KAREN VENTURA

**“ESTUDOS DE CITOGENÉTICA E DE
FILOGENIA MOLECULAR EM ROEDORES DA
TRIBO AKODONTINI”**

Tese apresentada ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de Biologia/Genética.

Orientadora: Yatiyo Yonenaga-Yassuda

São Paulo

2009

Ventura, Karen

Estudos de Citogenética e de Filogenia Molecular em
Roedores da Tribo Akodontini. Pp. 156

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

1. Citogenética. 2. Akodontini. 3. Pintura cromossômica.
4. Rearranjos cromossômicos. 5. FISH telomérica. 6. Filogenia.
7. Citocromo *b*. I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Yatiyo Yonenaga-Yassuda
Orientadora

Aos mais antigos: meus pais, vovô
Cezar e vovó Maria Dirce, minha avó
Bisa Dona Hilda e meu irmão Tio Erich.

Aos mais novos: meu marido papai
George e minha filha “neném delícia”
Sarah.

Em homenagem à pequena Sarah,

O Rato

Todo rato tem rabo longo
Todo rato tem faro esperto
Todo rato curte escuro lambe restos
 Todo rato deixa rastros
 Todo rato trai e mente
 Todo rato assusta a gente
 Todo rato anda em bando
 São os ratos, são os ratos
 São os ratos bem malandros

Mas sempre tem um que é diferente
Tem sempre um que até surpreende a gente
 Este rato que aqui se mostra
 É um rato que a gente gosta
 É um rato que em vez de catar
Lasquinhas de queijo e comer na rua
 Prefere mil vezes um beijo
 Um beijo brilhante da lua

Paulo Tatit e Edith Derdyk,
1998

Agradecimentos

Gostaria de agradecer às pessoas e entidades que colaboraram, de alguma maneira, para o desenvolvimento dessa Tese, assim como aquelas que fizeram com que esses dias de trabalho se tornassem mais proveitosos e prazerosos.

À Professora Dra. Yatiyo Yonenaga-Yassuda, pela orientação, confiança e credibilidade no decorrer desses anos.

À Dra. Maria José de Jesus Silva pela co-orientação desde a época da iniciação científica até os dias de hoje, pelas leituras críticas e pelo divertimento garantido.

Ao Professor Dr. Miguel T. Rodrigues, meu padrinho na pesquisa, que me apresentou ao mundo maravilhoso da Citogenética de Vertebrados por se mostrar sempre entusiasmado e interessado durante o desenrolar desse trabalho. E também por toda surpreendente “habilidade” em se coletar tantos *Blarinomys* por aí...

Às chefias vigentes no Departamento de Genética e Biologia durante o período do desenvolvimento desse projeto, assim como as da comissão de Pós-Graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido para a realização desse trabalho.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) pelas licenças de coleta e de transporte de células.

Ao Professor Malcolm Ferguson-Smith por me receber em seu laboratório e ter sido tão generoso durante o tempo passado sob sua orientação.

Às queridas companheiras do FISH Lab em Cambridge, Patrícia O’Brien, Maggie Wallduck, Francis Lovel e Laura Hirst que me ensinaram que além de muita dedicação, o segredo de se conseguir excelentes resultados em *chromosome painting* é respeitar sempre o *Tea time*.

Ao Willem Renz pelo conhecimento teórico transmitido sobre as técnicas de pintura cromossômica e por compartilhar o café na hora do chá.

Aos companheiros de laboratório Renata Cecília, Rodrigo Guincho, Roberto Vilela, Carolina Elena e Marcinha e à agora professora Dra. Kátia Pepê pelas ajudas, inúmeras, durante esse tempo.

À Patrícia Maltempi, querida companheira na Inglaterra pela amizade durante o tempo que passamos juntas em terras distantes.

À Professora Dra. Ângela Vianna-Morgante por permitir o uso de sua sala de cultura e à Silvinha, sempre tão prestativa e carinhosa comigo e com minhas células.

À Dra. Renata Cecília Amaro e a Camilla Bruno Di Nizo, aluna da Dra. Maria José de Jesus Silva do Instituto Butantan, pelas preparações citogenéticas de *Blarinomys* no campo.

À Dra. Valéria Fagundes e ao Dr. Alexandre U. Christoff por fornecerem amostras de tecido de *Thaptomys* e de *Deltamys*, respectivamente.

Ao Leonardo Setsuo Kobashi e ao Professor Dr. Paulo Lee Ho, Chefe do Laboratório de desenvolvimento de processos "Centro de Biotecnologia" do Instituto Butantan por permitirem uso do sequenciador.

Aos funcionários do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IB-USP, sempre tão prestativos.

À toda minha família e aos meus amigos nota dez, que me ajudaram e apoiaram em tantos momentos de dificuldade, que me acompanharam, que dividiram comigo e com quem eu dividi alegrias e conquistas.

Em especial aos meus pais por se dedicarem tanto ao novo posto de avós, pelas vezes que foram tão prestativos cuidando com tanto amor da Sarah para que eu pudesse terminar a Tese.

À Sarah, minha filha amada, deliciosa, doce, apaixonante e etc., simplesmente por existir.

Ao George, meu marido querido, pelo apoio que tem me dado na vida profissional e principalmente pelo exemplo de pai e companheiro amoroso, dedicado, responsável e atencioso que é.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
I.1. Pintura Cromossômica.....	1
I.1.1. O cariótipo de fluxo.....	3
I.1.2. Estudos citogenéticos usando pintura cromossômica.....	4
I.1.3. A pintura cromossômica e a investigação da notável redução de número diplóide no processo de evolução cromossômica em espécies de cervídeos.....	7
I.2. Estudos filogenéticos com sequências gênicas e os roedores akodontinos.....	8
I.2.1. O DNA mitocondrial e os estudos evolutivos.....	8
I.2.2. Os roedores akodontinos.....	9
I.2.3. O exemplo do gênero <i>Akodon</i> : citogenética e filogenia molecular.....	11
I.3. Objetivos.....	14
I.4. Referências bibliográficas.....	16
CAPÍTULO II. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
II.1. Amostra.....	24
II.2. Cultura de fibroblastos.....	27
II.3. Isolamento dos cromossomos.....	29
II.4. Preparações cromossômicas.....	30
II.5. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	32
II.6. Técnicas de Coloração.....	35
II.7. Obtenção de sequências do gene mitocondrial citocromo <i>b</i>	38
II.8. Métodos de inferência filogenética.....	44
II.9. Medidas de suporte.....	44
II.10. Referências bibliográficas.....	46
CAPÍTULO III. DETECÇÃO DE HOMOLOGIAS POR PINTURA CROMOSSÔMICA RECÍPROCA ENTRE <i>A. PARANAENSIS</i> , 2N=44, <i>A. MONTENSIS</i> , 2N=24, <i>A. CURSOR</i> , 2N=15 E <i>AKODON</i> SP. N., 2N=10: COMPLEXA DIFERENCIAÇÃO AUTOSSÔMICA E CONSERVAÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS DURANTE O PROCESSO QUE LEVOU AO MENOR NÚMERO DIPLÓIDE ENTRE OS ROEDORES.....	48
III.1. <i>Abstract</i>	48
III.2. Resumo.....	49
III.3. Introdução.....	50
III.4. Material e Métodos.....	53
III.5. Resultados.....	54
III.6. Discussão.....	59
III.7. Referências bibliográficas.....	82
CAPÍTULO IV. RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE <i>DELTAMYS</i> SP.: UM NOVO CARIÓTIPO COM 2N=40 E NF=40, XX: XY PROCEDENTE DA REGIÃO SUL DO BRASIL.....	86
IV.1. <i>Abstract</i>	86
IV.2. Resumo.....	86
IV.3. Introdução.....	87
IV.4. Material e Métodos.....	89
IV.5. Resultados.....	92
IV.6. Discussão.....	94
IV.7. Referências bibliográficas.....	101

CAPÍTULO V. <i>THAPTOMYS</i> THOMAS, 1916 COM CARIÓTIPOS $2N=50$, $NF=48$ E $2N=52$, $NF=52$: DUAS LINHAGENS RECUPERADAS POR ANÁLISES FILOGENÉTICAS MOLECULARES.....	105
V.1. <i>Abstract</i>	105
V.2. Resumo.....	105
V.3. Introdução.....	106
V.4. Material e Métodos.....	107
V.5. Resultados.....	109
V.6. Discussão.....	111
V.7. Referências bibliográficas.....	116
 CAPÍTULO VI. FILOGENIA MOLECULAR DE <i>BLARINOMYS</i> THOMAS, 1896 (SIGMODONTINAE, AKODONTINI) E A EXTRAORDINÁRIA DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA DO GÊNERO DEVIDO A REARRANJOS ROBERTSONIANOS E SUPERNUMERÁRIOS.....	119
VI.1. <i>Abstract</i>	119
VI.2. Resumo.....	120
VI.3. Introdução.....	120
VI.4. Material e Métodos.....	122
VI.5. Resultados.....	125
VI.6. Discussão.....	131
VI.7. Referências bibliográficas.....	150
 CAPÍTULO VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	153
Biografia.....	155

I. INTRODUÇÃO GERAL

I. 1. PINTURA CROMOSSÔMICA

Os cromossomos, que são o suporte físico do material hereditário nos eucariotos, foram observados pela primeira vez na segunda metade do século XIX (para revisão veja Gartler, 2006). Desde então, uma série de grandes avanços técnicos e conceituais tem se acumulado, levando a um crescente número de descrições de cariótipos espécies-específicos, incluindo a identificação do número de cromossomos ($2n$, número diplóide), número de braços cromossômicos (NF, número fundamental) e, quando presente, o reconhecimento dos cromossomos sexuais (X e Y, Z e W) (Trask, 2002).

Nesse contexto, o estudo sobre as mudanças cromossômicas que ocorreram durante o curso da evolução se tornou uma das áreas mais prósperas da citogenética animal. As técnicas de bandamento, especialmente GTG e RBG, permitiram a realização de comparações cariotípicas com maior detalhamento e confiabilidade entre espécies relacionadas, assim como, proveram as bases para o estabelecimento de hipóteses sobre os rearranjos cromossômicos que teriam levado às diferenças cariotípicas observadas (Dobigny e Yang, 2008).

Na década de 1990, a hibridação *in situ* fluorescente (FISH), a citometria de fluxo e a microdissecção, em conjunto com o desenvolvimento do DOP-PCR “*Degenerated Oligonucleotide Primed – Polymerase Chain reaction*” (Telenius e col., 1992) abriram o caminho para que a pintura cromossômica entre espécies fosse realizada em escala genômica (Wienberg e col., 1990; Scherthan e col., 1994; Yang e col., 1995), especialmente entre os mamíferos (O’Brien e col. 1999; Ferguson-Smith e Trifonov, 2007), que possuem conteúdo de DNA total praticamente constante.

Quando uma sonda cromossomo-específica de uma dada espécie é hibridada *in situ* nos cromossomos de outra espécie, a sonda de pintura detecta grandes regiões de homologia que contêm genes conservados entre as duas espécies. Algumas vezes a sonda hibrida em apenas um cromossomo, indicando que todo o cromossomo é conservado. Em outros casos, alguns cromossomos ou partes de um mesmo cromossomos são pintadas indicando que rearranjos inter e intracromossômicos ocorreram durante a divergência das duas espécies. Em

geral, espécies mais relacionadas exibem um menor número de rearranjos do que espécies mais divergentes (Ferguson-Smith e col., 1998).

Entre os mamíferos, grandes blocos de DNA, frequentemente cromossomos inteiros ou braços cromossômicos, podem ser compartilhados por espécies bastante divergentes. Embora as espécies apresentem diferentes números diplóides e cromossomos com diferentes morfologias, as diferenças se devem ao fato de que esses blocos são reunidos ou redistribuídos em diferentes combinações (Murphy e col., 2005). Blocos que são consecutivos em uma espécie podem estar separados em outra, segmentos do bloco sintênico podem estar invertidos e os centrômeros reposicionados.

As sondas cromossomo-específicas, produzidas a partir de cromossomos separados por citometria de fluxo, podem ser usadas em experimentos de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para pintar cromossomos individuais e assim analisar os rearranjos (Cremer e col., 1988; Pinkel e col., 1988). No entanto, não é possível determinar, por pintura cromossômica, a orientação de cada bloco sintênico dentro de um cromossomo, a menos que a hibridação da sonda cromossômica seja realizada em conjunto com FISH para mapeamento de sequências que marquem os limites do bloco. Da mesma forma, não é possível identificar por pintura cromossômica a maioria dos rearranjos intracromossômicos, como segmentos invertidos ou uma inserção intersticial (rearranjo cromossômico no qual um segmento cromossômico do bloco é cortado de uma região e inserido em uma outra), sem o uso adicional de FISH para mapeamento.

Atualmente um número variado de sondas, marcadas com diferentes fluorocromos, podem ser usadas conjuntamente, resultando hibridações *in situ* multicoloridas. Um exemplo disso é o uso de FISH de 24 cores para discriminar entre o conjunto completo de sondas de cromossomos humanos, que permitiu identificar todos os rearranjos intercromossômicos que ocorreram durante a divergência de humanos e do gibão (*Hylobates concolor*, $2n=52$) em uma única hibridação, ou vice-versa, como é mostrado na figura 1. É possível, de uma única vez, hibridar todo o complemento de *Hylobates concolor* no cariótipo humano, ou quaisquer complementos inteiros entre cariótipos de qualquer espécie (Ferguson-Smith e Trifonov, 2007).

Figura 1. Comparação entre os complementos de *Hylobates concolor*, $2n=52$ e *Homo sapiens*, $2n=46$ pelo uso de FISH multicolorida: metáfase humana após hibridação com conjunto de sondas cromossomo-específicas derivadas dos cromossomo de gibão (retirado de Ferguson-Smith e Trifonov, 2007).

Como alternativa à citometria de fluxo, sondas cromossomo-específicas podem ser feitas a partir de microdissecção de cromossomos inteiros, ou de parte de cromossomos (Meltzer e col., 1992). Essa técnica tem aplicação especial para, aves e outros grupos que apresentam microcromossomos múltiplos, difíceis de serem separados por citometria de fluxo, e para estudos de comparação de homologia de sub-regiões cromossômicas.

I. 1. 1. *O cariótipo de fluxo*

O cariótipo de fluxo (gráfico de separação por citometria de fluxo) é característico para cada indivíduo e para cada espécie. A variação encontrada dentro de uma espécie é decorrente da presença de diferentes quantidades de DNA repetitivo, presente, na maioria das vezes, como heterocromatina pericentromérica. Em humanos, é frequentemente possível a distinção entre pares de homólogos devido à variação na quantidade de heterocromatina constitutiva (Fig. 2A) (Ferguson-Smith e col., 1998).

