonius iheringi* with  $2n=52$  with  $NA= 50$  and  $51$ , *Akodon montensis* with  $2n=24$  and  $25$  and with  $NA=40$  and  $NA=42$  respectively, due to the presence of extranumeric chromosomes. It was done layering in Nucleolus Organizer Regions (NOR) with Silver Nitrate, to the genus *Brucepattersonius*, emphasizing a NOR-Ag mark in chromosome pair 20.

Keywords: Piraí do Sul State Forest, Cytogenetics, Rodentia.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO	9
2.1	MATA ATLÂNTICA	9
2.2	ORDEM RODENTIA	10
2.3	CITOGENÉTICA DE ROEDORES	12
3	OBJETIVOS	13
3.1	Objetivos Gerais	13
3.2	Objetivos Específicos	13
4	JUSTIFICATIVA	13
5	MATERIAIS E MÉTODOS	14
5.1	ÁREA DE ESTUDO	14
5.2	AMOSTRAGEM	14
5.3	MÉTODOS CITOGENÉTICOS	14
5.3.1	Bandamento G	15
5.3.2	Bandamento C	16
5.3.3	Ag-NOR	16
5.4	ANÁLISE DE LÂMINAS	17
5.5	DIGITALIZAÇÃO DE IMAGENS E MONTAGEM DOS CARIÓTIPOS	17
6	RESULTADOS	17
6.1	<i>Akodon montensis</i>	18
6.2	<i>Brucepattersonius iheringi</i>	20
6.3	<i>Nectomys squamipes</i>	22
6.4	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	23
6.5	<i>Thaptomys nigrita</i>	23
7	Discussão	25
8	Conclusão	27
9	REFERÊNCIAS	29

## 1 INTRODUÇÃO

Os roedores compõem um grupo antigo surgindo no Paleoceno da América do Norte e Ásia há cerca de 56 milhões de anos (VAUGHAN *et al*,2000).A ordem Rodentia possui cerca de 2277 espécies distribuídas em mais de 30 famílias, o que corresponde a pouco mais de 40% das espécies atuais de mamíferos, sendo que mais de 400 delas ocorrem na América do Sul. No Brasil ocorrem 75 gêneros e 243 espécies que apresentam grande diversidade em sua morfologia, comportamento, modo de vida e distribuição (ARRIEIRA, 2013).

Os roedores são bem adaptados, sendo encontrados em praticamente quase todos os tipos de ambiente, desde climas quentes e desérticos até chegando ao limite do ambiente frio da Tundra, porém não há registros de roedores na região do continente Antártico. (SOUSA *et al.*, 2004)

Os exemplares da Ordem Rodentia possuem uma serie de adaptações específicas (COGHETTO, 2014) que podem convergir para morfologias semelhantes, o que dificulta em alguns casos, a sua identificação específica. Devido a ampla distribuição, os roedores exercem uma função importante nos ecossistemas podendo ser bons indicadores de qualidade ambiental (GRAZZINI,2014).

A Citogenética é considerada a interface entre a Genética e a Biologia Celular, onde se estuda os cromossomos e suas morfologias, organizações, replicações, variações ou evoluções. Unindo a Citogenética à Taxonomia surge a Citotaxonomia (GUERRA, 1988), que foi utilizada neste trabalho para identificar espécies de pequenos roedores (Família Cricetidae, Subfamília Sigmodontinae), muito semelhantes morfologicamente, da Floresta Nacional de Piraí do Sul, centro-leste do Paraná, com a finalidade de realizar um levantamento faunístico da região (GRAZZINI, 2014), possibilitando sua futura conservação.

## 2 REVISÃO

### 2.1 MATA ATLÂNTICA

O Brasil é um país com proporções continentais abrangendo seis biomas e uma grande diversidade de espécies. Além disso, dois dos 34 *hotspots* mundiais, áreas prioritárias para a conservação devido a sua biodiversidade, estão localizados no Brasil, sendo eles: o Cerrado e a Mata Atlântica (MMA, 2010).

Originalmente, a Mata Atlântica representava 1,3 milhões de Km<sup>2</sup>, atualmente restam apenas 8,5% da cobertura original contínua, somando os fragmentos temos 12,5% de Mata Atlântica remanescente em todo o litoral brasileiro, do Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul. A composição original da Mata Atlântica é um mosaico de vegetações definidas como Florestas Ombrófilas Densa, aberta e mista; florestas estacionais decidual e semidecidual; campos de altitude, mangues e restingas e outros ecossistemas associados, que juntos, compõem a heterogeneidade e contribuem para a sua mega diversidade. (SOS MATA ATLÂNTICA, 2012).

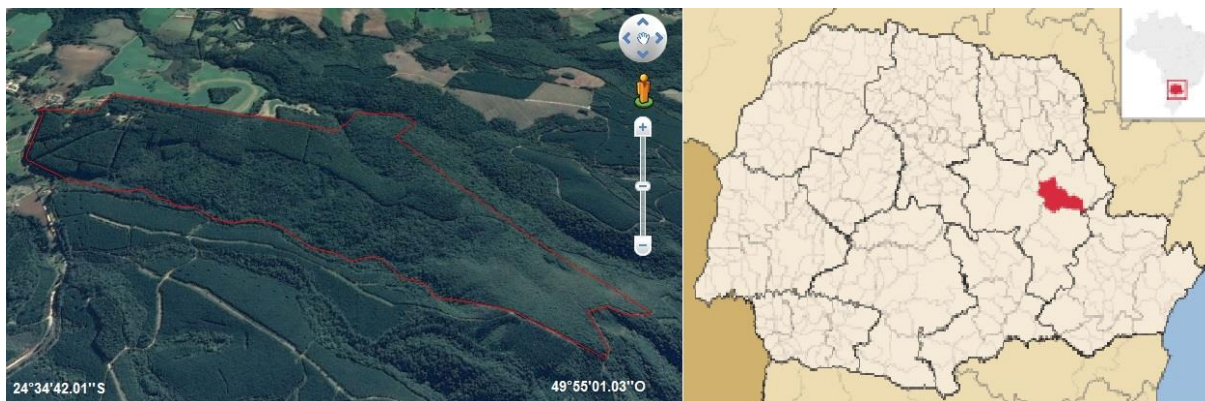
Na região de Mata Atlântica há cerca de 145 milhões de habitantes, equivalentes a aproximadamente 72% da população brasileira (IBGE, 2014) convivendo com um dos biomas mais ameaçado do planeta. As influências antropológicas evidenciam a extrema necessidade de ações de conservação e manejo para manter a riqueza do local. Para que ações de manejo e conservação sejam possíveis e efetivas, é importante que sejam feitos esforços para produzir materiais descritivos dos animais pertencentes à mata.

Em relação a roedores, a Mata Atlântica é a mais rica em espécies, só a ordem Rodentia representa 35% dos endemismos observados para mamíferos nesse bioma (PAGLIA *et al.*, 2012).

Nesse contexto a Floresta Nacional de Pirai do Sul (FIGURA 1) é classificada como Floresta Ombrófila Mista, com presença de *Araucaria angustifolia*, mas também com regiões caracterizadas pelo bioma Cerrado, a floresta está presente na divisa entre o primeiro e o segundo planalto paranaense, com altitudes um pouco acima dos 1.100 m acima o nível do mar. Apresenta relevo suavemente ondulado, com pequena elevação na parte sudeste, onde se encontram nascentes que dão

origem aos cursos d'água que percorrem a unidade. É uma floresta isolada rodeada por plantações variáveis durante o ano, portanto próxima a ocupação humana e a áreas onde a vegetação original foi substituída por monocultura.