Com algumas exceções, espécies mais relacionadas tendem a apresentar cariótipo de fluxo similares. A figura 1A e B compara o cariótipo de fluxo de humano (*Homo sapiens*) com o de orangotango (*Pongo pygmaeus*). A principal diferença entre os dois é a ausência de um pico correspondente ao cromossomo 2 humano e a presença de dois picos adicionais no cariótipo de orangotango (cromossomos 11 e 12, dos quais o cromossomo humano 2 é derivado por fusão). Espécies com baixo número diplóide e, conseqüentemente, cromossomos grandes, tendem a exibir pouca variação na razão de pares de bases. Essa tendência é observada no cariótipo de fluxo da espécie de cervídeo *Muntiacus muntjak vaginalis* que apresenta $2n=6$ nas fêmeas e $2n=7$ nos machos, e no hamster chinês *Cricetulus griseus* com $2n=22$ (Fig. 2C e D) (Ferguson-Smith e col., 1998).

I. 1. 2. Estudos citogenéticos usando pintura cromossômica

Os primeiros estudos comparativos de FISH foram realizados usando bibliotecas de DNA cromossomo-específico de humanos como sondas de pintura em cromossomos de outros primatas (Wienberg e col., 1990; Jauch e col., 1992; Koehler e col., 1995). Esses estudos demonstraram o valor da pintura cromossômica comparativa na resolução de problemas de citotaxonomia e em estudos sobre rearranjos genômicos que ocorreram durante a evolução. Scherthan e col. (1994) demonstraram, com o uso de várias bibliotecas de DNA cromossomo-específico de humanos, a existência de segmentos homólogos nos cromossomos de camundongo, do cervídeo muntjac e de baleia, estendendo a técnica para uma série de outros mamíferos, diferentes de primatas. A partir deste ponto, muitos estudos comparativos foram realizados em bovídeos (Solinas-Toldo e col., 1995), suínos (Rettenberger e col., 1995) e equinos (Raudsepp e col., 1996) usando essas bibliotecas.

As sondas de pintura preparadas a partir de cromossomos separados por citometria de fluxo provaram ser superiores para a hibridação entre espécies. Assim, sondas de cromossomos humanos obtidas a partir dessa técnica tem sido usadas em estudos comparativos em espécies de Afrotheria, Xenarthra, Eulipotyphla, Carnivora, Pholidota, Cetartiodactyla, Perissodactyla, Scandentia, Chiroptera, Primata, Lagomorpha e Rodentia (Ferguson-Smith e Trifonov, 2007).

Figura 2. Cariótipos de fluxo. (A) Humano macho que apresenta 26 picos de cromossomos e duplicação intracromossômica do cromossomo 10 que permite a separação dos cromossomos de 10 a 12. Note a separação dos homólogos dos pares 14 e 15, indicados pelas setas, devido a heteromorfismos de heterocromatina centromérica. (B) Orangotango fêmea com 48 cromossomos. Equivalência aos homólogos humanos mostrada entre parênteses. (C) Muntjac indiano macho, com 7 cromossomos. (D) Hamster chinês macho com 22 cromossomos. Os eixos mostram o aumento da fluorescência. (Modificado de Ferguson-Smith e col., 1998).

Experimentos de pintura cromossômica recíproca podem ser realizados em quaisquer espécies que possuam cultura de células disponível, uma vez que cromossomos podem ser separados, e, a partir deles, podem ser produzidas sondas específicas.

Além das sondas de cromossomos humanos, também foram desenvolvidas sondas cromossomo-específicas de muitas espécies de diferentes ordens de mamíferos a partir de cromossomos separados por citometria de fluxo. Entre elas estão o camundongo *Mus musculus* (Rabbitts e col., 1995), o porco *Sus scrofa* (Langford e col., 1993; Milan e col., 1996), o cachorro *Canis familiaris* (Langford e col., 1996), a ovelha *Ovis aries* (Burkin e col., 1997), os lêmures *Eulemur macaco macaco* e *E. fulvus mayottensis* (Muller e col., 1997), os cervídeos *Muntiacus reevesi*, *M. m. vaginalis* (Yang e col., 1995, 1997a, b, c) e *Mazama gouazoubir* (Yang e col., 1997d), o marsupial *Macropus eugenii* (Toder e col., 1997), o macaco *Lagothrix lagotricha* (Stanion e col., 2001), o aardvare *Orycteropus afer* e o elefante africano *Loxodonta africana* (Yang e col., 2003), a zebra *Equus burchellii* (Trifonov e col., 2003), o esquilo *Sciurus carolinensis* (Li e col., 2004), os morcegos *Phyllostomus hastatus*, *Carollia brevicauda* (Pieczarka e col., 2005) e *Myotis myotis* (Ao e col., 2006) e o dromedário *Camelus dromedarius* (Balmum e col., 2007).

Durante os últimos 15 anos, mais de 100 pares de comparações genômicas foram conduzidas nos placentários usando a técnica de pintura cromossômica (Dobigny e Yang, 2008), permitindo que, pela primeira vez, se comparasse a arquitetura genômica de espécies distantes entre os Eutheria, sendo uma ferramenta atrativa para estudos filogenéticos assim como para a reconstrução de cariótipos ancestrais (Dobigny e col., 2004; Fröenicke, 2005; Ferguson-Smith e Trifonov, 2007; Graphodatsky e col., 2008).

No entanto, grandes desafios permanecem e, um deles é a investigação de linhagens que apresentam genomas extensamente rearranjados, como no caso dos roedores murídeos que representam 25% das espécies de mamíferos (Wilson e Reeder, 2005) das quais apenas um número limitado já foi examinado com enfoque da genômica comparativa moderna, particularmente pintura cromossômica (Graphodatsky e col., 2008). Esses roedores são caracterizados por apresentarem uma evolução cromossômica incrivelmente rápida (Stanion e col., 1999), o que torna difícil o acesso às homologias na ausência de pintura cromossômica multidirecional. Além disso, nesse grupo é difícil o estabelecimento de correspondência com o genoma humano (assim como os restantes dos placentários), uma vez que as sondas de

cromossomos humanos tem sua utilidade limitada se usadas nesses genomas derivados e vice-versa.

O uso prudente de conjuntos múltiplos de sondas cromossômicas obtidas de espécies de roedores que apresentem tanto cariótipos conservados quanto altamente rearranjados como feito no caso de carnívoros (Yang e col., 1999; 2000) talvez seja o procedimento que permita a realização de uma comparação significativa entre genomas de roedores.

A Citogenômica (ou a nova citogenética) “desfaz as fronteiras com a biologia molecular” (Speicher e Carter, 2005), já que representa um ponto de encontro entre duas linhas de pesquisa que podem agora se combinar em abordagens com ferramentas convencionais (e. g. técnicas de bandamento) e moleculares (e. g. pintura cromossômica e mapeamento gênico). O futuro próximo desta nova citogenética é promissor com o rápido desenvolvimento de técnicas de genômica comparativa e pintura cromossômica (Trask, 2002; Speicher e Carter 2005).

I. 1. 3. *A pintura cromossômica e a investigação da notável redução de número diplóide no processo de evolução cromossômica em espécies de cervídeos.*

Pintura cromossômica comparativa entre espécies tem sido usada para se investigar a notável variação de número diplóide e de cariótipos em espécies de cervídeos. Elevados números diplóides são comuns nesse grupo: por exemplo, $2n=70$, que é sugerido como o número diplóide ancestral da família Cervidae, e descrito em *Hydropotes inermis* e *Mazama gouazoubira* (Neitzel, 1987). Já nas espécies de muntjacs, *Muntiacus reevesi* apresenta $2n=46$ (Wurster e Benirschke, 1967) e *M. m. vaginalis* apresenta 6 grandes cromossomos na fêmea e 7 no macho (Wurster e Benirschke, 1970), sendo esses os menores números diplóides em mamíferos.

Os resultados de hibridação sugerem que o número cromossômico ancestral das espécies de cervídeos seja próximo de $2n=70$ e corroboram que a redução de número diplóide no gênero *Muntiacus* é resultado, principalmente, de múltiplas fusões cromossômicas e algumas fusões cêtricas (Yang e col., 1997a, b, c, d). Assim, o cariótipo de *M. reevesi*, com $2n=46$, pode ser reconstruído a partir de 12 fusões em tandem de um cariótipo ancestral com 70 cromossomos, como o de *Mazama gouazoubira* (Yang e col. 1997d). O cariótipo com $2n=6/7$ de *Muntiacus m. vaginalis*, por sua vez, deve ter-se originado a partir de um cariótipo ancestral de *Muntiacus* com número diplóide superior a $2n=46$, uma vez que todos os sinais

de hibridação mostraram que, os cromossomos 1, 2, 3, 4 e 5 da espécie ancestral estariam envolvidos em outros tipos de rearranjos, diferentes de fusões em tandem e cêntricas (Yang e col., 1997b).

Na tentativa de se definir a orientação das fusões que ocorreram entre os segmentos conservados e o mecanismo molecular envolvido nas fusões tandem, Chi e col. (2005) construíram uma biblioteca de cromossomos artificiais (BAC) do muntjac indiano, da qual 223 clones foram mapeados por FISH nos cromossomos do muntjac chinês ($2n=46$) e do muntjac indiano ($2n=6$ e $2n=7$). O mapa de alta resolução estabelecido entre as duas espécies permitiu demonstrar que todas as fusões em tandem que ocorreram durante a evolução do cariótipo do muntjac indiano, a partir de um cariótipo ancestral hipotético com $2n=70$ composto por cromossomos acrocêntricos, são fusões que ocorreram entre centrômero-telômero.

Pela comparação dos cromossomos em espécies de mamíferos, muito pode ser aprendido, não só sobre a evolução cariotípica, mas também sobre os mecanismos envolvidos, seus papéis e contribuições na especiação e sobre alguns fatores genéticos que podem se apresentar distintos entre espécies relacionadas (Ferguson-Smith e Trifonov, 2007).

I. 2. ESTUDOS FILOGENÉTICOS COM SEQUÊNCIAS GÊNICAS E OS ROEDORES AKODONTINOS.

I. 2. 1. *O DNA mitocondrial e os estudos evolutivos*

O DNA mitocondrial (DNAm_t) é uma molécula bastante compacta, consistindo basicamente de sequências codificadoras, com pouco DNA repetitivo, pseudogenes e DNAs espaçadores. É circular, com cerca de 16 a 20 kb, composta por duas cadeias, denominadas cadeia leve (*light chain*) e cadeia pesada (*heavy chain*), de acordo com a densidade em gradiente de cloreto de cério devido à composição de bases (Avisé, 1994).

Em geral, existem cerca de 37 genes no DNAm_t, sendo 22 referentes a RNA transportador, dois a RNA ribossômico e 13 a RNA mensageiro. A região controladora (*D-loop*) é a mais variável, possui cerca de 1 kb e está envolvida na duplicação da cadeia leve e na transcrição de ambas as fitas.

O DNAm_t apresenta herança predominantemente materna, ausência de recombinação, não segregação de alelos, além de taxas de evolução mais rápidas quando comparadas às do

genoma nuclear (cerca de 5 a 10 vezes maior). Tais características o tornam um excelente marcador genético (Avise e col., 1987; Avise, 2000). As mudanças genéticas detectadas nessa molécula são a substituição simples de base, adições/deleções e, em menor número, alterações envolvendo grandes diferenças que são usualmente encontradas na região controladora.

Os primeiros estudos com o DNAm_t utilizavam-se da molécula inteira, havendo necessidade de seu isolamento e digestão com diferentes enzimas de restrição para obtenção de padrões de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Com a introdução das técnicas de sequenciamento e com o advento da PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase), genes específicos da molécula puderam ser mais bem estudados. Entre os genes mitocondriais mais utilizados estão os das subunidades da NADH desidrogenase (ND1, ND2, ND4L, ND4), os dos RNAs transportadores, os dos RNAs ribossomais 12S e 16S, citocromo b e a região controladora (Avise, 1994).

Os dados primários obtidos podem ser convertidos em medidas de distância ou caracteres binários (sítios de restrição) ou multi-estados (nucleotídeos). Matrizes de caracteres podem ser usadas para gerar hipóteses filogenéticas usando métodos de análise como a parcimônia ou máxima verossimilhança (Moritz e col., 1987).

As comparações entre táxons podem ser feitas a partir de sequências que evoluem rapidamente (como a região controladora *D-loop*) ou lentamente (como os RNAs ribossomais). Quanto maior a taxa de mutação do gene, maior variabilidade será observada entre as moléculas de DNA de diferentes organismos e, desse ponto de vista, representa um instrumento extremamente útil para estudos evolutivos entre espécies e grupos de espécies. Por outro lado, em análises envolvendo diferentes gêneros ou níveis taxonômicos mais elevados, é indicada a utilização de genes mais conservados para a comparação (Meyer, 1997). Nesse contexto, estudos com DNAm_t têm fornecido informações valiosas acerca de estrutura populacional, biogeografia, reconstruções filogenéticas e estudos evolutivos em diferentes grupos de vertebrados, com tempos de divergência recentes ou mais antigos (Moritz e col., 1987).

I. 2. 2. *Os roedores akodontinos*

Distribuídos predominantemente na América do Sul, os roedores da subfamília Sigmodontinae (Cricetidae) ocorrem também nas Américas Central e do Norte, e um dos gêneros é endêmico das Ilhas Galápagos (D'Elia, 2003a). Com 74 gêneros e 377 espécies

(Musser e Carleton, 2005) é um dos grupos mais diversos e complexos de mamíferos neotropicais e atualmente, são nove as tribos reconhecidas dentro de Sigmodontinae: Abrotrichini, Akodontini, Ichthyomyini, Oryzomyini, Phyllotini, Reithrodontini, Sigmodontini, Thomasomyini e Wiedomyini (Musser e Carleton, 2005; D'Elía e col., 2007). Existem ainda 11 gêneros que são tidos como Sigmodontinae *incertae sedis*: *Abrawayaomys*, *Andinomys*, *Chinchillula*, *Delomys*, *Euneomys*, *Irenomys*, *Juliomys*, *Neotomys*, *Phaenomys*, *Punomys* e *Wilfremomys* (Smith e Patton 1999; D'Elía 2003b).

Há quase duas décadas, as relações entre táxons de sigmodontíneos começaram a ser estudadas sob abordagem filogenética molecular, principalmente os pertencentes a tribo Akodontini (Patton e Smith 1992; Smith e Patton, 1991, 1993; 1999). A análise de sequências gênicas se mostrou potencialmente capaz de prover valiosas informações sobre as relações entre alguns sigmodontíneos da América do Sul (Bonvicino e Moreira, 2001; D'Elía, 2003b; D'Elía e col., 2003; 2005; Almeida e col., 2007). Inicialmente, a maioria desses estudos fundamentou-se em análises de sequências do gene citocromo *b* do DNA mitocondrial e, atualmente outros tipos de evidências também têm sido exploradas como a utilização de sequenciamento de genes nucleares (Weksler, 2003; D'Elía e col., 2006).

A tribo akodontini representa, com 106 espécies descritas, a segunda maior tribo em número de espécies da subfamília Sigmodontinae (Musser e Carleton, 2005).

Musser e Carleton (2005), dentro da tribo Akodontini, agruparam os gêneros *Abrothrix*, *Akodon*, *Bibimys*, *Blarinomys*, *Bucepattersonius*, *Chelemys*, *Deltamys*, *Geoxus*, *Juscelinomys*, *Kunsia*, *Lenoxus*, *Necomys*, *Notiomys*, *Oxymycterus*, *Pearsonomys*, *Podoxymys*, *Scapteromys*, *Thalpomys* e *Thaptomys*, desses porém *Abrothrix*, *Chelemys*, *Geoxus*, *Notiomys* e *Pearsonomys* foram reconhecidos formalmente por D'Elía e col. (2007) como pertencentes a uma nova tribo, Abrotrichini, sugerida anteriormente por Smith e Patton (1999) com base em análises filogenéticas de sequências do gene citocromo *b*.

Os gêneros *Kunsia*, *Scapteromys* e *Bibimys* foram agrupados na tribo Scapteromyini com base em morfologia de crânio e dentes e em características ecológicas (Massoia, 1979, 1980; Reig, 1980; Pardiñas, 1996). Essa tribo compreende roedores sigmodontíneos que apresentam hábitos semi-aquáticos e fossoriais, que habitam áreas abertas nas regiões, central e sudeste do Brasil, Uruguai e partes da Argentina e Bolívia (Hershkovitz, 1966; Massoia, 1980; Musser e Carleton, 1993; Miranda e col., 1999). No entanto, Smith e Patton (1999), baseados em evidências de caracteres moleculares de sequências do citocromo *b* de

exemplares de *Kunsia*, *Scapteromys*, espécies de Akodontini entre outros roedores sigmodontíneos, questionaram suas relações filogenéticas. D'Elía (2003b) e D'Elía e col. (2005), usando sequências de DNA mitocondrial e nuclear, e desta vez incluindo o gênero *Bibimys* na análise, verificaram que Scapteromyini *sensu* Massoia (1979) não é monofilético e não deveria ser agrupado em outro grupo menos inclusivo do que Akodontini.

I. 2. 3. O exemplo do gênero *Akodon*: citogenética e filogenia molecular

Diferente da maioria dos gêneros que compõe a tribo Akodontini, o gênero *Akodon* Meyen, 1933, é bastante diverso, apresentando atualmente 42 espécies válidas (Musser e Carleton, 2005; Pardiñas e col., 2005) e pelo menos uma ainda não descrita, *Akodon* sp. n. (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998; Silva e col., 2006). Seus representantes se distribuem pela região dos Andes, do Chile até a Venezuela e nas terras baixas da Bolívia, Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil. São abundantes tanto nas florestas Ombrófilas Mistas e Ombrófila Densa da encosta Atlântica como nas florestas Estacionais Deciduais e Semidecidual no leste da América do Sul (Christoff, 1997) e ocorrem também no bioma de Cerrado na região do Brasil Central (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998).

O cariótipo é conhecido em 28 das espécies válidas do gênero e em *Akodon* sp. n.; o número diplóide varia de $2n = 10$ em *Akodon* sp. n. (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998) a $2n = 46$ em *A. serrensis* (Geise e col. 1998; Christoff e col., 2000). Os complementos sempre apresentam um pequeno par autossômico metacêntrico e são descritos diferentes polimorfismos cromossômicos como presença de cromossomos supernumerários, inversões pericêntricas e rearranjos Robertsonianos e em tandem, assim como monossomia de cromossomo X (Bianchi e col., 1971; Kasahara e Yonenaga-Yassuda, 1984; Fagundes e col., 1997a, b, 1998; Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998; Ventura e col., 2006).

A espécie *Akodon cursor* é caracterizada por reunir espécimes morfolologicamente indistinguíveis que apresentam números diplóides distintos com $2n=14$, $2n=15$ e $2n=16$, e a correlação entre complementos cromossômicos e entidades taxonômicas se torna alvo de discórdia entre alguns autores (Maia e Languth, 1981; Rieger e col., 1995; Christoff, 1997, Fagundes e col., 1998; Geise e col., 2001; Silva e col., 2006; Nogueira e Fagundes, 2008).

O cariótipo com $2n=14$ foi inicialmente descrito em exemplares referidos como *Akodon arviculoides cursor* Winge (e. g. *A. cursor*) coletados em três estados brasileiros: Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro (Yonenaga, 1972; Yonenaga e col., 1975; Yonenaga-

Yassuda, 1979; Yonenaga-Yassuda e col., 1983). Em alguns espécimes do estado de São Paulo também foi encontrado um cariótipo heteromórfico para o primeiro par com $2n=15$.

Maia e Langguth (1981) encontraram, em uma população de *Akodon cursor* do estado do Pernambuco, todos os exemplares com cariótipo $2n=16$ e sugeriram que essa população representava um táxon distinto, *A. aff. cursor*. Entretanto, posteriormente, espécimes de *Akodon* com $2n=16$ foram encontrados em simpatria com $2n=14$ e 15 nos estados do Paraná, São Paulo e Bahia (Sbalqueiro e Nascimento, 1996; Fagundes e col., 1998), e no estado da Paraíba (Geise e col., 2001). Assim, foi constatado que o cariótipo tido como exclusivo de Pernambuco apresenta na realidade distribuição mais ampla, confirmando que *A. cursor* está relacionado a uma variabilidade cariotípica muito mais complexa.

Geise e col. (1998) reconheceram citogeneticamente os táxons *A. aff. cursor* ($2n=16$) e *A. cursor* ($2n=14, 15$) como espécies alopátricas de linhagens evolutivas distintas. Porém, Fagundes e col. (1998) discordam da visão desses autores, e consideram que esses cariótipos $2n=14, 15, 16$ são representativos de uma única espécie que apresenta polimorfismo intrapopulacional uma vez que os diferentes complementos ocorrem em simpatria nos estados do Paraná, São Paulo e Bahia (Sbalqueiro e Nascimento, 1996; Fagundes e col., 1998).

Um cariótipo com $2n=10$ foi descrito para exemplares de uma nova espécie de *Akodon* coletada em Vila Rica e Gaúcha do Norte no estado do Mato Grosso no Brasil Central. *Akodon* sp. n. é críptica de *Akodon cursor* e possui distribuição disjunta dos outros complementos apresentados (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998).

Geise e col. (2001) utilizaram sequências do gene mitocondrial citocromo *b* para inferir pela primeira vez as relações filogenéticas entre os diferentes cariótipos de *Akodon cursor*. Neste estudo foram recuperados dois clados: um da região sudeste que agrupou $2n=14, 15$ e seu grupo irmão da região nordeste com exemplares de $2n=16$. Os autores referiram-se a eles como *Akodon cursor* e *A. aff. cursor*, respectivamente. Posteriormente Silva e col. (2006) incluíram sequências de *Akodon* sp. n., $2n=10$ na matriz de dados utilizada por Geise e col. (2001), e a análise filogenética mostrou *Akodon* sp. n. monofilético e grupo irmão do clado com $2n=16$ (*A. aff. cursor*) mais o clado com $2n=14$ e 15 (*Akodon cursor*).

Nogueira e Fagundes (2008) utilizaram fragmentos obtidos a partir de enzimas de restrição para conduzir estudos filogenéticos em *A. cursor*, nos quais os diferentes cariótipos e as regiões de simpatria em que ocorrem na Bahia e em São Paulo foram pela primeira vez amostrados e essas análises não incluíram amostras de *Akodon* sp. n., $2n=10$. Os resultados

levaram as autoras a assumirem que os cariótipos de $2n=14$, 15 e 16 representam uma única espécie polimórfica, *Akodon cursor*, sem estruturação cariotípica.

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas teloméricas evidenciou presença de ITS (sequências teloméricas intersticiais) na região pericentromérica nos maiores cromossomos (ACU 1+3) de *A. cursor*, em heterozigose em $2n=15$ e em homozigose em $2n=14$. Esses dados, associados a análises de bandas G de alta resolução, levaram Fagundes e col. (1997a, b) a interpretar essas ITSs em ACU 1+3 como remanescentes de eventos de inversão pericêntrica seguida de fusão cêntrica dos cromossomos submetacêntricos ACU 1 e ACU 3 da forma com $2n=16$, assumindo mecanismo de redução do número diplóide, de um complemento com $2n=16$ para $2n=15$ e $2n=14$, como responsável pelo polimorfismo de número diplóide encontrado em *Akodon cursor*.

Os dados fornecidos por estudos de citogenética clássica sobre a morfologia dos cromossomos, padrões de bandas, detecção de homologias cromossômicas e ocorrência de rearranjos, permitem a caracterização de cariótipos espécie-específicos, que muitas vezes geram informações imprescindíveis e abrem caminho para estudos de taxonomia de sistemática, e a inferência a respeito da evolução cromossômica em vários grupos de roedores.

A técnica de citogenética molecular de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com o uso de sondas de sequências específicas, como as teloméricas e centroméricas, ou cromossomo-específicas, usadas em pintura cromossômica, têm sido utilizadas em conjunto com a citogenética clássica, na tentativa de se esclarecer os mecanismos ocorridos durante os processos de diferenciação, responsáveis pelo estabelecimento de variantes cromossômicas.

Abordagens de citogenética comparativa e estudos moleculares com gene mitocondrial do citocromo *b*, tanto em *Akodon* quanto em outros grupos de roedores, geralmente permitem a detecção de alta variabilidade intra e interespecíficas, cariotípica ou molecular, revelando a existência de uma diversidade até então desconhecida levando, algumas vezes, ao reconhecimento de entidades ainda sem descrição formal, e ao reagrupamento dos táxons. O crescente interesse na biodiversidade e conservação motiva estudos multidisciplinares que busquem uma caracterização mais detalhada da fauna, especialmente em regiões de intenso endemismo e diversidade de roedores como é o caso do Brasil (Smith e Patton, 1999).

I. 3. OBJETIVOS

1.3.1. Pintura cromossômica em *Akodon*

1. Refinar as análises de comparação cariotípica, através da técnica de pintura cromossômica como uma ferramenta adicional às técnicas de citogenética clássica e molecular por FISH telomérica, já realizadas nas espécies do gênero *Akodon*.

2. Contribuir para melhor compreensão das variantes envolvidas no processo de redução de número diplóide que teria ocorrido durante a diferenciação cromossômica entre as espécies *A. paranaensis*, $2n=44$, *A. montensis*, $2n=24$, *A. cursor*, $2n=14-16$ e *Akodon* sp. n., $2n=10$.

I. 3. 2. Estudos de filogenia molecular e de comparação cromossômica em *Akodon* sp., $2n=40$.

1. Estabelecer, por meio de sequências do gene mitocondrial do citocromo *b*, as relações filogenéticas entre os indivíduos referidos como pertencentes ao gênero *Akodon*, portadores de um cariótipo novo com $2n=40$ e $NF=40$, e outras espécies de *Akodon*, *Deltamys* e gêneros relacionados.

2. Comparar o complemento $2n=40$ com aqueles das espécies que se mostrarem relacionadas.

I. 3. 3. Estudo de filogenia molecular no gênero *Thaptomys*

1. Estabelecer, por meio de sequências do gene mitocondrial do citocromo *b*, as relações filogenéticas entre os indivíduos de *Thaptomys*, que apresentam o $2n=52$ e $NF=52$, e os que apresentam o novo cariótipo com $2n=50$ e $NF=48$, e testar o monofiletismo do gênero.

I. 3. 4. Estudos citogenéticos e de filogenia molecular no gênero *Blarinomys*

1. Desenvolver estudos citogenéticos em indivíduos de diferentes localidades do Brasil, avaliando o grau de variabilidade cariotípica dos espécimes, comparando os cariótipos com o único descrito na literatura.

2. Caracterizar a amostra por meio das técnicas de coloração convencional, de bandamento cromossômico e análises das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs),

estabelecendo os números diplóides e homologias cromossômicas.

3. Aplicar técnica de citogenética molecular, como hibridação *in situ* fluorescente com sondas teloméricas, com o intuito de tentar esclarecer possíveis rearranjos cromossômico, para uma melhor compreensão da diferenciação cromossômica do gênero.

4. Estabelecer, por meio de sequências do gene mitocondrial do citocromo *b*, as relações filogenéticas entre os indivíduos amostrados e testar o monofiletismo do gênero.

I. 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C. A. S., C. R. BONVICINO, E P. CORDEIRO-ESTRELA 2007. Phylogeny and temporal diversification of *Calomys* (Rodentia, Sigmodontinae): implications for the biogeography of an endemic genus of the open/dry biomes of South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 449-466.
- AO L., X. GU, Q. FENG, J. WANG, P. C. M. O'BRIEN, B. FU, X. MAO, W. SU, Y. WANG, M. VOLLETH, F. YANG, E. W. NIE. 2006. Karyotype relationships of six bat species (Chiroptera, Vespertilionidae) from China revealed by chromosome painting and G-banding comparison. *Cytogenetic and Genome Research*. 15:145-153.
- AVISE, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Pp. 511. Chapman and Hall. New York.
- AVISE, J. C. 2000. Philogeography: the history and formation of species. Pp. 447 Harvard University. Cambridge and London.
- AVISE J. C., J. ARNOLD, R. M. BALL, E. BERMINGHAM, T. LAMB, J. E. NEIGEL, C. A. REEB, E N. C. SAUNDERS 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review in Ecology Systematics* 18: 489-522.
- BALMUS G., V. A. TRIFONOV, L. S. BILTUEVA, P. C. M. O'BRIEN, E. S. ALKALAEVA, B. FU, J. A. SKIDMORE, T. ALLEN, A. S. GRAPHODATSKY, F. YANG, E M. A. FERGUSON-SMITH. 2007. Cross-species chromosome painting among camel, cattle, pig and human: further insights into the putative Cetartiodactyla ancestral karyotype. *Chromosome Research*. 15:499-515.
- BIANCHI, N. O., O. A.; REIG, O. J. MOLINA, F. N DULOUT 1971. Cytogenetics of south american akodont rodents (Cricetidae). I. A progress report of Argentinan and Venezuelan forms. *Evolution*, 25: 724-736.
- BONVICINO, C. R., E M. A. M. MOREIRA, 2001 Molecular phylogeny of the genus *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) based on cytochrome b DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 18: 282-292.
- BURKIN, D. J., P. C. M. O'BRIEN, T. E. BROAD, D. F. HILL, C. A. JONES, J. WIENBERG, E M. A. FERGUSON-SMITH. 1997. Isolation of chromosome-specific paints from high resolution flow karyotypes of the sheep (*Ovis aries*). *Chromosome Research*. 5:102-108.
- CHI, J. X., L. HUANG, W. NIE, J. WANG, B. SU, E F. YANG 2005. Defining the orientation of the tandem fusions that occurred during the evolution of Indian muntjac chromosomes by BAC mapping. *Chromosoma* 114: 167-172.
- CHRISTOFF, A. U. 1997. Contribuição à sistemática das espécies do gênero *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) do leste do Brasil: estudos anatômicos, citogenéticos e de distribuição geográfica.