FIGURA 1 – MAPA DOS LIMITES DA FLORESTA NACIONAL DE PIRAÍ DO SUL E A MARCAÇÃO DO MUNICÍPIO NO ESTADO DO PARANÁ



Localização da Floresta Nacional de Pirai do Sul à direita, limites do município de Pirai do Sul.

FONTE: Google Earth

## 2.2 ORDEM RODENTIA

Os roedores pertencem à Ordem Rodentia representam o maior número de espécies mundiais, no Brasil há 243 espécies em 75 gêneros de roedores (BONVICINO, 2008), organizados na família Cricetidae na subfamília denominada Sigmodontinae contendo 131 espécies (CARLETON e MUSSER, 2005; PAGLIA *et al.*, 2012) estão os roedores estudados nesse trabalho.

Suas adaptações estão presentes no hábito alimentar, por tanto, há espécies insetívoras, herbívora, piscívoras, carnívoras ou onívoras. (ANTUNES *et al.*, 2009). A literatura propõe de utilização dos roedores como bioindicadores de condições ambientais (BONVICINO *et al.*, 2002 a), os animais são separados em dois grupos: espécies sensíveis, que não ocorrem em ambientes modificados como; *Oxymycterus*, *Oryzomys*, *Brucepattersonius*, e as resistentes, que ocorrem em ambientes modificados; *Akodon*, *Oligoryzomys negripes*, *Nectomys* e *Thaptomys*. Os representantes do primeiro grupo podem demonstrar o grau de alteração em que se encontra seu *habitat*, através do comportamento ou desaparecimento do ambiente. Esta forma de monitoramento ambiental, com estudo de animais, é necessária para o planejamento de ações de conservação e restauração de áreas que precisam ser

vistas como prioritárias nas políticas de manejo e conservação dos governos (BONVICINO *et al.*, 2002 a).

Os roedores do gênero *Akodon* tem grande ocorrência na região da baixada litorânea e no planalto de Curitiba, no Brasil são encontradas dez espécies geralmente com sobreposição no local de distribuição, havendo inclusive registro de simpatria (FAGUNDES *et al.* 1998, GEISE *et al.* 1998), sendo a especiação simpátrica a divergência genética de várias populações a partir uma única espécie parental, que habita a mesma região geográfica, de modo a que essas populações se tornam espécies diferentes. Essa especiação apresenta uma gama de diversos cariótipos que podem ter tido origem de um indivíduo (SANTOS, 2004)

O gênero *Akodon* é caracterizado por possuir o comprimento da cauda é igual ao comprimento do corpo. Possuem os aspectos de ratos e de alimentação onívora. Podem viver em ambientes terrestres ou galerícolas. O pelo possui uma coloração que pode variar desde verde-oliváceo, passando pelo marrom-avermelhado, chegando até ao cinza. Uma característica marcante desse gênero é um pequeno par de cromossomos metacêntricos (BONVICINO, 2002 b).

*Brucepattersonius* segundo GRAZZINI (2014) tem ocorrência em várias fitofisionomias presentes na Floresta Nacional de Piraí do Sul sugere que a espécie pode não ser muito seletiva quanto à escolha de seu habitat, o melhor método de captura foi por armadilhas de queda o que vai de encontro com seu hábito terrícola. Morfologicamente apresenta pequenos olhos e orelhas grandes, corpo pequeno e focinho alongado, e sua alimentação consiste quase exclusivamente de insetos. A coloração do dorso é geralmente marrom escuro, a lateral do corpo é pálida e o ventre pode ser de cinza, mas podendo variar do ocre ao alaranjado (BONVICINO, 2008).

O gênero *Oligoryzomys nigripes* é o segundo mais abundante na FLONA de Piraí do Sul, juntamente com *Akodon montenses* e *Thaptomys nigrita* representam 75% da fauna de roedores, segundo GRAZZINI (2014). É considerada uma espécie altamente generalista, pois geralmente é encontrada em abundância em locais alterados como plantações, fragmentos, e áreas em estágio inicial de sucessão. Apresenta tamanho corporal pequeno, comprimento da cauda maior que o corpo, coloração do dorso variando de castanho avermelhado a amarelada, com laterais

mais claras, olhos grandes, patas longas e finas cobertas com pequenos pelos claros (BONVICINO, 2008).

*Nectomys squamipes* apresenta hábitos aquáticos, em relação à sensibilidade da espécie, geralmente não é utilizado como parâmetro de qualidade ambiental, pois sua presença/ausência está fortemente ligada à presença ou não de cursos d'água (GATTO-ALMEIDA, 2015). Possui o comprimento da cauda maior que a do corpo, pelagem do dorso castanha escura, ventre esbranquiçado, orelhas finamente revestidas com pelos (BONVICINO, 2008).

A espécie *Thaptomys nigrita* é comumente capturada em florestas maduras e bem preservadas e muito comum e em Florestas Ombrófilas Mistas (GRAZZINI, 2014). Possui o comprimento da calda medindo aproximadamente a metade do comprimento do corpo, seus olhos e orelhas também são pequenos. Apresentam hábito diurno. São agressivos e encontrados em troncos, raízes de árvores e às vezes em túneis feitos sob folhas ou terra fofa (BONVICINO, 2008).

### 2.3 CITOGENÉTICA DE ROEDORES

A citogenética de vertebrados teve início com os trabalhos de FORD e HAMERTON (1956), outros trabalhos originaram os bandamentos que auxiliam no estudo evolutivo dos cromossomos, bandas G (SEABRIGHT, 1972); bandas C (SUMNER, 1972) e bandas Ag-NOR (HOWELL e BLACK, 1980).

A variabilidade cromossômica dos roedores gera uma grande plasticidade genética. Na ordem Rodentia, o número de cromossomos pode variar de 10 em *Akodon* sp (SILVA e YONENAGA-YASSUDA, 1998) a *Tympanoctomys barrerae* com 102 de número cromossômico (CONTRERAS *et. al.*, 1990)

Segundo GATTO-ALMEIDA, 2015, a riqueza juntamente com a sensibilidade as variações ambientais, fazem deste grupo de roedores um interessante alvo de estudos, tanto para obter um maior conhecimento da fauna, quanto para se utilizar do grupo como uma ferramenta de monitoramento da qualidade ambiental e auxiliar na conservação desses indivíduos.

Neste contexto, foram identificadas citotaxonomicamente as espécies de roedores da Floresta Nacional de Piraí do Sul para reunir informações ecológicas das espécies residentes do local.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Análise do cariótipo de alguns roedores da Floresta Nacional de Piraí do Sul (PR).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Descrever os cariótipos encontrados através de coloração comum e estabelecendo seus padrões de bandamentos: C, G e Ag-NOR
- Auxiliar na elaboração de uma lista de espécies ocorrentes na Floresta de Piraí do Sul.
- Analisar os cariótipos das espécies encontradas na região do presente estudo, e compará-las às descritas na literatura.

### **4 JUSTIFICATIVA**

O laboratório de Citogenética e Genética da Conservação Animal vêm realizando trabalhos para identificar roedores de toda costa e da região do primeiro e segundo planalto paranaense, com o objetivo de obter bases teóricas para a conservação das espécies endêmicas em nossas unidades de conservação, a sugestão segundo BONVICINO *et al.*, (2002 a) que roedores podem ser utilizados como sinalizadores no monitoramento ambiental.