PhD Thesis. Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- CHRISTOFF, A. U., V. FAGUNDES, I. J. SBALQUEIRO, M. S. MATTEVI, E Y. YONENAGA-YASSUDA. 2000. Description of a new species of *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) from Southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 81 (3):838-851.
- CREMER T., P. LICHTER, J. BORDEN, D. C. WARD, E L. MANUELIDIS 1988. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Human Genetics* 80: 235-246.
- D'ELIA, G. 2003a. Rats, mice, and relatives IV. South American rats and mice (Sigmodontinae). Pp263-279 in Grzimek's Animal Life Encyclopedia (M. Hutchins, D.G. Kleiman, V. Geist, e M.C. McDade, eds), 2nd edition. Volumes 12-16, Mammals I-V Gale Group. Farmington Hills.
- D'ELIA, G. 2003b. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics* 19:307-323.
- D'ELIA, G., E. M. GONZALES, E U. F. J. PARDIÑAS. 2003. Phylogenetic analyses of sigmodontine rodents (Muroidea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. *Mammalian Biology* 68:351-364.
- D'ELIA G., U. F. J. PARDIÑAS, E P. MYERS. 2005. An introduction to the genus *Bibimys* (Rodentia: Sigmodontinae): phylogenetic position and alpha taxonomy. Pp 211-246 in: *Mammalian Diversification: From Chromosomes to Phylogeography* (Lacey E. e P. Myers, eds). University of California Publications in Zoology, Berkeley.
- D'ELIA G., L. LUNA, E. M. GONZÁLES, E B. D. PATTERSON. 2006. On the Sigmodontinae radiation (Rodentia, Cricetidae): An appraisal of the phylogenetic position of *Rhagomys*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:558-564.
- D'ELÍA, G, U. F. J. PARDIÑAS, P. TETA, E J. L. PATTON. 2007. Definition and diagnosis of a new tribe of sigmodontine rodents (Cricetidae, Sigmodontinae), and a revised classification of the subfamily. *Gayana*. 7: 187-194.
- DOBIGNY G., J. F. DUCROZ, T. J. ROBINSON, E V. VOLOBOUEV 2004. Cytogenetics and cladistics. *Systematic Biology*. 53:470-484.
- DOBIGNY, G., E F. YANG 2008. Comparative cytogenetics in the genomics era: cytogenomics comes of age. *Chromosome Research*. 16:1-4
- FAGUNDES, V., A. M. VIANNA-MORGANTE, E Y. YONENAGA-YASSUDA. 1997a. Telomeric sequences localization ang G-banding patterns in the identification of a polymorphic chromosomal rearrangementvin the rodent *Akodon cursor* (2n=14, 15 and 16). *Chromosome Research* 5:228-232.

- FAGUNDES, V., J. M. SCALZI-MARTIN, K. SIMS, J. HOZIER, E Y. YONENAGA-YASSUDA. 1997b. ZOO-FISH of a microdissection DNA library and between the Brazilian rodents *Akodon cursor* and *A. montensis*. Cytogenetics and Cell Genetics 78:224-228.
- FAGUNDES, V., A. U. CHRISTOFF, E Y. YONENAGA-YASSUDA. 1998. Extraordinary chromosomal polymorphism with 28 different karyotypes in the neotropical species *Akodon cursor* (Muridae, Sigmodontinae), one of the smallest number in rodents (2n=16, 15 and 14). Hereditas: 129:263-247.
- FERGUSON-SMITH M. A., F. YANG, E P. C. M. O'BRIEN. 1998. Comparative mapping using chromosome sorting and painting. ILAR Journal. 39: 68-76.
- FERGUSON-SMITH M. A. E V. TRIFONOV. 2007. Mammalian karyotype evolution. Nature Genetics. 8:950-962.
- FRÖENICKE, L. 2005. Origins of primate chromosomes as delineated by Zoo-FISH and alignments of human and mouse draft genome sequences. Cytogenetic and Genome Research. 108: 122Y138.
- GARTLER, S. M. 2006. The chromosome number in humans: a brief history. Nature Review Genetics 7: 655-660.
- GEISE, L., F. C. CANAVEZ, E H. N. SEUÁNEZ. 1998. Comparative karyology in *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) from Southwestern Brazil. Journal of Heredity 89:158-163.
- GEISE, L., M. F. SMITH, E J. L. PATTON. 2001. Diversification of genus *Akodon* (Rodentia:Sigmodontinae) in southeastern South America: mihocondrial dna sequence analysis. Journal of Mammalogy 82 (1):92-101.
- GRAPHODATSKY, A. S., F. YANG, G. DOBIGNY, S. A. ROMANENKO, L. S. BILTUEVA, P. L. PERELMAN, V. R. BEKLEMISHEVA, E. Z. ALKALAEVA, N. A. SERDUKOVA, M. A. FERGUSON-SMITH, W. J. MURPHY, E T. J. ROBINSON 2008. Tracking genome organization in rodents by Zoo-FISH. Chromosome Research. 16:261-274
- HERSKOVITZ P. 1966. South American swamp and fossorial rats of the scapteromyine group (Cricetinae, Muridae) with comments on the glans penis in murid taxonomy. Zeitschrift für Säugetierkunde 31:81-149.
- JAUCH A., J. WIENBERG, R. STANYON, N. ARNOLD, S. TOFANELLI, T. ISHIDA, E T. CREMER. 1992. Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 89:8611-8615.
- KASAHARA S., E Y. YONENAGA-YASSUDA. 1984. A progress report of cytogenetic data on Brazilian rodents. Revista Brasileira de Genetica 63: 156-159.
- KOEHLER U., F. BIGONI, J. WIENBERG, E R. STANYON. 1995. Genomic reorganisation in the concolor gibbon (*Hylobates concolor*) revealed by chromosome painting. Genomics 30:287-292.

- LANGFORD, C. F., H. TELENUS, N. G. MILLER, P. D. THOMSEN, E D. M. TUCKER. 1993. Preparation of chromosome-specific paints and complete assignment of chromosomes in the pig flow karyotype. *Animal Genetics* 24:261-267.
- LANGFORD, C. F., P. E. FISCHER, M. M. BINNS, N. G. HOLMES, E N. P. CARTER. 1996. Chromosome-specific paints from a high resolution flow karyotype of the dog. *Chromosome Research* 4: 1 15-123.
- LI, T., P. C. M. O'BRIEN, L. BILTUEVA, B. FU, J. WANG, W. NIE, M. A. FERGUSON-SMITH, A. S. GRAPHODATSKY, E F. YANG. 2004. Evolution of genome organizations of squirrels (Sciuridae) revealed by cross-species chromosome painting. *Chromosome Research*. 12:317-35.
- MAIA, V., E A. LANGGUTH. 1981. New karyotypes of Brazilian Akodont with notes on taxonomy. *Journal of Mammalogy* 46:241-249.
- MASSOIA, E. 1979. Descripción de un género y especie nuevos: *Bibimys torresi* (Mammalia - Rodentia - Cricetidae - Sigmodontinae - Scapteromyini). *Physis* 38:1-7.
- MASSOIA, E. 1980. El estado sistemático de cuatro especies de cricétidos sudamericanos y comentarios sobre otras especies congénéricas (Mammalia-Rodentia). *Ameghiniana* 17:280-287.
- MELTZER, P. S., X. Y. GUAN, A. BURGESS, E J. M. TRENT. 1992. Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nature Genetics* 1:24-28.
- MILAN, D., J. RIQUET, M. YERLE, A. GOUREAU, A. SCHMITZ, E. P. CRIBIU, G. FRELAT, E J. GELLIN. 1996. Homologous and heterologous FISH painting with PARM-PCR chromosome-specific probes in mammals. *Mamm. Genome* 7: 194 199.
- MIRANDA, J. A., A. P. NUNES, L. F. B. OLIVEIRA, E M. S. MATTEVI. 1999. The karyotype of the South American rodent *Kunsia tomentosus* (Lichtenstein, 1830). *Cytobios* 98:137-147.
- MORITZ, C., T. DOWLING, E W. M. BROWN. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review in Ecology Systematics* 18: 269-292.
- MULLER, S., P. C. M. O'BRIEN, M. A. FERGUSON-SMITH, E J. WIENBERG 1997. Reciprocal chromosome painting between human and prosimians (*Eulemur macaco macaco* and *E. fulvus mayottensis*). *Cytogenetic Cell Genetics*. 78:260-271.
- MURPHY, W. J., D. M. LARKIN, E A. EVERTS-VAN-DER WIND. 2005. Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. *Science* 309: 613–617.
- MUSSER, G. G., E M. D. CARLETON. 1993. Family Muridae. Pp. 501-755 in *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.). 2nd ed. Smithsonian Institution Press, Washington DC and London.

- MUSSER, G. G., E M. D. CARLETON. 2005. Superfamily Muroidea. Pp. 894–1531 in *Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference* (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.). 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- NEITZEL, H. 1987. Chromosome evolution of Cervidae: karyotype and molecular aspects. Pp 90-112 in *Cytogenetics - basic and applied aspects* (Obe G e A Basler eds.). Springer, Berlin, Heidelberg,.
- NOGUEIRA, C. D. A., E V. FAGUNDES. 2008. *Akodon cursor* Winge, 1887 (Rodentia: Sigmodontinae): one or two species? New evidences based on molecular data. *Zootaxa* 1768:41-51.
- O'BRIEN S. J., M. MENOTTI-RAYMOND, W. J. MURPHY, W. G. NASH, J. WIENBERG, R. STANYON, N. G. COPELAND, N. A. JENKINS, J. E. WOMACK, E J. A. M. GRAVES 1999. The promise of comparative genomics in mammals. *Science* 286: 458-481.
- PATTON, J. L., E M. F. SMITH. 1992. mtDNA phylogeny of Andean mice: a test of diversification across ecological gradients. *Evolution* 46:174-183
- PARDIÑAS, U. F. J. 1996. El registro fósil de *Bibimys* Massoia, 1979 (Rodentia). Consideraciones sobre los Scapteromyini (Cricetidae, Sigmodontinae) y su distribución durante el Plioceno-Holoceno en la región pampeana. *Mastozoología Neotropical* 3:15-38.
- PARDIÑAS, U. F. J., G. D'ELIA, S. CIRIGNOLI, E P. SUAREZ. 2005. A new species of *Akodon* (Rodentia, Cricetidae) from the northern campos grassland of Argentina. *Journal of Mammalogy* 86 (3):462–474.
- PIECZARKA, J. C., C. Y. NAGAMACHI, P. C. M. O'BRIEN, F. YANG, W. RENS, R. M. S. BARROS, R. C. R. NORONHA, J. RISSINO, E. H. C. DE OLIVEIRA, E M. A. FERGUSON-SMITH. 2005. Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). *Chromosome Research*. 13:339-347.
- PINKEL, D., J. LANDEGENT, C. COLLINS, J. FUSCOE, R. SEAGRAVES, J. LUCAS, E J. GRAY. 1988. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85:9138-9142.
- RABBITS P., H. IMPEY, A. HEPPELL-PARTON, C. LANGFORD, C. TEASE, N. LOWE, D. BAILEY, M. A. FERGUSON-SMITH, E N. CARTER. 1995. Chromosome-specific paints from a high resolution flow karyotype of the mouse. *Nature Genetics* 9:369-375.
- RAUDSEPP, T., L. FRONICKE, H. SCHERTAN, L. GUSTAVSSON, E B. P. CHOWDHARY. 1996. ZOO-FISH delineates conserved segments in horse and man. *Chromosome Researche* 4:218-225.
- REIG, O. A. 1980. A new fossil genus of South American cricetid rodents allied to *Wiedomys*, with an assessment of the Sigmodontinae. *Journal of Zoology* 192:257-281.

- RIEGER, T. T., A. LANGGUTH, E T. A. WAIMER. 1995. Allozymic characterization and evolutionary relationships in the Brazilian *Akodon cursor* species group (Rodentia – Cricetidae). *Biochemical Genetics* 33:283-295.
- RETTENBERGER, G., C. KLETT, U. ZECHNER, J. KUNZ, W. VOGEL, E H. HAMEISTER. 1995. Visualization of the conservation of synteny between humans and pigs by heterologous chromosomal painting. *Genomics* 26:372-378.
- SBALQUEIRO, I. J., E A. P. NASCIMENTO. 1996. Occurrence of *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae) with 14, 15 and 16 chromosome cytotypes in the same geographic area in South Brazil. *Brazilian Journal of Genetics* 19 (4):565-569.
- SCHERTHAN, H., T. CREMER, U. ARNASON, H.-U. WEIER, A. LIMA-DE-FARIA, E L. FRONICKE. 1994. Comparative chromosome painting discloses homologous segments in distantly related mammals. *Nature Genetics* 6:342-347.
- SILVA, M. J. J., E Y. YONENAGA-YASSUDA. 1998. Karyotype and chromosomal polymorphism of an undescribed *Akodon* from Central Brazil, a species with the lowest known diploid chromosome number in rodents. *Cytogenetic and Cell Genetic* 81:46-50.
- SILVA, M. J. J., J. L. PATTON, E Y. YONENAGA-YASSUDA. 2006. Phylogenetic relationships and karyotype evolution in the sigmodontine rodent *Akodon* with (2n=10 and 2n=16) from Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 29 (3):469-474.
- SMITH, M. F., E. J. L. PATTON. 1991. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Molecular Biology and Evolution*. 8:85-103.
- SMITH, M. F., E J. L. PATTON 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontini tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50: 149-177.
- SMITH, M. F., E J. L. PATTON. 1999. Phylogenetic Relationships and the Radiation of Sigmodontine Rodents in South America: Evidence from Cytochromo b. *Journal of Mammalian Evolution* 6(2): 89-128.
- SOLINAS-TOLDO, S., C. LENGAUER, E R. FRIES. 1995. Comparative genome map of human and cattle. *Genomics* 27: 489-496.
- SPEICHER, M. R., E N. P. CARTER. 2005. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Review Genetic*. 6: 782-792.
- STANYON R., F. YANG, E P. CAVAGNA. 1999. Reciprocal chromosome painting shows that genomic rearrangement between rat and mouse proceeds ten times faster than between human and cats. *Cytogenetic and Cell Genetic*. 84: 150-155.

- STANYON, R., S. CONSIGLIERI, F. BIGONI, M. A. FERGUSON-SMITH, P. C. M. O'BRIAN, E. J. WIENBERG. 2001. Reciprocal chromosome painting between a New World primate, the woolly monkey, and humans. *Chromosome Research* 9: 97-106.
- TELENIUS, H., A. PELMEAR, E. A. TUNNACLIFFE. 1992. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 4: 257-263.
- TODER, R., J. WIENBERG, L. VOULLAIRE, P. C. M. O'BRIEN, P. MACCARONE, E. J. A. MARSHALL GRAVES. 1997. Shared DNA sequences between X and Y chromosomes in the tammar wallaby - Evidence for independent additions to eutherian and marsupial chromosomes. *Chromosoma* 106:94-98.
- TRASK, B. J. 2002. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nature Review Genetics* 3: 769-778.
- TRIFONOV, V., F. YANG, M. A. FERGUSON-SMITH, E. T. J. ROBINSON. 2003. Cross-species chromosome painting in the Perissodactyla: delimitation of homologous regions in Burchell's zebra (*Equus burchellii*) and the white (*Ceratotherium simum*) and black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Cytogenetic and Genome Research*. 103:104-110.
- VENTURA K., M. J. J. SILVA, V. FAGUNDES, U. A. CHRISTOFF, E. Y. YONENAGA-YASSUDA. 2006. Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG)_n arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). *Cytogenetics and Genome Research* 115 (2): 169-175.
- WEKSLER, M. 2003. Phylogeny of Neotropical oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae) based on the nuclear IRBP exon. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 331-349.
- WIENBERG, J., A. JAUCH, R. STANYON, E. T. CREMER. 1990. Molecular cytotaxonomy of primates by chromosomal *in situ* suppression hybridization. *Genomics* 8:347-350.
- WILSON, D. E., E. D. M. REEDER. (EDS.). 2005. *Mammal species of the world*. 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. Pp 2000.
- WURSTER, D. H., E. K. BENIRSCHKE. 1967. Chromosome studies in some deer, the springbok and the pronghorn, with notes on placentation in deer. *Cytologia*. 32: 273-285.
- WURSTER, D. H., E. K. BENIRSCHKE. 1970. Indian muntjac, *Muntiacus muntjak*: A deer with a low diploid chromosome number. *Science* 168:1364-1366.
- YANG, F., N. P. CARTER, L. SHI, E. M. A. FERGUSON-SMITH. 1995. A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma* 103:642-652.
- YANG, F., S. MULLER, R. JUST, M. A. FERGUSON-SMITH, E. J. WIENBERG. 1997a. Comparative chromosome painting in mammals: Human and the Indian muntjac (*Muntiacus muntjak vaginalis*). *Genomics*. 39:396-401.

- YANG, F., P. C. M. O'BRIEN, J. WIENBERG, E M. A. FERGUSON-SMITH. 1997b. A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in the Indian muntjac using chromosome painting. *Chromosome Research*. 5:109-117.
- YANG, F., P. C. M. O'BRIEN, J. WIENBERG, E M. A. FERGUSON-SMITH. 1997c. Evolution of the black muntjac (*Muntiacus crinifrons*) karyotype revealed by comparative chromosome painting. *Cytogenet and Cell Genetics*. 76:159-163.
- YANG, F., P. C. M. O'BRIEN, J. WIENBERG, H. NEITZEL, C. C. LIN, M. A. FERGUSON-SMITH. 1997d. Chromosome evolution of the Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*). *Chromosoma*. 106:37-43.
- YANG, F., P. M. C. O'BRIEN, B. S. MILNE, A. S. GRAPHODATSKY, N. SOLANKY, V. TRIFONOV, W. RENS, D. SARGAN, E M. A. FERGUSON-SMITH. 1999. A complete comparative chromosome map of the dog, red fox, and humans and its integration with canine genetic maps. *Genomics* 62: 189-202.
- YANG, F., A. S. GRAPHODATSKY, P. M. C. O'BRIEN, A. COLABELLA, N. SOLANKY, M. SQUIRE, D. SARGAN, E M. A. FERGUSON-SMITH. 2000. Reciprocal chromosome painting illuminates the history of genome evolution of the domestic cat, dog, and human. *Chromosome Research* 8: 393-404.
- YANG, F., E. Z. ALKALAEVA, P. L. PERELMAN, A. T. PARDINI, W. R. HARRISON, P. C. M. O'BRIEN, B. FU, A. S. GRAPHODATSKY, M. A. FERGUSON-SMITH, E. T. J. ROBINSON. 2003. Reciprocal chromosome painting among human, armadillo, and elephant (superorder Afrotheria) reveals the likely eutherian ancestral karyotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 100:1062-1066.
- YONENAGA, Y. 1972. Chromosomal polymorphism in the rodent *Akodon arviculoides* ssp. (2n=14) resulting from two pericentric inversions. *Cytogenetics* 11: 448-499.
- YONENAGA, Y., S. KASAHARA, E. J. C. ALMEIDA, E A. L. PERACCHI. 1975. Chromosomal banding patterns in *Akodon arviculoides* (2n=14), *Akodon* sp. (2n=24 and 25), and two male hybrids with 19 chromosomes. *Cytogenetic and Cell Genetics* 15:388-399.
- YONENAGA-YASSUDA, Y. 1979. New karyotypes and somatic and germ-cell banding in *Akodon arviculoides* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenetic and Cell Genetic* 23:241-249.
- YONENAGA-YASSUDA, Y., M. F. L. ASSIS, S. KASAHARA, M. L. L'ABATE, AND M. J. SOUZA. 1983. Nucleolar organizer regions in *Akodon arviculoides* (Cricetidae, Rodentia): evidence for activity of rDNA genes in both X chromosomes of females. *Cytogenetic and Cell Genetics* 35:143-147.

I. MATERIAL E MÉTODOS

II. 1. AMOSTRA

Os gêneros akodontinos enfocados no atual trabalho foram *Akodon*, *Blarinomys*, *Deltamys* e *Thaptomys* (Fig. 1).

Foram obtidas culturas de fibroblastos e conjuntos completos de sondas cromossomo-específicas, por citometria de fluxo, das espécies *A. paranaensis*, $2n=44$, *A. montensis*, $2n=24$, *A. cursor*, $2n=15$ e $2n=15$ e *Akodon* sp. n., $2n=10$. As culturas de fibroblastos das espécies do gênero *Akodon* utilizadas no presente trabalho, para obtenção das sondas cromossomo-específicas, foram estabelecidas a partir de biópsia no Laboratório de Citogenética de Vertebrados IB-USP e fazem parte do Banco de Células de Vertebrados mantido por esse laboratório e a citometria de fluxo e a pintura cromossômica foram realizadas no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Cambridge, Inglaterra.

O restante do material utilizado para o desenvolvimento do atual trabalho foi reunido a partir da colaboração estabelecida, em várias campanhas de coleta, entre o grupo do Laboratório de Citogenética de Vertebrados e grupos de campanha coordenados pelo Dr. Miguel Trefaut Rodrigues, Dra. Sandra Favorito e outros colaboradores, e está discriminado na Tabela 1.

Foram analisados os cariótipos de 5 indivíduos de *Blarinomys* e extraídas amostras de DNA de 40 indivíduos akodontinos, a partir das quais, foram amplificadas as sequências do gene mitocondrial do citocromo *b*. As sequências acessadas dos arquivos do GenBank estão listadas na Tabela 2.

A amostra utilizada em todo o trabalho é composta por representantes dos gêneros akodontinos *Akodon*, *Blarinomys*, *Brucepatersonius*, *Deltamys*, *Necomys*, *Scapteromys*, *Thalpomys* e *Thaptomys* e duas espécies de dois gêneros da tribo Oryzomyini, *Euryoryzomys* e *Oecomys*, totalizando 64 exemplares (Tabelas 1 e 2).

Figura 1. Fotos de exemplares de espécies pertencentes aos quatro gêneros de akodontinos enfocados no atual estudo. (A) *Akodon montenis*. (B) *Blarinomys breviceps*. (C) *Deltamys kemp*i. (D) *Thaptomys nigita*. A, B e D extraídos de Bonvicino e col., 2008. C extraído de Villafañe e col. 2005.

Tabela 1. Gênero, espécie, número de identificação, localidade e estado de procedência (UF), coordenadas e número diplóide (2n) dos exemplares sequenciados no presente estudo.

Gênero	espécie	Identificação	Localidade	UF	Coordenadas	2n
<i>Akodon</i>	<i>lindberghi</i>	CIT 1538	Juiz de Fora	MG	21°45'S; 43°21'W	42
<i>Akodon</i>	<i>serrensis</i>	CIT 358	Piraquara	PR	25°26'S; 25° 26'W	46
<i>Akodon</i>	sp.	CIT 945	Esmeralda	RS	28°03'S; 51°11'W	40
		CIT 946				40
		CIT 944				40
		CIT 947				40
<i>Akodon</i>	sp. n	CIT 0743	Vila Rica	MT	10°00'S; 51°06'W	10
<i>Blarinomys</i>	<i>breviceps</i>	ST 191	Jussari	BA	15°19'S; 39°49'W	Cap. VI
		MTR 13511	Trancoso	BA	16°58'S; 39°10'W	ND
		MTR 12313	Linhares	ES	19°39'S; 40°07'W	ND
		MTR 11577	PARNA Caparaó	ES	20°28'S; 41°44'W	ND
		MTR 10772	PARNA Caparaó	MG	20°25'S; 41°50'W	ND
		UNIBAN3290	PE Serra da Cantareira	SP	23°70'S; 46°63'W	Cap. VI
		IT-M0022	São Bernardo do Campo	SP	23°69'S; 46°56'W	Cap. VI
		M322				Cap. VI
		M333				ND
		CIT 2139	Biritiba Mirim	SP	23°57'S; 46°03'W	ND
		ROD 66	Natividade da Serra	SP	23°19'S; 45°05'W	Cap. VI
<i>Brucepattersonius</i>	sp.	CIT 1343	Itá	RS	27°17'S; 52°19'W	52
<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	AC 876	Tapes	RS	30°40'; 51°23'W	ND
		No. 1	Arroio Grande	RS	32°14'S; 53°05'W	ND
		FP 105				ND
<i>Thaptomys</i>	<i>nigrita</i>	II - M078	Ortigueira	PR	24°12'S; 50° 56'W	52
		II - M082				52
		MII 077				52
		LGA 116	Santa Teresa	ES	19° 56'S; 40°36'W	52
		LGA 117				52
		LGA 956	Domingos Martins	ES	20° 21'S; 40°39'W	52
		LGA 977				52
		LGA 974				52
		UNIBAN 2132	Biritiba Mirim	SP	23° 57'S; 46°03'W	52
		UNIBAN 2031				52
		CIT 1667	S. Bernardo do Campo	SP	23° 69'S; 46°56'W	52
		CIT 1133	Pilar do Sul	SP		52
		CIT 1034				52
		CIT 175	Iguape	SP	24°42'S; 47°33'W	52
		CIT 323				52
<i>Thaptomys</i>	sp.	CIT 904	Una	BA	15°29'S; 39°07'W	50
		CIT 935				50
		CIT 913				50

Nota: Cap. VI= apresentado no capítulo VI; ND = não disponível.

Tabela 2. Gênero, espécies a que pertencem as sequências acessadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O número de acesso, assim como sua referência estão listados.

Gênero	espécie	Número GeneBank	Referência
<i>Akodon</i>	<i>albiventer</i>	AY494838	Smith e Patton, 1999
<i>Akodon</i>	<i>cursor</i>	AF184051	Geise e col. 2001
<i>Akodon</i>	<i>mimus</i>	M35710	Smith e Patton, 1991
<i>Akodon</i>	<i>molis</i>	U03546	Smith e Patton, 1993
<i>Akodon.</i>	<i>montensis</i>	AF184055	Geise e col. 2001
<i>Akodon</i>	<i>mystax</i>	AF184054	Geise e col. 2001
<i>Akodon</i>	<i>paranaensis</i>	AY195866	D'Elia e col., 2003
<i>Akodon</i>	<i>reigi</i>	AY195865	D'Elia e col., 2003
<i>Akodon.</i>	<i>serrensis</i>	AF184058 AY273908	Geise e col. 2001 D'Elia, 2003
<i>Akodon</i>	<i>siberiae</i>	AY273909	D'Elia, 2003
<i>Akodon</i>	<i>torques</i>	M35700	Smith e Patton, 1991
<i>Blarinomys</i>	<i>breviceps</i>	AF108668	Smith e Patton, 1999
<i>Bucepattersonius</i>	<i>iheringi</i>	AF108667	Smith e Patton, 1999
<i>Bucepattersonius</i>	<i>soricinus</i>	AY277486	D'Elia, 2003
<i>Deltamys</i>	<i>kempi kempi</i>	AY195860	D'Elia e col., 2003
<i>Deltamys.</i>	<i>kempi langguth</i>	AY195862	D'Elia e col., 2003
<i>Euryoryzomys</i> *	<i>russatus</i>	AF181272	Bonvicino e Moreira, 2001
<i>Necomys</i> **	<i>urichi</i>	AY273919	D'Elia, 2003
<i>Oecomys</i>	<i>bicolor</i>	AF108699	Smith e Patton, 1999
<i>Scapteromys</i>	<i>aquaticus</i>	AY445550	D'Elia e Pardiñas, 2004
<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	AY445552	D'Elia e Pardiñas, 2004
<i>Thalpomys</i>	<i>cerradensis</i>	AY273915 AY273916	D'Elia, 2003 D'Elia, 2003

Nota: * referido como *Oryzomys*. ** referido como *Bolomys*.

II. 2. CULTURA DE FIBROBLASTOS

II. 2. 1. Obtenção de biópsia

1. Anestesiado o animal com éter e iniciar a assepsia da extremidade da região (cauda, orelha ou pele), utilizando algodões embebidos com acetona, álcool etílico 70%, éter e Merfene (solução desinfetante contendo 0,05g de borato de fenilmercúrio, 50 ml de etanol a 95% e 100 ml de água deionizada). Repetir esta operação sucessivas vezes até que os algodões utilizados fiquem completamente limpos.
2. No caso de biópsia de cauda, amarrá-la com um pedaço de linha acima do local onde será cortada para evitar sangramento. Cortar a extremidade com tesoura e

pinça esterilizadas. Após a biópsia, passar mercúrio-chromo na região cortada da cauda do animal, a fim de evitar posteriores infecções.

3. Colocar o tecido cortado em um frasco contendo 5 ml de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), acrescido de 20% de soro bovino fetal e 50 µg/ml de neomicina.
4. Manter na geladeira a 4°C.

II. 2. 2. *Plantio da Cultura*

1. Após o procedimento anterior, cortar a biópsia em fragmentos com cerca de 1 mm³ em uma placa de Petri estéril contendo 5 ml de meio de cultura completo (DMEM com 20% de soro bovino fetal e 50 µg de neomicina). Esta etapa deve ser realizada com tesoura e pinça esterilizadas.
2. Umedecer uma das paredes de um frasco plástico de cultura com capacidade de 25 cm², com soro bovino fetal.
3. Transferir os fragmentos da placa de Petri para o frasco de cultura, depositando-os sobre a parede já umedecida com o soro bovino fetal.
4. Na parede oposta do frasco, adicionar 2 ml de meio (DMEM) completo e deixá-lo em repouso nesta posição durante 15 a 20 minutos em estufa a 37°C.
5. Virar o frasco cuidadosamente, de modo que os fragmentos entrem em contato com o meio de cultura, e deixá-lo na estufa a 37°C por 3 dias.
6. Quando as células começarem a proliferar, adicionar mais 3 ml de meio de cultura. Durante esta etapa do procedimento é necessário que se faça um controle diário do pH do meio para que permaneça entre 7,4 e 7,6. Em caso de muita acidez (solução com coloração amarelada), deve-se adicionar algumas gotas de bicarbonato de sódio (NaHCO₂) a 2,8%. Ao contrário, se a solução apresentar-se alcalina (coloração avermelhada), utilizar HEPES 2,5% (N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-ácido etanossulfônico). Além disso, dependendo do crescimento celular, deve-se trocar o meio de cultura para retirada dos produtos tóxicos e reposição de nutrientes. À medida que a proliferação celular ocorrer, toda a superfície do frasco de cultura ficará coberta pelas células, formando uma

monocamada. Quando este estágio for atingido, as células sofrerão inibição por contato e o processo de divisão será interrompido. Neste instante deve-se proceder a tripsinização para repicagem das células.