A citogenética clássica possibilita a visualização do cariótipo para caracterização do número diplóide e algumas auxiliam nas análises dos cromossomos que apresentem alterações cromossômicas.

Com a dissertação de mestrado de GRAZZINI (2014), identificação de pequenos roedores da Floresta Nacional de Piraí do Sul, os estudos aprofundados em citogenética clássica são importantes para comparação e atualização da literatura, assim justificando o presente estudo.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ÁREA DE ESTUDO

A Floresta Nacional de Piraí do Sul, Unidade de Conservação (UC) de uso sustentável, esta localizada a 6 Km da sede municipal de Piraí do Sul e 190 Km de Curitiba. Encontra-se situada nos domínios da Floresta Ombrófila Mista, entre o primeiro e o segundo planalto paranaense.

A UC possui uma área aproximadamente de 153 há, dos quais 7,2 ha se constituem em reflorestamento de araucária e imbuia, 39 ha *Pinus*, cerca de 93 ha, representados por formações nativas de Floresta com Araucária em diferentes estádios sucessionais. O clima predominante é subtropical temperado mesotérmico (Cfb) segunda a classificação de Köppen-Geiger, com verões moderadamente quentes e invernos com geadas (KOTTEK *et al.* 2009).

### 5.2 AMOSTRAGEM

Foram instaladas três linhas de quatro baldes de 60 litros (55 cm de altura por 41 cm de diâmetro) conectados por lona preta de cerca de 40 m de comprimento. Adicionalmente foram instaladas três linhas de seis armadilhas do tipo *Shermane Tomahawk*, distante cerca de 5 m umas das outras, e iscas com uma massa feita com banana, sardinha, bacon, aveia, pasta de amendoim e farinha de milho. Cada linha tinha cerca de 25 m de comprimento e estava distante cerca de 30 m uma da outra. As armadilhas foram dispostas prioritariamente no chão, porém eventualmente dispostas em árvores a cerca de 1,5 m de altura. O total de armadilhas instaladas foi de 60. Foi realizado um esforço amostral total de 5892 armadilhas/noite, resultando em 1049 capturas (capturabilidade = 17.8%) de 801 espécimes, conforme descrito por GRAZZINI (2014).

### 5.3 MÉTODOS CITOGENÉTICOS

Para obtenção de metáfases mitóticas foi utilizada a preparação citológica direta de medula óssea descrita por FORD E HAMERTON (1956) e modificada por SBALQUEIRO (1989).

O método consiste em injetar na região do peritônio 1ml de solução de colchicina a 0,1% para cada 100g de peso do animal, a solução de colchicina tem por objetivo cessar a ação da microtubulina assim não formando as fibras do fuso mitótico e não ocorrerá a disjunção das cromátides irmãs preservando o cromossomo metafásico. Após 1 hora o animal foi eutanasiado (sacrificado) e o material da medula óssea dos fêmures foram retirado e transferido diretamente à solução hipotônica (KCl, 0,075M) e após 15 minutos a 37° C submetido à fixação ácido-alcoólica (3 metanol: 1 ácido acético).

Posteriormente o material foi fixado por mais três vezes, posteriormente será ressuspenso e pingado em uma lâmina, previamente lavada e aquecida em banho Maria. Essa lâmina com o material, então, foi submetida à coloração convencional em uma solução 5% de Giemsa, por 8 minutos. Outras lâminas também foram montadas para aplicações das demais técnicas de colorações – os bandamentos cromossômicos.

Os procedimentos citogenéticos de análise foram realizados no Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal do Paraná.

### 5.3.1 Bandamento G

O bandamento G evidencia bandas claras e escuras nos cromossomos, utilizando tripsina e Giemsa, permitindo o correto pareamento deles. A técnica de banda G foi empregada conforme SEABRIGHT (1972), modificada em SBALQUEIRO (1989):

Preparar as lâminas e envelhecer por 3-4 dias em estufa a 40°C.

Incubar as lâminas em tampão fosfato 2% em 49 ml mais 1 ml de EDTA por 3”.

Incubar as lâminas em álcool 70% 10”

Incubar em solução de SSC dissolvida em água destilada a 60°C por 10”.

Esses tempos podem ser aumentados ou diminuídos conforme os resultados obtidos.

Corar com Giemsa (tamponado em pH 6,8) a 2,5% por 5 minutos.

Lavar em água filtrada, esperar secar e observar ao microscópio.

### 5.3.2 Bandamento C

Essa técnica de bandeamento permite a visualização de regiões de heterocromatina constitutiva, usando para isso o hidróxido de bário e Giemsa. Seguindo o protocolo descrito em SUMNER (1972), modificada em SBALQUEIRO (1989):

A lâmina pode ser preparada no dia ou envelhecida por três 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.

### 5.3.3 Ag-NOR

A banda NOR evidencia a região organizadora de nucléolos com impregnação de prata. Seguindo o protocolo descrito em HOWELL e BLACK (1980), modificada em SBALQUEIRO (1989):

Envelhecer as lâminas de 4-5 dias na estufa a 40°C

Colocar 2 gotas de solução coloidal para 4 de solução de prata

Misturar na lamina, adicionar lamínula, levar a câmara escura de 8- 10°C observar a cor.

Solução coloidal 5%.

Diluir 0,25 de gelatina incolor em 5ml de agua mili-Q

Adicionar 0,2 ml de ácido fórmico, banho maria para derretar a gelatina

Solução de Prata 50%

1g de nitrato de prata da merck para 2ml de agua mili-Q, 1 gota de formalina 3% para cada 1 ml de solução

#### 5.4 ANÁLISE DE LÂMINAS

A análise das lâminas varia conforme a técnica de coloração empregada: para coloração convencional, as metáfases serão analisadas (desenhadas) em aumento de 1.000x, anotando-se o número de cromossomos (2n) e o número de braços autossômicos (NA ou NFA). Em média serão analisadas 10 células por exemplar, selecionando-se as três melhores para cariotipagem; na análise em bandamentos G, bandamento C e NOR serão selecionadas as melhores metáfases (em geral três) para digitalização.

#### 5.5 DIGITALIZAÇÃO DE IMAGENS E MONTAGEM DOS CARIÓTIPOS

As melhores metáfases, escolhidas durante a análise ao microscópio óptico no aumento de 1000x com imersão, tiveram suas imagens digitalizadas utilizando microscópio Zeiss Axiophot para posterior montagem dos cariótipos de cada exemplar, através do sistema BandView.

### 6 RESULTADOS

As análises das amostras dos roedores coletados na Floresta Nacional de Piraí do Sul foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Conservação Animal da UFPR. Essas amostras foram de: cinco indivíduos de *Akodon montensis*, seis de *Brucepattersonius iheringi*, três de *Nectomys squamipes*, nove de *Oligoryzomys nigripes* e quatro de *Thaptomys nigrita*, números de machos e fêmeas para cada espécie estão representados na TABELA 1.

TABELA 1. NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS POR ESPÉCIE.