II. 2. 3. *Trypsinização*

1. Desprezar o meio de cultura e adicionar 2 ml de solução de Hanks sem Ca^{++} e Mg^{++} . Deixar em repouso por 2 a 5 minutos e, logo a seguir, desprezar o sobrenadante.
2. Colocar no frasco de cultura cerca de 3 ml de uma solução já preparada contendo 0,125g de tripsina; 0,02g de EDTA (Etileno Diamino Ácido Tetracético) e 1 ml de vermelho de fenol 0,1% (um indicador de pH) em 100 ml de solução de Hanks sem Ca^{++} e Mg^{++} . Observar ao microscópio invertido. Quando as células começarem a ficar arredondadas, desprezar imediatamente o sobrenadante.
3. Adicionar 3 ml de meio completo (DMEM com 20% de soro bovino fetal) e bater uma vez com impacto nas paredes laterais do frasco para que as células se desprendam da sua superfície. Observar o processo ao microscópio invertido.
4. Transferir metade do material para outro frasco de cultura e completar com meio de cultura completo (DMEM com 20% de soro bovino fetal e 50 μg de neomicina) até 5 ml.
5. Manter ambos os frascos em estufa a 37°C. Após novo crescimento celular, pode-se colher o material para análise cromossômica ou congelá-lo em nitrogênio líquido para manutenção das células.

II. 3. ISOLAMENTO DOS CROMOSSOMOS (*CHROMOSOME SORTING*)

II. 3. 1. *Preparação da cultura*

1. Adicionar 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de colcemide (Gibco) às garrafas de cultura.
2. Incubar a 37°C por 5h.
3. Agitar e centrifugar as células mitóticas 400g for 5 min.

4. Ressuspender o pellet em tampão hipotônico para que entumeçam por 15 min em temperatura ambiente.
5. Centrifugar novamente a 400g for 5 min.
6. Ressuspender o pellet em 500 µl de tampão de poliamina e incubar em gelo por 10 min. A suspensão é levada ao vórtex por 10 – 15 s para que os cromossomos sejam soltos.
7. Corar os cromossomos com 40 µl/ml de Cromomicina A3, 2mM MgSO₄ e 2 µl/ml de *Hoeschst* 33258, incubados por, no mínimo, 2 horas.
8. Adicionar, dez minutos antes da análise de fluxo, sulfito de sódio e citrato de sódio numa concentração final de 10 e 25 mM, respectivamente.

II. 3. 2. *Citometria de fluxo*

A citometria é realizada em citômetro de fluxo (dual-laser cell sorter Mo-Flow system). Cerca de 400 cromossomos são separados para cada pico registrado pela citometria diretamente em tubos independentes de 500 µl para PCR, contendo 30µl de água destilada. São estocados a -20°C.

II. 4. PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS

II. 4. 1. *In vivo* segundo Ford e Hamerton (1956), com modificações

1. Anestesiocar o animal, injetar intraperitonealmente solução de colchicina a 0,1% (1ml para cada 100g de peso corporal).
2. Fazer uma pequena incisão na região ventral do animal, retirar os fêmures, limpar e cortar as epífises. Colocá-los em uma placa de Petri contendo cerca de 5 ml de solução de Hanks.
3. Lavar sucessivas vezes o canal ósseo, até retirar todo o material.
4. Transferir o material para um tubo de centrífuga e centrifugar por 10 minutos a 1200 rpm.
5. Desprezar o sobrenadante e adicionar 7 ml de solução hipotônica KCl 0,075 M.

6. Incubar por cerca de 20 minutos em banho-maria a 37°C.
7. Retirar do banho, adicionar 6 gotas de fixador gelado (3:1 metanol-ácido acético) e ressuspender delicadamente. Deixar 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Acrescentar mais 3 ml de fixador gelado, homogeneizar vagarosamente e deixar por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos.
9. Desprezar o sobrenadante e adicionar 7 ml de fixador gelado. Homogeneizar, ressuspensando por cerca de 100 vezes. Centrifugar novamente e desprezar o sobrenadante. Repetir esse processo mais duas vezes.
10. Após a última centrifugação, desprezar o sobrenadante e adicionar fixador suficiente para que o material não fique muito concentrado.

II. 4. 2. *In vitro*

1. Adicionar colcemide (Gibco) - 100µl da solução mãe de 10µg/ml para cada 10µl de cultura de fibroblastos.
2. Continuar a incubação a 37°C por 2 horas (pode variar de 1 a 5 hs).
3. Transfírir o conteúdo dos frascos para tubos falcon. Centrifugar a 250g por 8 min.
4. Remover o sobrenadante e deixar o pellet o mais seco possível.
5. Ressuspender em 10ml de 75mMKCL (solução hipotônica), incubar a 37°C por 10 min.
6. Adicionar 1ml de fixador recém preparado (1 parte de metanol: 3 partes de ácido acético). Centrifugar a 400g por 10 min.
7. Remover o sobrenadante, mas não deixar muito seco. Nesse estágio o pellet pode se soltar e o material pode se perder.
8. Ressuspender em 10 ml de fixador e centrifugar a 400g por 8 min.
9. Remover o sobrenadante mais uma vez com cuidado, sem secar muito.
10. Repetir os passos 8 e 9 três vezes. Depois da última centrifugação remover mais do sobrenadante possível.

11. Ressuspender em uma pequena quantidade de fixador, na qual a solução ainda se mantenha turva.

As preparações ficam melhores se mantidas *overnight* a -20°C.

II. 5. HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

II. 5. 1. Preparação das sondas cromossomo-específicas

Primeira amplificação por DOP-PCR:

1. Realizar reação de PCR nas seguintes condições:

10µl de tampão 5x

2,5µl de tampão detergente W1 (éter polioxietileno W-1 0,05%)

4µl de DNTPs (250µM)

5µl de primer 6MW (5'CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3'; N=qualquer base, 4µM)

0,3µl de Taq Polimerase 5U/µl

Volume final de reação de 50µl

Regime de temperaturas: desnaturação inicial 94°C/9 min; 9 ciclos de 94°C/1 min; 30°C/1.5 s, transição a 0,23°C por segundo até 72°C/3 min; hibridação 30 ciclos de 94°C/1 min; 62°C/1 min; 72°C/3 min; extensão final de 72°C/10 min.

Segunda amplificação por DOP-PCR:

2. Usar 2 µl do produto primário adicionados à 2,5 µl biotina -16- dUTP ou FITC -12 – dUTP.
3. Proceder uma segunda reação de PCR conduzida sob as mesmas condições descritas acima, com exceção de que na hibridação apenas 25 ciclos são realizados e que a concentração de dNTP é diminuída para 125 µM

II. 5. 2. Pintura cromossômica

1. Usar de 100-150 ng de sonda, de um dado cromossomo-específico, já marcada com biotina e 1 µg de DNA carregador (human Cot-1 DNA, BRL).

2. Completar para 12 µl com tampão de hibridação.
3. Desnaturar a solução a 65°C por 10 min e incubar por 1 hora a 37°C para *pre-annealing*.
4. Desnaturar as lâminas por incubação em solução de 70% formamida em 2xSSC a 65°C por 2 min.
5. Mergulhar em etanol 70% gelado e desidratar em série de etanol a 70%, 90% e 100%.
6. Aplicar as sondas cromossômicas em *pre-annealing* nas lâminas desnaturadas e levar a hibridação *overnight* a 42°C.

Os banhos pós-hibridação:

1. Incubar 2x de 5 min em solução 50% formamida em 2xSSC a 42°C.
2. Incubar 2x de 5 min em 2xSSC a 42°C.

Deteção de uma única cor:

Utilizar FITC-avidina/FITC-anti-avidina (Vector) ou Cy3-avidina para visualizar as sondas marcadas com biotina.

Depois da deteção, as lâminas são montadas em meio Vectashield com DAPI.

II. 5.3. *Pintura multicolor*

A FISH multicolor foi realizada a partir das 7 sondas autossômicas de *Akodon cursor*, 2n=15 marcadas com sete cores diferentes.

1. Realizar 11 reações em tubos separados de PCR de 25µl como descrito anteriormente, sendo: 1ª ACU 1+3 com biotina; 2ª ACU 1 com Cy3; 3ª ACU 2 com FITC; 4ª ACU 2 com biotina; 5ª ACU 4 com FITC; 6ª ACU 4 com biotina; 7ª ACU 4 com Cy3; 8ª ACU 5 com FITC; 9ª ACU 5 com Cy3; 10ª ACU 6 com Cy3; 11ª ACU 7 com FITC.

Depois de terminadas as reações:

1. Misturar (vortex) e centrifugar cada tubo de PCR.
2. Combinar em um único tubo de 250ml.

3. Adicionar acetato de sódio 3M em quantidade equivalente a 1/4 do volume obtido de sondas.
4. Adicionar 1ml de etanol
5. Misturar (vortex) e centrifugar
6. Colocar o tubo em freezer a -70°C por no mínimo 1 hora.
7. Colocar em centrífuga refrigerada a 4°C por 20 min a 120g.
8. Retirar o sobrenadante e secar em temperatura ambiente em estufa a 37 °C.
9. Resuspender em 25µl de água destilada.

Prossiga como em *Pintura cromossômica*.

Detecção

1. 1º anticorpo: utilizar 0,4µl Cy5.5 e 1µl de rabbit anti-FITC.
2. Colocar em estufa a 37°C por 20 min.
3. 2º anticorpo: 1µl de goat anti-rabbit.
4. Colocar em estufa a 37°C por 20 min.

Depois da detecção, as lâminas são montadas em meio Vectashield com DAPI.

II. 5. 4. *FISH com sonda telomérica*

Para hibridação in situ fluorescente foram utilizados “DAKO Telomere PNA FISH Kit/Cy3 (K 5326) ou FITC (K 5325)” seguindo-se as recomendações do fabricante.

Durante o pré-tratamento:

1. Imergir as lâminas em TBS por aproximadamente 2 minutos, e então em formaldeído 3,7% diluído em TBS por exatamente 2 minutos.
2. Lavar as lâminas mais uma vez em TBS.
3. Imergir em solução de pré-tratamento por 10 minutos e, novamente lavá-las em TBS, seguido de banho em uma série de etanol gelado (70%, 85% e 96%).
4. Para desnaturação e hibridação:

5. Aplicar 10µL de sonda telomérica em cada lâmina e cobrir com lamínula de 18x18 mm.
6. Colocar as lâminas em estufa a temperatura de 80°C e após, deixá-las no escuro por 30 min em temperatura ambiente.
7. Imergir as lâminas em solução de lavagem para se remover as lamínulas.
8. Colocá-las em solução pré-aquecida a 65°C, e mais uma vez lavadas na série de etanol como anteriormente.
9. Aplicar em cada lâmina 2x10µl de solução de montagem (Vectashield suplementado com DAPI 0.1µ g/ml).

II. 5. 5. *Captura e processamento de imagem*

As imagens são capturadas usando-se software ISIS (MetaSystems). O microscópio é equipado com filtros para Cy5, Cy3, FITC e DAPI. Os sinais de fluorescência são capturados separadamente com filtro apropriado. Os sinais de hibridação são relacionados a uma região específica do cromossomo definida pelos padrões de banda obtidos com DAPI.

II. 6. TÉCNICAS DE COLORAÇÃO

II. 6. 1. *Coloração convencional*

1. Hidrolisar as lâminas em HCl 1N em banho-maria a 60°C durante 7 minutos.
2. Lavar em água destilada.
3. Corar por 7 minutos com uma solução de Giemsa (Merck), preparada com 1 ml de corante para 30 ml de tampão fosfato pH 6,8.
4. Lavar em água destilada e secar.

II. 6. 2. *Bandas C (CBG), segundo Sumner (1972), com modificações*

1. Hidrolisar as lâminas em HCl 0,2N durante 30 minutos à temperatura ambiente.
2. Lavar em água destilada e deixar secar.

3. Mergulhar as lâminas em hidróxido de bário octahidratado 5% a 60°C, durante 10 a 30 segundos, aproximadamente.
4. Imediatamente em seguida, lavá-las em água destilada e passar rapidamente em HCl 1N a 60°C. Lavar em água destilada e deixar secar.
5. Incubar em 2xSSC (pH 7,0) a 60°C durante 15 minutos. Após este período, retirar e lavar em água destilada.
6. Corar com solução de Giemsa (Merck) preparada com 1 ml de corante para 20 ml de solução de tampão fosfato pH 6,8 durante 30 minutos. Lavar em água destilada e secar.

II. 6. 3. *Bandas G (GTG), segundo Seabright (1971), com modificações*

1. Hidrolisar a lâmina por 15 minutos em 2xSSC a 60°C. Lavar em água destilada e deixar secar.
2. Preparar, em banho-maria à 37°C, uma solução de tripsina (0,02g em 75 ml tampão fosfato pH 6,8). Mergulhar as lâminas nesta solução fazendo movimentos para frente e para trás, durante 8 a 10 segundos.
3. Lavar em água destilada.
4. Corar durante 7 minutos com solução de Giemsa (Merck) preparada com 1 ml do corante para 30 ml de solução tampão fosfato pH 6,8.
5. Lavar em água destilada e secar.

II. 6. 4. *Bandas R (RBG) por incorporação de 5-bromodeoxiuridina (5-BrdU), segundo Dutrillaux e Couturier (1981), com modificações*

1. Nas últimas 6 a 12 horas do ciclo celular, adicionar solução de 5-BrdU (25µg/ml) ao frasco de cultura de fibroblastos. Envolver o frasco com papel escuro e incubá-lo em estufa a 37°C.

2. Aproximadamente 30 ou 40 minutos antes da colheita das células, colocar uma gota de solução de colchicina 0,01% para cada 5ml de material. Devolver o frasco à estufa à 37°C.
3. Colher o material conforme descrito em PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS *IN VITRO* a partir do passo 3. Após essa etapa, proceder a coloração.
4. Mergulhar as lâminas em solução *Hoechst* 33258 (10 µg/ml), em cuba Coplin coberta com papel alumínio por 20 min.
5. Lavar em água destilada.
6. Passar as lâminas em solução 2xSSC em temperatura ambiente. Pingar em cada lâmina 2 a 3 gotas da mesma solução e cobrir com lamínulas.
7. Fazer uma câmara úmida com 2xSSC em placa de Petri forrada com papel de filtro e colocar as lâminas colocadas sobre suportes feitos com bastões de vidro. Cobrir com filme de PVC transparente.
8. Colocar sob luz negra por 2 horas.
9. Lavar em água destilada e deixar por 20 min em solução de 2xSSC a 60°C.
10. Lavar com água destilada e corar com solução Giemsa (Merck) 1:30 por 7 min.
11. Lavar em água destilada e secar.

II. 6. 5. *Coloração de regiões organizadoras de nucléolos (RONs), segundo Howell e Black (1980), com modificações*

1. Hidrolisar as lâminas em HCl 1N a 60°C por 7 minutos. Lavar em água destilada e deixar secar.
2. Pingar, sobre o material da lâmina, 1 gota de solução coloidal reveladora (1g de gelatina para microbiologia da Merck em 50 ml de água destilada com 0,5 ml de ácido fórmico) e duas gotas de solução de nitrato de prata (AgNO₃) 50%.
3. Cobrir com lamínula e incubar por 3 a 4 minutos em câmara úmida a 60°C.
4. Retirar a lamínula, lavar com água destilada e corar durante 30 segundos com solução de Giemsa (Merck) 1:50.