Espécies	2n	NA	Nº de indivíduos analisados	Sexo
<i>Akodon montensis</i>	24/25	40/42	5	2 machos e 3 fêmeas
<i>Brucepattersonius iheringi</i> *	52/52	50/51*	6	6 fêmeas
<i>Nectomys squamipes</i>	56	54	3	3 machos
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	62	82	9	4 machos e 5 fêmeas
<i>Thaptomys nigrita</i>	52	52	4	1 macho e 3 fêmeas

\* Um indivíduo apresentou o cariótipo com o NA diferenciado

## 6.1 *Akodon montensis*

Foram analisados quatro indivíduos, em coloração comum, em uma lâmina branca os pontos com as melhores metáfases foram marcados, para cada protocolo analisado. Foi realizada a captura de imagens das metáfases do *Akodon montensis* (FIGURA 2) (TABELA 1) em coloração comum e montagem do cariótipo (FIGURA 3). Através da coloração comum foi possível observar o cromossomo B submetacêntrico em um macho, 1 par de submetacêntricos, 8 pares de metacêntricos, 1 par de acrocêntricos, 1 par de pequenos metacêntricos característica do gênero *Akodon*, sendo os cromossomos sexuais são acrocêntricos sendo o X maior que o Y. De acordo com essas análises, observou-se o  $2n= 24$  ou  $25$  devido à presença de cromossomos B.

O NA de *Akodon montensis* que seria o número fundamental ou números de braços dos cromossomos, nessa espécie é  $NA=40$  para  $2n=24$ ;  $NA=42$  para  $2n=25$ . O NA encontrado está de acordo com o relatado pela literatura (YONENAGA-YASSUDA, 1975).

FIGURA 2 - METÁFASE EM COLORAÇÃO COMUM COM GIEMSA DE *Akodon montensis* ( $2n=25$ ).

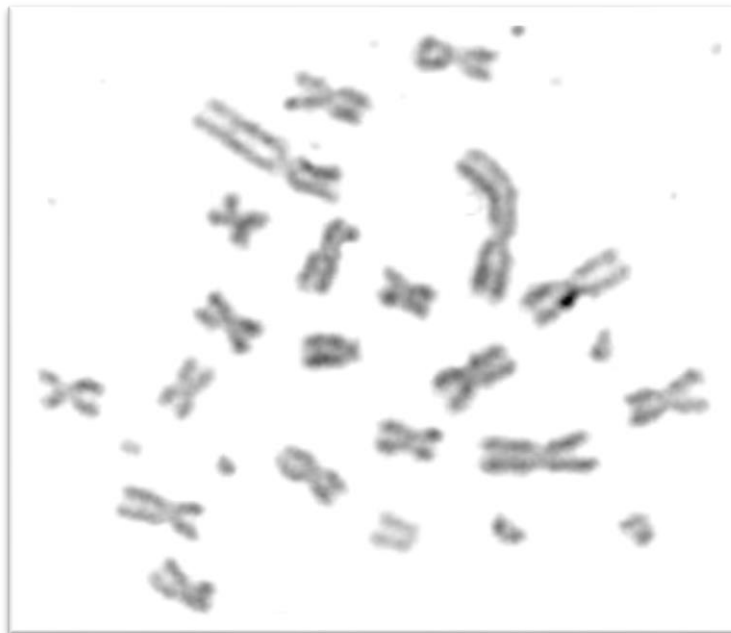
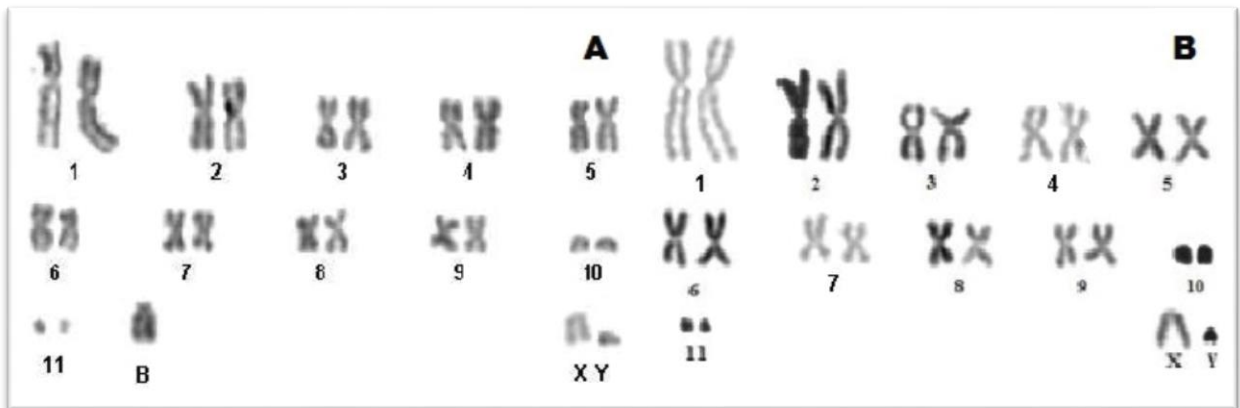


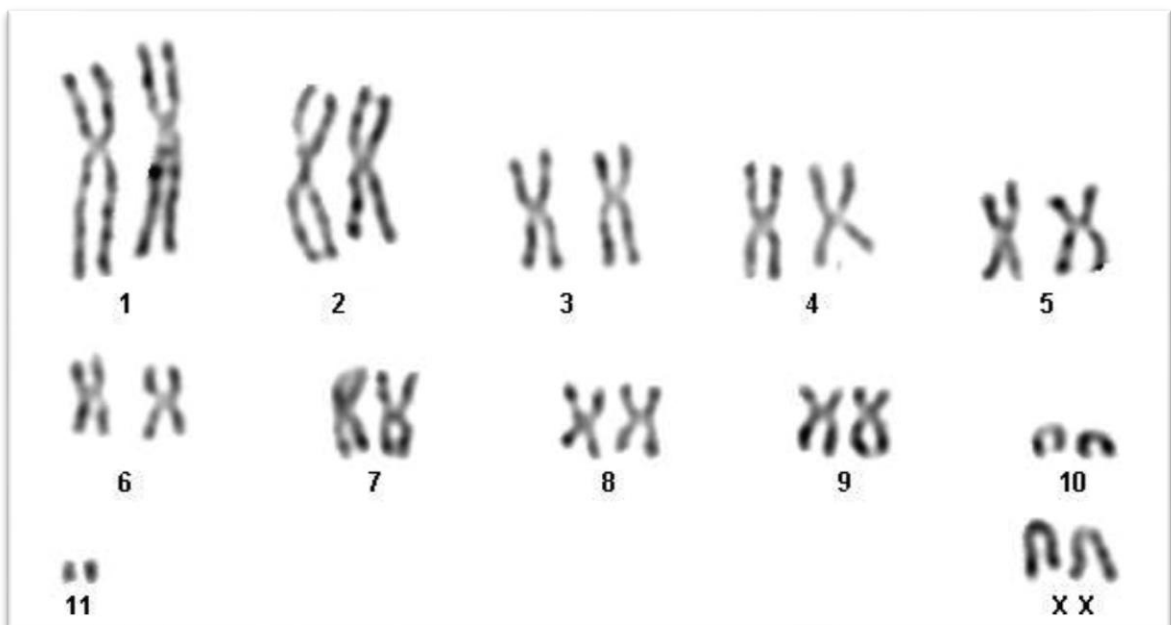
FIGURA 3- CARIÓTIPO DE *Akodon montensis*. EM COLORAÇÃO COMUM COM GIEMSA



A- Macho  $2n=25$  devido à presença de um cromossomo B com  $NA=44$ . B- macho  $2n=24$  com  $NA=40$ .

A banda G foi obtida em um indivíduo *Akodon montensis* com o  $2n=24$ , realizado essa técnica para facilitar a visualização dos cromossomos homólogos e detecção de regiões com alterações na morfologia do cromossomo (FIGURA 4).

FIGURA 4 – CARIÓTIPO EM BANDAMENTO G, *Akodon montensis* FÊMEA COM ( $2n= 24$ ).



## 6.2 *Brucepattersonius iheringi*

Foram capturadas imagens de metáfases de *Brucepattersonius iheringi* (FIGURA 5) (TABELA 1) em coloração comum. De acordo com essas análises, observou-se o  $2n=52$ .

*Brucepattersonius* apresenta todos os cromossomos acrocêntrico de variados tamanhos, o cromossomo X é um acrocêntrico ligeiramente maior que os autossomos, o número autossomos (NA) foi variado, sendo encontrado NA= 50, 51, com a presença de um cromossomo metacêntrico pequeno no par 20 tornando esse par heteromórfico, essa variação pode representar uma simpatria entre os indivíduos de *Brucepattersonius iheringi* NA=50, e um indivíduo com NA=51 (FIGURA 6),

FIGURA 5- METÁFASE EM COLORAÇÃO COMUM EM GIEMSA DE *Brucepattersonius iheringi* ( $2n=52$  e NA=51).

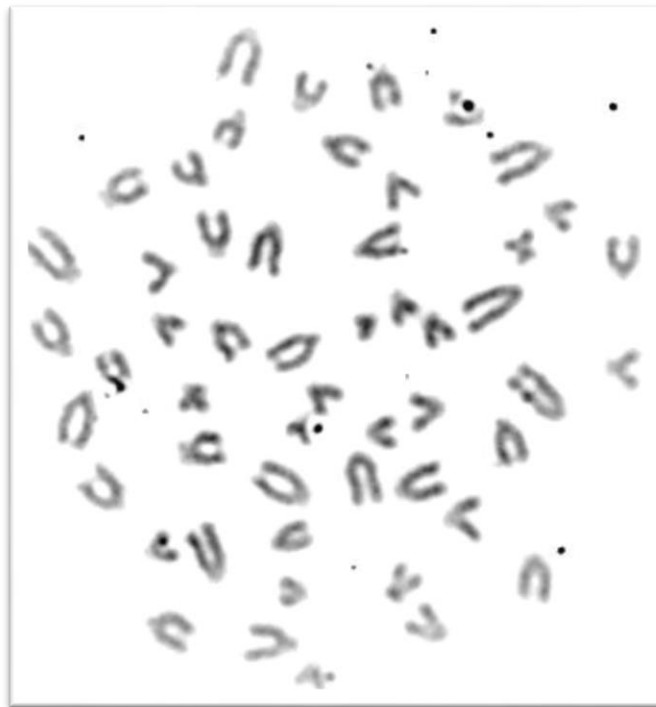
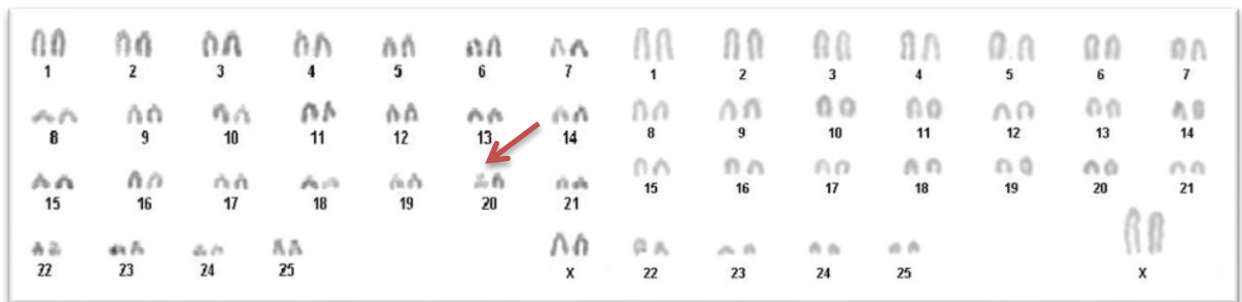


FIGURA 6 – CARIÓTIPO DE *Bucepattersonius iheringi* (FÊMEA) À ESQUERDA COM NA=51 E (FÊMEA) À DIREITA COM NA=50.

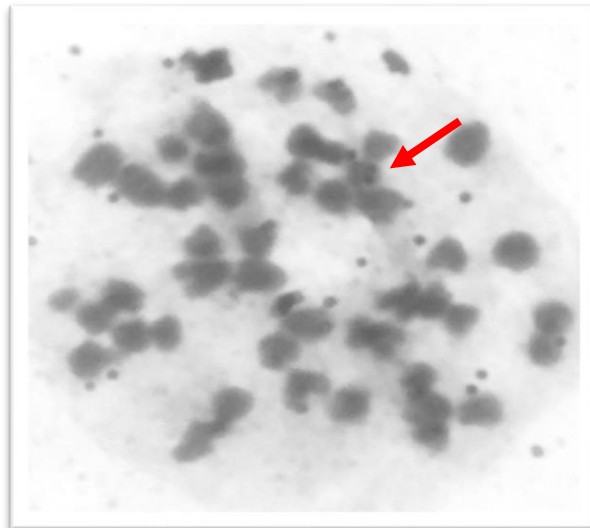


A seta indica o par 20 com heteromórfica, um cromossomo metacêntrico e homólogo sendo acrocêntrico.

FONTE: Fernanda Gatto.

A realização de bandamento Ag-NOR em *Bucepattersonius iheringi* apresentou marcação da região organizadora de nucléolo na (FIGURA 7) a seta indica apenas a marcação em um cromossomo do par 20, marcação não descrita descrita na literatura.

FIGURA 7 – METAFASE COM BANDAMENTO AG-NOR DE *Bucepattersonius iheringi*.



Seta indicando a marcação da região organizadora de nucléolos, Ag-NOR. Marcação no cromossomo 20 com pontos em ambas as cromátides.

### 6.3 *Nectomys squamipes*

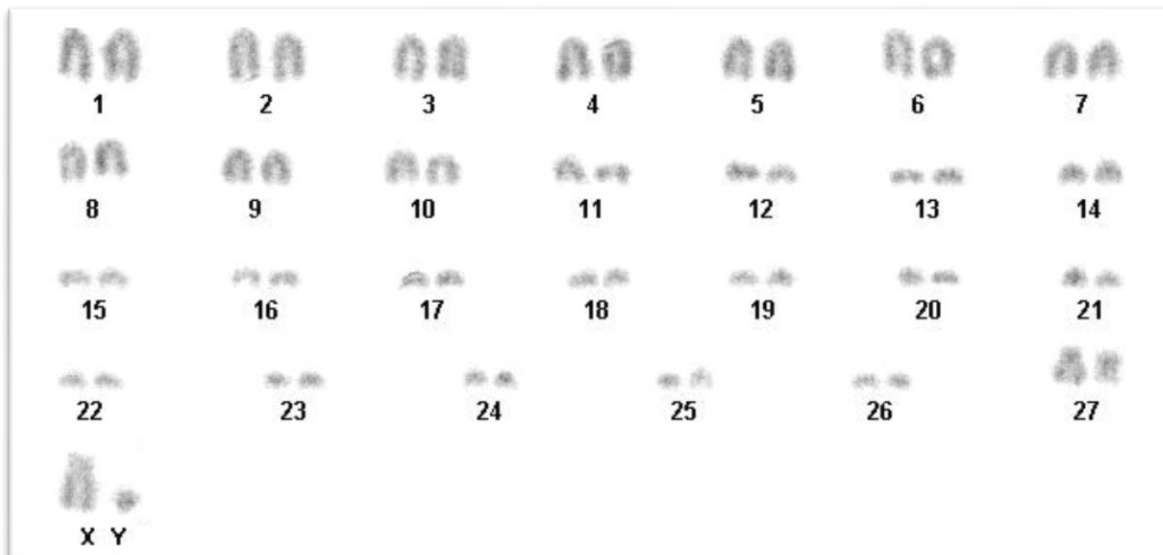
As metáfases de *Nectomys squamipes* em coloração comum foram digitalizadas e suas análises determinaram o  $2n=56$  (FIGURA 8) (TABELA 1).