II. 6. 6. *Análises cromossômicas*

As lâminas foram observadas ao microscópio de luz e os cromossomos, em diferentes colorações (convencional e diferencial), contados e identificados. Para o estabelecimento do número diplóide, foram analisadas, no mínimo, 30 metáfases de cada exemplar. As melhores metáfases, foram fotografadas em microscópio da marca Zeiss, em objetiva 100 de imersão, com optovar de 1,25, com filtro verde, usando filme Kodak Imagelink HQ ASA 64 ou sistema de captura de imagens IKAROS (Metasystems). Os filmes foram revelados com Dektol (Kodak) diluído em água na proporção 1:4, a 18°C por 4 minutos e fixados por 12 minutos (fixador Kodak). As fotos foram ampliadas em papel Kodabrome Print RC F-3 (Kodak), reveladas com Dektol diluído em água, na proporção 1:3 e fixadas.

II. 7. OBTENÇÃO DE SEQUÊNCIAS DO GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO *B*

O DNA foi extraído de amostras de fígado ou músculo empregando o método “Jim’s DNA Extraction Protocol”. Esta é uma modificação do método Puregene® DNA Isolation Kit da Gentra Systems, descrito em Fetzner (1999).

A amplificação do gene mitocondrial do citocromo *b* foi realizada via reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), utilizando *primers* desenvolvidos pelo *Museum of Vertebrate Zoology* (MVZ) da Universidade da Califórnia, Berkeley, EUA (Smith e Patton, 1993; 1999). Os seqüenciamentos foram realizados nos seqüenciadores automáticos do Departamento de Biologia, IB-USP (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer de 1 capilar e ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer de 96 capilares), por pessoal técnico do Departamento de Botânica, IB-USP. As reações de seqüenciamento foram feitas utilizando o ABI PRISM® Big Dye™ Terminators v 3.0 kit (Applied Biosystems). Na fase de análise, as seqüências foram conferidas e editadas no programa “*Sequence Navigator*” (Applied Biosystems, Inc. 1994).

As matrizes geradas foram analisadas sob os métodos de reconstrução filogenética de máxima parcinônia e máxima verossimilhança.

II. 7. 1. *Extração de DNA, Fretzner (1999), com modificações*

1. Retirar cerca de 50 mg de tecido de fígado ou músculo com tesoura e pinça previamente limpas em formol e álcool. Os tecidos mantidos em etanol devem ser secos em papel de filtro e depois em centrífuga de vácuo por 5 minutos.
2. Picotar o tecido com tesoura e pinça ou macerar com pistilo.
3. Lise Celular: acrescentar de 700-900 µl de solução de lise celular (1,21g de Tris base 10mM; 37,4g de EDTA 100mM; 20g de SDS 2%) e agitar. Acrescentar 7-9 µl de Proteinase-K (20 mg/ml) e misturar suavemente. Incubar a 58°C *overnight* ou até dissolver todo o tecido.
4. Tratamento com RNase: adicionar 4 µl de RNase-A (10mg/ml). Misturar suavemente e incubar a 37°C por 60 minutos.
5. Precipitação das proteínas: adicionar 300 µl de acetato de amônio e misturar vigorosamente por 20 segundos. Incubar no gelo por 30 minutos e centrifugar a 14.000 rpm por 3 minutos. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e desprezar o precipitado.
6. Precipitação do DNA: adicionar ao sobrenadante 700-900 µl de isopropanol, inverter suavemente cerca de 50 vezes e incubar em freezer a -20°C *overnight*.
7. Centrifugar a 14.000 rpm por 6 minutos e descartar o sobrenadante. Adicionar 700-900 µl de etanol 70% e inverter cerca de 50 vezes. Centrifugar a 14.000 rpm por 3 minutos, descartar o sobrenadante e secar bem o pellet em centrífuga de vácuo por 20 minutos.
8. Diluição do DNA: acrescentar 50-200 µl de H₂O milli Q e incubar a temperatura ambiente *overnight* ou a 65°C por 60 minutos, agitando de vez em quando.

Separar em alíquotas e congelar.

Após a extração, a concentração do DNA foi medida em espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech).

II. 7. 2. Amplificação do Citocromo *b*

A amplificação das sequências-alvo deu-se através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando *primers* específicos para o citocromo *b* (Tabela 3). De acordo com cada espécie, diferentes pares de *primers* de cadeia leve e cadeia pesada foram combinados: MVZ 05 e MVZ 16 para obtenção um fragmento contendo cerca de 825pb da primeira parte do citocromo *b*; MVZ 127 e MVZ 14 ou MVZ 127 e MVZ 108 para obtenção de fragmentos entre 738-755 pb da segunda parte do gene. Existe uma sobreposição de aproximadamente 385 pb entre as partes que permite concatená-las para obter os 1140 pb que compõem o gene do citocromo *b*. O sequenciamento das cadeias leve e pesada de cada fragmento foram feitos separadamente. Na figura 2 são mostradas as posições e direções dos *primers* no citocromo *b*.

Tabela 3: Lista de *primers* utilizados nas análises moleculares com o gene para o citocromo *b*. (fonte: Museum of Vertebrate Zoology, University of California, Berkeley, USA).

Primer	Sequência 5' → 3'	Cadeia	Autor
MVZ 05	CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G	Leve	S. Pääbo
MVZ 127	TRY TAC CAT GAG GAC AAA ATA C	Leve	L. Lacey
MVZ 14	GGT CTT CAT CTY HGG YTT ACA AGA C	Paesada	C. Orrego
MVZ 16	AAA TAG GAA RTA TCA YTC TGG TTT RAT	Pesada	C. Orrego
MVZ 108	CCA ATG TAA TTT TTA TAC	Pesada	E. Lessa/ J. Cook

II. 7. 3. Reações em cadeia da polimerase (PCR)

As reações foram feitas para um volume final de 25 µl. A concentração do DNA usada foi de 20 ng/µl. A concentração utilizada dos *primers* foi de 10 µM. Os reagentes utilizados foram todos fornecidos pela Invitrogen™ Life Technologies. As amplificações foram feitas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) sob regime de temperaturas padrão: desnaturação inicial 94°C/5 min; 40 ciclos de 94°C/30 s, hibridação 48°C/45 s, extensão 72°C/2 min; e extensão final a 72°C/3 min. Algumas modificações que foram feitas no regime para melhorar o resultado da amplificação em algumas espécies são descritas nos capítulos correspondentes.

Para cada amostra foram usados nas reações:

1. 4,0 μ l de dNTPs (5mM)
2. 2,5 μ l de Buffer 10x; 2,5 ml de $MgCl_2$ (25mM)
3. 2,0 μ l de cada *primer*
4. 10,5 μ l de H_2O milli q⁺;
5. 0,5 ml de *Taq* DNA Polymerase, Recombinant (5 U/ml)
6. 1,0 μ l de DNA.
7. Colocar as amostras no termociclador pré-programado e iniciar o programa

Figura 2: *Primers* utilizados para PCR e sequenciamento do citocromo *b*. As setas indicam a direção dos *primers*. Em vermelho o fragmento, com cerca de 1140 pb do gene mitocondrial. Setas em rosa indicam os pares de primers utilizados para amplificar a primeira parte do citocromo *b* e as setas em azul indicam os pares de primers utilizados para obtenção da segunda parte. (Figura cedida pelo Dr. James Patton do Museum of Vertebrate Zoology, University of California, Berkeley, EUA).

II. 7. 4. *Verificação dos produtos de PCR*

As reações foram então verificadas em gel de agarose 0,8 % (corado com brometo de etídio) em corridas de cerca de 20 minutos a 160 V com a finalidade de se averiguar se os fragmentos obtidos correspondiam ao tamanho esperado. Para tanto, as bandas produzidas foram comparadas com marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen).

II. 7. 5. *Limpeza dos fragmentos amplificados por PCR*

A limpeza dos produtos de PCR foi feita com o kit ExoSAP-IT™ produzido pela USB Corporation e distribuído pela Amersham Biosciences, em termociclador sob regime de temperaturas: 37°C/30min, 60°C/30min.

1. Adicionar aos tubos para PCR 5µl de produto de PCR
2. Acrescentar 2µl de ExoSAP
3. Colocar os tubos em microcentrífuga e submetê-lo a um pulso rápido.
4. Colocar as amostras no termociclador pré-programado e iniciar o programa.

II. 7. 6. *Sequenciamento dos produtos de PCR*

As reações de seqüenciamento foram feitas utilizando o ABI PRISM® Big Dye™ Terminators v 3.0 kit (Applied Biosystems). As reações foram preparadas para um volume final de 5 µl. A reação foi conduzida em termociclador sob regime de temperaturas: 25 ciclos de 96°C/10 s, 50°C/5 s, 60°C/4 min.

1. Adicionar aos tubos de PCR 2 µl de 1 dos *primers*
2. Acrescentar 1 µl de produto de PCR limpo (20-30ng/µl)
3. Acrescentar 2 µl do kit Big Dye.
5. Colocar os tubos em microcentrífuga e submetê-lo a um pulso rápido.
4. Colocar as amostras no termociclador pré-programado e iniciar o programa.

Esse procedimento de ser realizado para cada um dos *primers* independentemente.

II. 7.7. *Limpeza dos produtos de sequenciamento*

1. Transferir as amostras para tubos de 1,5ml
2. Adicionar 80µl de isopropanol 75% e agitar em vórtex
3. Incubar por 25 em temperatura ambiente
4. Centrifugar por 25 min a 13.000 rpm
5. Retirar o isopropanol
6. Adicionar 200 µl de etanol 70%
7. Centrifugar 5 min a 13.000 rpm
8. Retirar o etanol
9. Secar a 95°C por 3 min
10. Armazenar a -20°C até o sequenciamento

II. 7. 8. *Análise das sequências*

Para a análise, as sequências de cadeias leve e pesada foram limpas, alinhadas e concatenadas manualmente no programa Sequence NavigatorTM (Applied Biosystems). Com cada sequência montada foi conduzida uma pesquisa comparativa de similaridade no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Aligment Search Tool*) para verificar se não houve contaminação ou se o fragmento sequenciado correspondia de fato ao do citocromo *b*.

Depois de montadas as sequências foram alinhadas automaticamente usando o programa Clustal X (Jeanmougin e col., 1998).

Os alinhamentos e cada sequência da matriz foram conferidos utilizando-se o programa MacClade versão 4.3 (Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, EUA), que mostra a tradução dos códons, e permite verificar erros e apontar eventuais incongruências no quadro de leitura. Nesses casos o alinhamento e as sequências foram revisados.

II. 8. MÉTODOS DE INFERÊNCIA FILOGENÉTICAS

II. 8.1. *Máxima parcimônia (MP)*

A procura da árvore mais parcimoniosa foi realizada no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003) por meio de busca heurística utilizando adição de passos (*stepwise addition*) com algoritmo de rearranjos de ramos do tipo TBR (*tree bisection and reconnection*) com 10.000 réplicas.

II. 8. 2. *Máxima verossimilhança (MV)*

As análises de verossimilhança foram também realizadas no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003).

O modelo evolutivo mais adequado aos dados foi escolhido através do teste hierárquico de razão de verossimilhança hLRT (*hierarchical likelihood ratio test*) (Goldman, 1993a,b; Huelsenbeck e Crandall, 1997; Huelsenbeck e Rannala, 1997) realizado previamente à reconstrução filogenética. Os hLTRs foram realizados pelo programa Modeltest 3.7 (Posada e Crandall, 1998), que é executado em conjunto com o PAUP*.

Outra forma de comparar diferentes modelos, pelo Modeltest, é pelo critério mínimo de informação teórica ou *Akaike Information Criterion* – AIC (Akaike, 1974). Apesar do AIC ser uma alternativa de escolha do modelo evolucionário ele usualmente escolhe modelos que apresentam maior grau de complexidade.

A procura da árvore mais provável foi realizada por meio de busca heurística por adição de passos (*stepwise addition*) com algoritmo de rearranjos de ramos do tipo TBR (*tree bisection and reconnection*) com 500 réplicas.

II. 9. MEDIDAS DE SUPORTE

Diferentes índices de suporte foram utilizados de acordo com a análise realizada. Valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) e índice de Bremer (Bremer, 1994) foram usados na análise de MP. Na análise de MV foram usados valores de *bootstrap*.

II. 9. 1. *Bootstrap*

Valores de *bootstrap* (BP) foram obtidos PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003), por meio de reamostragem dos dados. Associações que tiveram BP menores que 50% não foram mostradas nas árvores, e os ramos que levaram aos táxons envolvidos neste casos foram representados por politomias. Desde sua descrição por Felsenstein (1985), os valores de BP têm sido o modo mais usado para medir o suporte dos nós internos de cladogramas gerados por análises de máxima parcimônia e máxima verossimilhança. Felsenstein (1985) definiu os valores de *bootstrap* em análises filogenéticas não como a chance de ser correta, mas como um intervalo de confiança dentro do qual está contida, não a verdadeira filogenia, mas a filogenia que seria estimada em repetidas amostragens de muito caracteres.

II. 9. 2. *Índice de Bremer*

O índice de decaimento (Bremer, 1994), também conhecido como índice de Bremer, indica o número de passos necessários para uma determinada associação de táxons seja perdida em uma árvore. De acordo com Goloboff e Farris (2001), o índice de Bremer pode gerar valores absolutos com os quais uma árvore subótima é comparada com outra árvore. Um defeito do método é que ele não leva em consideração a quantidade relativa de evidências contrárias e favoráveis para um agrupamento. Por exemplo, de acordo com o índice de Bremer, um grupo suportado por dois caracteres não-contrários encontra suporte menor que um grupo suportado por 100 e contradito por 97. O primeiro grupo, no entanto, é relativamente bem apoiado, enquanto no segundo caso existe tanta evidência a favor do agrupamento quanto contra ele. DeBry (2001) e Wilkinson e col. (2003) enfatizaram a importância de conhecer o comprimento de ramos internos quando avaliamos o significado dos índices de Bremer. Estes valores foram obtidos utilizando-se o programa TreeRot.2 (Sorenson, 1999) em conjunto com o PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003).