*Nectomys squamipes* possui todos os cromossomos acrocêntricos de variados tamanhos com  $NA=54$ , não apresentando cromossomos extras numerários. (FIGURA 9).

FIGURA 8 – CARIÓTIPO DE *Nectomys squamipes*  $2n=56$ .



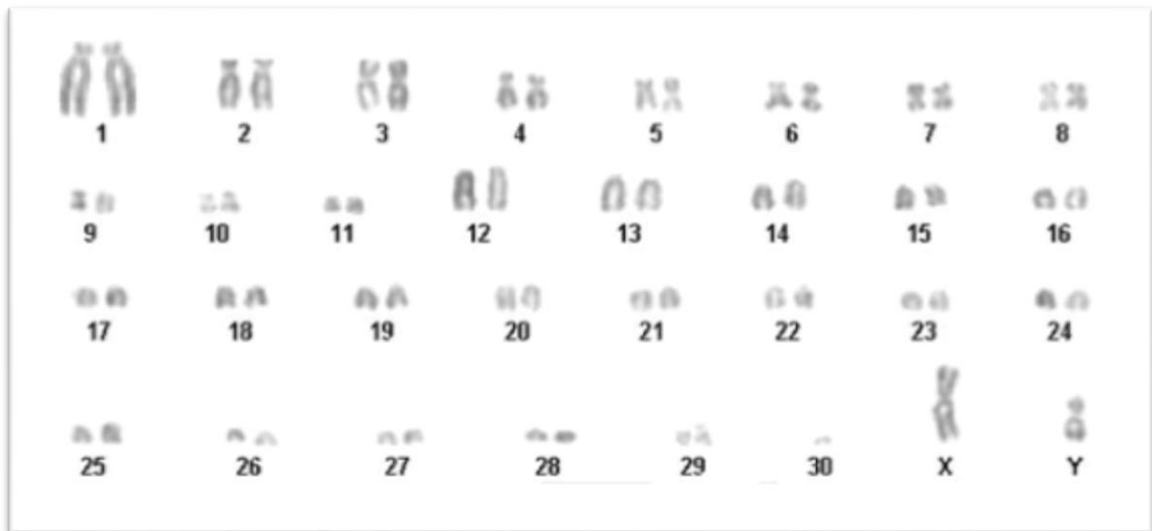
FIGURA 9 – CARIÓTIPO DE *Nectomys squamipes*  $2n=56$   $NA= 54$ , EM COLORAÇÃO COMUM.



#### 6.4 *Oligoryzomys nigripes*

Para *Oligoryzomys nigripes* (FIGURA 10) (TABELA 1) a análise citogenética, em coloração comum, apresentou 62 cromossomos e o NA=82. No par sexual, o X é um metacêntrico e o Y um submetacêntricos.

FIGURA 10– CARIÓTIPO DE *Oligoryzomys nigripes* EM COLORAÇÃO COMUM (2n=56).



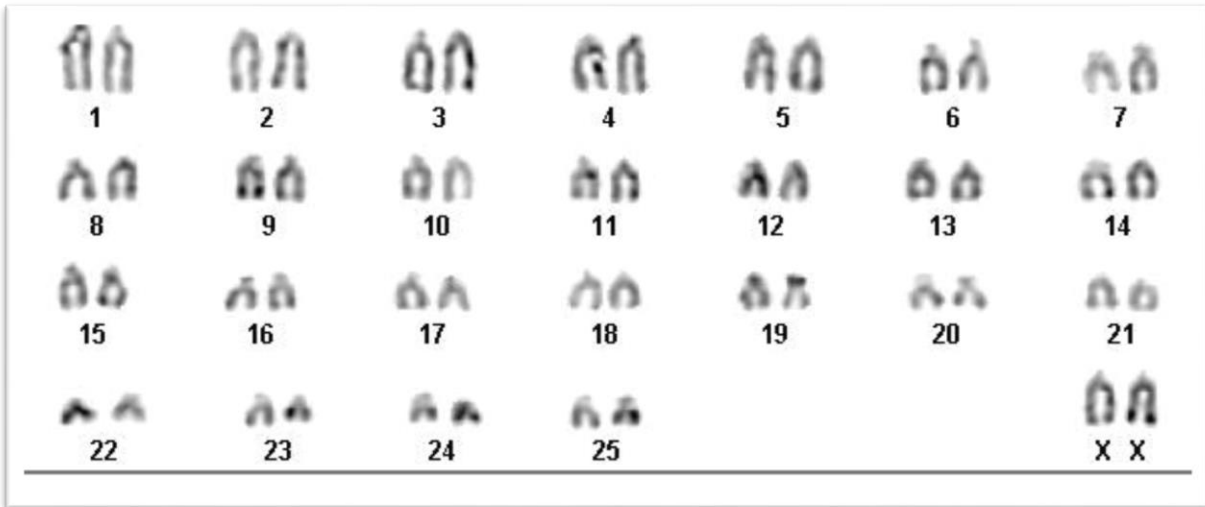
FONTE: Fernanda Gatto.

#### 6.5 *Thaptomys nigrita*

Foram submetidos à cariotipagem quatro espécimes de *Thaptomys nigrita* onde foi encontrado o 2n=52 e o NA=52.

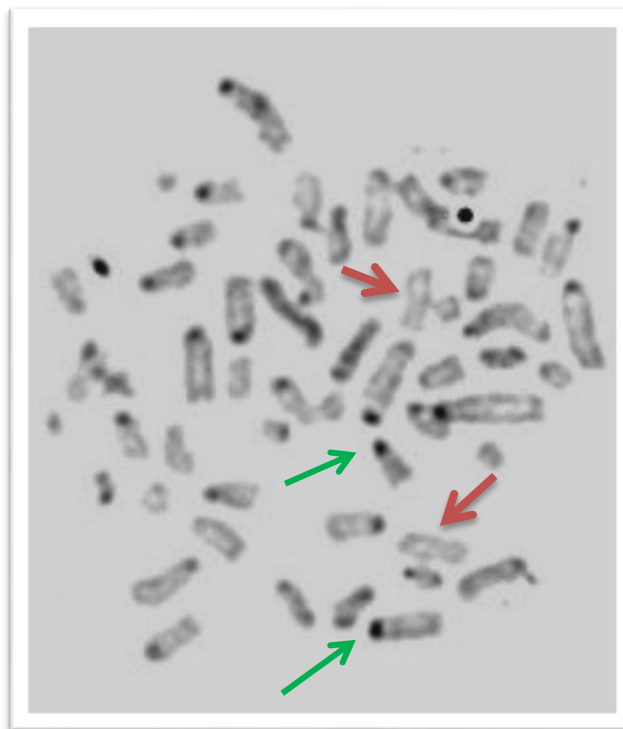
O conjunto autossômico possui 25 pares de cromossomos acrocêntricos. O cromossomo X apresentou-se na forma acrocêntrica grande, uma vez que os indivíduos fotografados eram fêmeas (FIGURA 11) (TABELA 1).

FIGURA 11– CARIÓTIPO DE *Thaptomys nigrita* ( $2n=52$ ) (NA=52) EM COLORAÇÃO COMUM.



Foi realizado bandamento C para *Thaptomys nigrita* essa técnica é utilizada para marcar regiões que possuem heterocromatina constitutiva, ou seja, regiões de telômeros e centrômeros, com o cariótipo sendo composto por cromossomos acrocêntricos a marcação ocorreu na região centromérica como indicado nas setas verdes (FIGURA 12).

FIGURA 12– METÁFASE COM BANDAMENTO C *Thaptomys nigrita* ( $2n= 52$ ).



Setas vermelhas indicam o cromossomo X, acrocêntrico. Setas em verde indicam a marcação do bandamento C.

## 7 DISCUSSÃO

Para a Floresta Nacional de Pirai do Sul, analisamos citogeneticamente cinco espécies da Ordem Rodentia: *Akodon montensis*, *Brucepattersonius iheringi*, *Nectomys squamipes*, *Oligoryzomys nigripes* e *Thaptomys nigrita*.

Para a coloração comum os dados obtidos em relação ao  $2n$  e morfologia dos cromossomos, foram os mesmos encontrados na literatura, para a espécie de *Akodon montensis*. Nesta população foram observados exemplares de *Akodon montensis* com  $2n=24$ , não portadores do cromossomo B. Estes resultados estão de acordo com os preconizados por outros autores (VENTURA 2004; SOARES, 2014; FAGUNDES *et al.* 2000). A presença de indivíduo com o cromossomo extra numérico em populações de *Akodon montensis* já é descrito na literatura, com  $2n=25$  (YONENAGA-YASSUDA 1975). Aqui analisamos um macho com o cromossomo B submetacêntrico, morfologia diferente dos cromossomos extra numéricos já descritos para a Floresta Nacional de Pirai do Sul (GRAZZINI, 2014), novas coletas em uma sessão maior da FLONA poderão disponibilizar melhor esses dados. A coloração em banda G apresenta as marcações em regiões de heterocromatina (região mais escura rica em timina e adenina), e a eucromatina (regiões mais clara ricas em citosina e guanina) que condessam mais tardiamente na prófase. Os resultados para bandamento G em *Akodon montensis* estão de acordo com o descrito na literatura (SBALQUEIRO, 1989).

Os espécimes de *Brucepattersonius* apresentam  $2n=52$ , com a maioria dos cromossomos acrocêntricos inclusive o par sexual (HERSHKOVITZ, 1998) esse gênero apresenta algumas espécies onde as morfologias são semelhantes, um método para identificação das espécies é a utilização da citogenética, como na espécie *Brucepattersonius iheringi* que apresenta  $2n=52$  e  $NA=50/NA=51$ . É interessante ressaltar que a ocorrência do heteromorfismo do par 20 pode representar uma simpatria do gênero, ocorrência das espécies *Brucepattersonius iheringi* e *Brucepattersonius griserufescens*, esse evento ainda não apresenta registros na literatura. Para confirmação desses dados serão necessários dados moleculares como FISH.

A marcação da região organizadora de nucléolos ocorreu no cromossomo 20, ainda não descrito na literatura para *Brucepattersonius iheringi*.

Os exemplares de *Nectomys squamipes* o conjunto autossômico formado por 26 pares de cromossomos acrocêntricos com alto grau de variedade de tamanho, e o último par metacêntrico pequeno. O par sexual apresentou X de tamanho grande e submetacêntrico e Y de tamanho médio e também submetacêntrico. A espécie apresentou  $2n=56$  e  $NA=54$ , como relatado por PARESQUE *et al.* (2004); GATTO-ALMEIDA (2015)

Para a região da Floresta Nacional de Pirai do Sul não foi encontrado nenhum indivíduo com presença de cromossomo extra numérico, como já relatado na literatura (GATTO-ALMEIDA, 2015) para outras regiões de Mata Atlântica.

O gênero *Oligoryzomys* possui 9 espécies que ocorrem no Brasil, sendo elas: *O. chacoensis*, *O. flavescens*, *O. fornesi*, *O. fulvescens*, *O. microtis*, *O. moojeni*, *O. nigripes*, *O. rupestris* e *O. stramineus* (GATTO-ALMEIDA, 2015). A distribuição de *Oligoryzomys nigripes* se dá do Pernambuco ao norte do Rio Grande do Sul, alcançando Minas Gerais e o Distrito Federal (BONVICINO, 2008).

Para *Oligoryzomys nigripes* a análise citogenética em coloração comum corroborou com a relatada por YONENAGA (1975), apresentou 62 cromossomos, entre os autossomos, 11 pares de cromossomos meta e submetacêntricos (Pares 1 a 11) e 19 de acrocêntricos (pares 12 a 30), que resultou em  $NA=82$ . No par sexual, o X é um metacêntrico e o Y um submetacêntrico.

A espécie *Thaptomys nigrita* é considerada endêmica da Mata Atlântica essa espécie ocorre desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul (CARLETON E MUSSER, 2005; PAGLIA *et al.*, 2012). O Bandamento C marcou todos os cromossomos acrocêntricos autossômicos, os cromossomos sexuais não apresentaram marcação.

Dos espécimes de *Thaptomys nigrita* sendo três fêmeas e um macho apresentaram  $2n=52$ ,  $NA=52$ . Possui 25 pares de autossomos acrocêntricos de variados tamanhos. O cromossomo X é acrocêntrico médio e o Y é um submetacêntrico pequeno, o cariótipo encontrado é corroborado pelo descrito por YONENAGA (1975) (VENTURA, 2004).

## 8 CONCLUSÃO

As técnicas de coloração comum e bandeamento são importantes para caracterizar citogeneticamente os exemplares que se deseja estudar. Através dessas técnicas é possível identificar formas e possíveis arranjos cromossômicos de cada espécie.

Os dados obtidos com a coloração comum foram os mesmo esperados em relação aos dados encontrados na literatura, em relação ao  $2n$  e formas cromossômicas de cada exemplar.

Assim concluímos que:

- Foi possível identificar a espécie de todos os exemplares aqui estudados através das técnicas de coloração comum;
- O gênero *Brucepattersonius* apresentou indivíduos com  $2n=52$ , porém ocorreram diferenças no  $NA= 50$  e  $51$ , o que sugere a ocorrência em simpatria de duas espécies do gênero *Brucepattersonius iheringi*. *Brucepattersonius griserufescens*. Para a confirmação desse evento são necessários testes moleculares não propostos nesse trabalho. A marcação de regiões organizadoras de nucléolo para a espécie, marcação no par 20, dado inédito para a espécie;
- A espécie *Akodon montensis*, apresentou um indivíduo com presença de um cromossomo B, fato também já relatado em literatura, porém a morfologia do cromossomo extra numerário difere das já descritas para a Floresta de Piraí do Sul;
- *Nectomys squamipes*, *Oligoryzomys nigripes*, *Thaptomys nigrita* apresentaram cariótipo conforme o relatado na literatura.
- *Thaptomys nigrita* teve marcação de bandamento C em todos os cromossomos acrocêntricos autossômicos na região dos centrômeros, os cromossomos sexuais não apresentaram marcação.
- *Nectomys squamipes* não apresentou cromossomo extra numérico.
- Através das análises cromossômicas em coloração comum, foi possível identificar citotaxonomicamente as espécies coletadas, e assim

auxiliar na elaboração de um inventário preliminar das espécies de roedores de pequeno porte não voadores da Floresta de Pirai do Sul.

## 9 REFERÊNCIAS

ANTUNES, P. C.; CAMPOS, M. A. A.; OLIVEIRA-SANTOS, L. G. R.; GRAIPEL, M. E. **Population dynamics of *Euryoryzomys russatus* and *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia, Cricetidae) in an Atlantic forest area, Santa Catarina Island, Southern Brazil.** *Biotemas*, v. 22, n. 2, p. 143–151, 2009.

ARRIEIRA, R. L.; MOTA, T. F. M.; FILHO, H. O.; **Análise cienciométrica da Ordem Rodentia (Mammalia: Erethizontidae) como ferramenta para o delineamento de áreas prioritárias à conservação.** UEPG Publicatio 2013.

BONVICINO, C., R.; LINDBERGH, S., M.; MAROJA, L., S. **Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic Forest and Cerrado: commentson their potencial use for monitor ingenvironment.** *Braz. J. Biol.* [online]. 62, 765-774. 2002 a.

BONVICINO, C. R., and LANGGUTH, A. **The *Oryzomys subflavus* species group, with description of two new species (Rodentia, Muridae, Sigmodontinae).** *Arquivos do Museu Nacional*, vol. 60, no. 4, p. 285-294. 2002 b.

BONVICINO, C. R. DE OLIVEIRA, J. A. D'ANDREA, P. S. **Guia de Roedores do Brasil.** Organização Pan-Americana de Saúde, 2008.

CÁCERES, N. C. O Papel de Marsupiais na Dispersão de Sementes. In: Cáceres, N. C.; Monteiro-Filho, E, L. A. (Org.) **Os Marsupiais do Brasil: Biologia, Ecologia e Evolução.** 1a Ed. Campo Grande: Editora UFMS. 284p., 2006.

CARLETON, M. D.; MUSSER, G. G. OrderRodentia. In Wilson, D. E.;Reeder, D. M. **Mammal Species of the World A Taxonomic and Geographic Reference.** 3a. Ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press. pp. 745–752, 2005.

COGHETTO, F. et. al. **Distribuição espaço-temporal de roedores silvestres na floresta nacional de passo fundo/rs. Caderno de Pesquisa, série Biologia, volume 26, número 2, 2014.** Disponível em:

<<https://online.unisc.br/seer/index.php/cadpesquisa/article/view/4825/3355>>

Acessado em: 24/06/2016.

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

FAGUNDES, V., CHRISTOFF, A.U. & YONENAGA-YASSUDA, 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).** Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil 1998.

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, 2000.

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

GATTO-ALMEIDA, F. **Pequenos mamíferos não voadores do parque estadual rio da onça (matinhos, pr): diversidade e morfologia**, Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

GEISE, L., CANAYEZ, F.C. & SEUÁNEZ, H.N. **Comparative Karyology in *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) from Southeastern Brazil.** *J. Heredity*. 89:158-163, 1998.

GRAZZINI, G. **Identidade e Diversidade dos Pequenos Mamíferos não voadores da Floresta Nacional de Piraí do Sul, Paraná, Brasil**, 85 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral.** Ed. Guanabara, Rio Janeiro 1988.

GUERRA, M., PEDROSA, A., SILVA, A. E. B., CORNÉLIO, M. T. M., SANTOS, K., SOARES FILHO, W.S. (1997) **Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a Citrusgermo plasm bank.** *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, Brasil, 20: 489 – 496.

HERSHKOVITZ, P. **Report on some sigmodontinae rodents collected in southeastern Brazil with descriptions of a new genus and six new species.** *Bonn. Zool. Beitr.*, Bd. 47, H. 3-4, p. 193-256, 1998.

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.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo em 2014.** 2014.

KOTTEK, M.J. *et. al.* **World map of the Koppen-Geiger climate classification updated.** *Meteorologische Zeitschrift*. 2009.

MUSSER, G. G.; CARLETON, M. D. Family Muridae. In: D. E. WILSON and D. M. REEDER, **Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference.** 2nd ed. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1993.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A.; KENT, J. **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** *Nature*, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.

MMA. **Mata Atlântica: patrimônio nacional dos brasileiros.** 2nd ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2010.

MOOJEN, J. **Os Roedores do Brasil.** Rio de Janeiro: Editora Instituto Nacional do Livro, 1952.

PAGLIA, A. P.; DA FONSECA, G. A.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M.; CHIARELLO, A. G., LEITE, Y. R. L.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. C.; MITTERMEIER, R. A. & PATTON, J. L. **Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil.** 2nd ed. Belo Horizonte: Conservation International, 2012.

PARDINI, R; *et. al.* **The role of forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in a Atlantic forest landscape.** *Biological Conservation*, 124. 2005.

PARESQUE, R.; SOUZA, W. P. DE; MENDES, S. L.; FAGUNDES, V. **Composição cariotípica da fauna de roedores e marsupiais de duas áreas de Mata Atlântica do Espírito Santo, Brasil.** *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, v. 55, n. 27, p. 5–33, 2004.

PARESQUE, R.; CHRISTOFF, A. U.; FAGUNDES, V. Karyology of the Atlantic forest rodent *Juliomys* (Cricetidae): A new karyotype from southern Brazil. **Genetics and molecular biology**, v. 32, n. 2, p. 301–5, 2009.

PARESQUE, R. **Diversificação das espécies do gênero *Oligoryzomys* BANGS 1900 (Rodentia, Cricetidae) na Região Neotropical,** 2010.

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.

SANTOS, Á. B.; LÓSS, S.; LEITE, Y. L. R. no Parque Estadual da Fonte Grande, Vitória, Espírito Santo. Patterns of forest layer use by small mammals at Fonte Grande State Park, Vitória. **Natureza Online**, 2004.

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

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 an undescribed *Akodon* from Central Brazil, a species with**

**the lowest known diploid chromosome number in rodents.** Cytogenet. Cell Genet., 81: 46-50, 1998.

SOARES, A. A. **Caracterização Cariotípica de Roedores do Parque Estadual do Acaraí, São Francisco do Sul, Santa Catarina.** Universidade Federal do Paraná- UFPR, Monografia, 2014.

SOS MATA ATLANTICA. **Relatório Anual 2012.** 2012.

SOUSA, M. A. N.; LANGGUTH, A.; GIMENEZ, E. A. **Mamíferos dos Brejos de Altitude Paraíba e Pernambuco.** Ministério do meio ambiente. 2004.

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

VAUGHAN *et al*, **Review of Mammalogy.** University of Nebraska – Lincoln 2000.

VENTURA, K.; SILVA, M. J. D. J.; FAGUNDES, V.; PARDINI, R.; YONENAGA-YASSUDA, Y. **An undescribed karyotype for *Thaptomys* (2n = 50) and the mechanism of differentiation from *Thaptomys nigrita* (2n = 52) evidenced by FISH and Ag-NORs.** Caryologia, v. 57, n. 1, p. 89–97, 2004.

YONENAGA-YASSUDA, Y. **New Karyotype and somatic and germ-cell banding in *Akodon arviculoides* (Rodentia, Cricetidae).** Cytogenet. Cell Genet. 23: 241-249. 1975