II. 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAIKE, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Contr* 19:716-723.
- BONVICINO, C. R., J. A. DE OLIVEIRA, E P. S. D'ANDREA. 2008. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Pp. 120. Centro Pan-Americano de Febre Aftosa. Rio de Janeiro.
- BONVICINO, C. R., E M. A. MOREIRA. 2001. Molecular phylogeny of the genus *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) based on cytochrome b DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 282-292.
- BREMER, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics*. 10:295-304.
- DEBRY, R. W. 2001. Improving interpretation of the decay index for DNA sequence data. *Systematic Biology*. 50: 742-752.
- D'ELIA, G. E U. F. J. PARDIÑAS. 2004. Systematics of Argentinean, Paraguayan, and Uruguayan swamp rats of the genus *Scapteromys* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). *Journal of Mammalogy*. 85 (5): 897-910.
- D'ELIA, G. 2003. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics* 19: 307-323.
- D'ELIA, G., E. M. GONZALES, E U. F. J. PARDIÑAS. 2003. Phylogenetic analyses of sigmodontine rodents (Muroidea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. *Mammalian Biology* 68:351-364.
- DUTRILLAUX, B., E J. COUTURIER. 1981. La pratique de l'analyse chromosomique. Masson S.A., Paris. 84p.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- FORD, C. F., E J. L. HAMERTON. 1956. A colchicin hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosome. *Stain Thechiques*. 31: 247-251.
- FETZNER, J. W. 1999. Extracting high-quality DNA from shed reptile skins: a simplified method. *Bio Techniques* 26 (6):1052-1054.
- GEISE, L., M. F. SMITH, E J. L. PATTON. 2001. Diversification of genus *Akodon* (Rodentia:Sigmodontinae) in southeastern South America: mitochondrial DNA sequence analysis. *Journal of Mammalogy* 82 (1):92-101.
- GOLDMAN, N. 1993a. Simple diagnostic statistical test of models of DNA substitution. *Journal of Molecular Evolution*. 37: 650-661.

- GOLDMAN, N. 1993b. Statistical tests of models of DNA substitution. *Journal of Molecular Evolution*. 36: 182-198.
- GOLOBOFF, P. A., E J. S. FARRIS. 2001. Methods for quick consensus estimation. *Cladistics*. 17:26-34.
- HOWELL, W. M., E D. A. BLACK. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1st step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- HUESELBECK, J. P., E K. A. CRANDALL. 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review in Ecology Systematics*. 28: 437-466.
- HUESELBECK, J. P., E B. RANNALA. 1997. Phylogenetic methods come of age: testing hypothesis in an evolutionary context. *Science* 276: 227-232.
- JEANMOUGIN, F., J. D. THOMPSON, M. GOUY, D. G. HIGGINS, E T. J. GIBSON. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemistry Sciences*. 23: 403-405.
- POSADA, D., E K. A. CRANDALL. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9):817-818.
- SEABRIGHT, M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 2: 971.
- SMITH, M. F., E J. L. PATTON. 1991. Variation in mitochondrial cytochrome *b* sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae; Sigmodontinae). *Molecular Biology and Evolution*. 8: 85-103.
- SMITH, M. F., E J. L. PATTON. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontini tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50: 149-177.
- SMITH, M. F., E J. L. PATTON. 1999. Phylogenetic Relationships and the Radiation of Sigmodontine Rodents in South America: Evidence from cytochromo *b*. *Journal of Mammalian Evolution* 6(2): 89-128.
- SORENSEN, M. D. 1999. TreeRot, ver. 2 Boston: Boston University.
- SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell. Res.* 75: 304-306.
- SWOFFORD, D. L. 2003. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.02b. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- VILLAFANE, G. I. E., M. MIÑO, R. CAVIA, K. HODARA, P. COURTALÓN, O. SUÁREZ, E M. BUSH. 2005. Guía de roedores de la provincia de Buenos Aires. Pp. 100. Lola. Buenos Aires.
- WILKINSON, M., F.-J. LAPOINTE, E D. J. GOWER. 2003. Branch lengths and support. *Systematic Biology*. 52:127-130.

III. DETECÇÃO DE HOMOLOGIAS POR PINTURA CROMOSSÔMICA RECÍPROCA ENTRE *A. PARANAENSIS*, 2N=44, *A. MONTENSIS*, 2N=24, *A. CURSOR*, 2N=15 E *AKODON* SP. N., 2N=10: COMPLEXA DIFERENCIAÇÃO AUTOSSÔMICA E CONSERVAÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS DURANTE O PROCESSO QUE LEVOU AO MENOR NÚMERO DIPLÓIDE ENTRE OS ROEDORES

III. 1. ABSTRACT

Traditionally comparative cytogenetic studies are based mainly on banding patterns. Nevertheless, when dealing with species with highly rearranged genomes, as in *Akodon* species, or with other highly divergent species, cytogenetic comparisons of banding patterns prove to be inadequate. Hence, comparative chromosome painting has become the method of choice for genome comparisons at the cytogenetic level, since it allows complete chromosome probes of a species to be hybridized *in situ* onto chromosomes of other species, detecting homologous genomic regions between them. In the present study, we have explored the highly rearranged complements of the *Akodon* species using reciprocal chromosome painting through species-specific chromosome probes obtained by chromosome sorting. The results revealed complete homology among the complements of *Akodon* sp. n. (ASP), 2n=10, *A. cursor* (ACU), 2n=15, *A. montensis* (AMO), 2n=24 and *A. paranaensis* (APA), 2n=44 and extensive chromosome rearrangements have been detected within the species with high precision. Robertsonian and tandem rearrangements, pericentric inversions and/or centromere repositioning, paracentric inversion, translocations, insertions and fragile sites were observed. The chromosome painting using the APA set of 21 autosomes plus X and Y exhibited eight syntenic segments that are shared with *A. montensis*, *A. cursor* and *Akodon* sp. n. plus five exclusive associations for *A. cursor* and six for *Akodon* sp. n. Chromosomes X, except for the heterochromatin region of ASP X, and even chromosome Y that often present no hybridization signal when hybridized between species of mammals, shared complete homology among the species. These data indicate that all those closely related species have experienced a recent intensive process of autosomic differentiation, in which, there is still complete maintenance, except for chromosome X of *Akodon* sp. n., of the sex chromosomes homologies.

Key words: *Akodon cursor* complex, chromosome painting, chromosomal syntenies, chromosomal rearrangements, multicolour FISH.

III. 2. RESUMO

Estudos de citogenética comparativa são rotineiramente desenvolvidos a partir da comparação dos padrões de bandamentos cromossômicos. Contudo, quando se trata de espécies que apresentam genomas altamente rearranjados, como no caso das espécies de *Akodon*, ou que são muito divergentes, a comparação de cromossomos por padrões de bandas torna-se inadequada. Como consequência, a pintura cromossômica tem se tornado o método de escolha assertivo, já que permite comparação genômica no nível citogenético. Nessa tecnologia sondas de um cromossomo inteiro de uma determinada espécie são hibridadas *in situ* em cromossomos de outra espécie, detectando as regiões homólogas entre os genomas. No presente estudo comparamos os cariótipos altamente diferenciados de algumas espécies de *Akodon* por meio de pintura cromossômica recíproca com uso de sondas espécie-específicas, obtidas a partir de cromossomos separados por citometria de fluxo. Os resultados revelaram homologia completa entre os complementos de *Akodon* sp. n. (ASP), 2n=10, *A. cursor* (ACU), 2n=15, *A. montensis* (AMO), 2n=24 e *A. paranaensis* (APA), 2n=44 e evidenciaram com precisão muitos rearranjos cromossômicos entre os complementos das espécies. Rearranjos Robertsonianos e em tandem, inversões pericêntricas e/ou reposicionamento de centrômero, inversão paracêntrica, translocações, inserções e existência de sítios frágeis nos complementos foram observados. A pintura cromossômica empregando o conjunto de sondas de APA para 21 autossomos mais cromossomos X e Y evidenciou oito segmentos sintênicos compartilhados entre *A. montensis*, *A. cursor* e *Akodon* sp. n., cinco associações exclusivas para *A. cursor* e seis para *Akodon* sp. n. Foi também detectada homologia completa dos cromossomos X, com exceção da região heterocromática de ASP X, e até mesmo dos cromossomos Y que geralmente não apresenta sinal hibridação entre diferentes espécies de mamíferos. Esses dados indicam que essas espécies intimamente relacionadas passaram por um processo recente de intensa diferenciação autossômica, no qual se conservou a homologia total, por exceção de *Akodon* sp. n., entre os cromossomos sexuais.

Palavras chave: complexo *Akodon cursor*, pintura cromossômica, sentenias cromossômicas, rearranjos cromossômicos, FISH multicolor.

III. 3. INTRODUÇÃO

Estudos cromossômicos realizados nas espécies pertencentes ao gênero de *Akodon* (Sigmodontinae, Akodontini) revelaram entre os 29 complementos já descritos uma grande amplitude do número diplóide, que varia de $2n=10$ em *Akodon* sp. n. (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998) a $2n=46$ em *Akodon serrensis* (referido como *Akodon* sp. por Geise e col., 1998). Estudos citogenéticos comparativos foram desenvolvidos por citogenética clássica por comparação de padrões de bandas GTG (Fagundes e col. 1997a, b; Geise e col. 1998; Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998; Ventura e col., 2006), e por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com uso de sondas teloméricas (Fagundes e col. 1997a, b; Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998; Vieira e col., 2004; Ventura e col., 2006) e espécie-específicas (Fagundes 1997b; Hass e col., 2008), na tentativa de se identificar os rearranjos cromossômicos responsáveis pela diferenciação cariotípica em algumas espécies de *Akodon* (*Akodon* sp. n., $2n=10$, *A. cursor*, $2n=14-16$, *A. montensis*, $2n=24$, *A. azarae*, $2n=38$, *A. lindberghi*, $2n=42$, *A. paranaensis*, $2n=44$ e *A. serrensis*, $2n=46$). Os resultados levaram a concluir que rearranjos cromossômicos complexos que envolvem inversão pericêntrica seguida de fusão cêntrica, rearranjos Robertsonianos e em tandem, inversões pericêntricas, amplificação de sequências repetitivas de DNA e manutenção de sequências teloméricas intersticiais (ITS) ocorreram durante a evolução cromossômica do grupo.

O complexo *Akodon cursor* agrupa as espécies *A. paranaensis*, *A. mystax*, *A. reigi* que apresentam $2n=44$, e as espécies crípticas *A. montensis*, *A. cursor* e *Akodon* sp. n. (Silva e col., 2006; Smith e Patton, 2007). Nessas últimas, as técnicas citogenéticas convencionais de bandamento GTG foram empregadas em conjunto com FISH de sondas específicas de sequência telomérica (TTAGGG) $_n$ com a finalidade de identificar e localizar sequências cromossômicas envolvidas em rearranjos. Essa associação se mostrou uma ferramenta importante para a localização de algumas alterações cromossômicas e permitiu que mecanismos de diferenciação cromossômica fossem elucidados.

A espécie *Akodon cursor* é caracterizada por apresentar variabilidade tanto no número diplóide ($2n=14-16$) quanto no número de braços de autossomos (NF= 18-26). Rearranjos complexos de inversão pericêntrica seguida de fusão cêntrica envolvendo os pares

autossômicos ACU 1 e ACU 3 da forma com $2n=16$, que originam o grande metacêntrico ACU 1+3 e que são descritos tanto em homozigose ($2n=14$) quanto em heterozigose ($2n=15$) e polimorfismos causados por inversões pericêntricas originando as formas acrocêntrica e submetacêntrica de ACU 2, acrocêntrica e metacêntrica de ACU 4 e acrocêntrica e submetacêntrica de ACU 6, são os mecanismos responsáveis pela alta variabilidade cariotípica da espécie (Yonenaga, 1972; Yonenaga e col., 1975; Yonenaga-Yassuda, 1979; Sbalqueiro e Nascimento, 1996; Christoff, 1997; Fagundes e col., 1997a, 1998).

Pintura cromossômica realizada a partir da sonda obtida por microdissecção do cromossomo 1 submetacêntrico (ACU 1) de um espécime com $2n=16$ confirmou que esse cromossomo é homólogo ao braço longo do grande metacêntrico ACU 1+3 presente exclusivamente nas formas com $2n=14$ e $2n=15$. A sonda também foi hibridada no complemento da espécie *Akodon montensis* e a FISH mostrou, como sugerido pelos padrões de bandas GTG, que ACU 1 é homólogo a três pares de autossomos de dois braços naquela espécie e que a forma cromossômica com dois braços autossômicos deve ser a constituição original para os pares que apresentam inversão pericêntrica (ACU 2, ACU 4 e ACU 6) de *Akodon cursor* (Fagundes e col. 1997a, b).

Silva e Yonenaga-Yassuda (1998) decreveram, para uma espécie nova de *Akodon*, o menor número diplóide entre roedores. Os espécimes apresentaram $2n=9$, 10 e $NF=14-16$ e polimorfismos decorrentes de inversões pericêntricas no par ASP 3 e monossomia do cromossomo X. Estudos morfológicos preliminares sugerem que *Akodon* sp. n. é críptica de *A. cursor* e *A. montensis* (Christoff, com. pess.).

A comparação entre os cariótipos de *Akodon* sp. n. ($2n=10$) e *A. cursor* ($2n=16$ e $2n=14$) foi realizada por Silva e col. (2006), porém não foi possível para os autores estabelecerem homologia completa entre os complementos através dos padrões de bandas G. Rearranjos Robertsonianos e rearranjos de inversão pericêntrica seguidos de fusão em tandem foram os mecanismos descritos por Silva e col. (2006) como sendo os responsáveis pela diferenciação cromossômica entre as duas espécies. Os autores não encontraram correspondência entre a parte distal dos homólogos do par ASP 3 de *Akodon* sp. n., $2n=10$ e qualquer par cromossômico de *A. cursor*, $2n=16$.

Após FISH com sondas teloméricas, além dos sinais na região dos telômeros, os homólogos dos pares ASP 1 e 3 apresentaram também ITS, as quais não são coincidentes com as posições específicas envolvidas nos rearranjos propostos. Segundo os autores a ITS

presente na região pericentromérica do par 1 (ASP 1) está relacionada com a natureza da heterocromatina neste par. A partir dos resultados da comparação verificou-se que um menor número de passos e rearranjos menos complexos estariam envolvidos na diferenciação entre o cariótipo com $2n=10$ e $2n=16$ do que entre $2n=10$ e $2n=14$, assim um cariótipo com número diplóide maior ou igual a $2n=16$ seria o ancestral ao $2n=10$ (Silva e col, 2006).

Estudos de citogenética comparativa são rotineiramente desenvolvidos a partir da comparação dos padrões de bandamentos cromossômicos. Contudo, quando se trata de espécies que apresentam genomas altamente rearranjados, como no caso das espécies de *Akodon*, ou que são muito divergentes, a comparação de cromossomos por padrões de bandas torna-se inadequada (Chowdhary e Raudsepp, 2001). Como consequência, a pintura cromossômica tem se tornado o método de escolha mais eficiente, já que permite a comparação genômica no nível citogenético. Nessa tecnologia, sondas de um cromossomo inteiro de uma determinada espécie são hibridadas *in situ* em cromossomos de uma outra espécie, detectando as regiões homólogas das sequências de DNA entre os genomas. As homologias encontradas através da pintura cromossômica comparativa são úteis no estudo de evolução cariotípica e para a elucidação de mecanismos de rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a evolução (Ferguson-Smith e col., 1998).

No presente estudo este complexo modelo citogenético que assume a ocorrência de eventos que levam a redução do número diplóide (Fagundes e col. 1997a, b; Geise e col. 1998; Silva e col., 2006) foi explorado com a técnica da pintura cromossômica recíproca. A hibridação de sondas cromossômicas espécie-específicas, obtidas por cromossomos separados por citometria de fluxo, permitiu que um grande número de rearranjos cromossômicos fosse detectado com bastante precisão entre as espécies intimamente relacionadas *Akodon* sp. n., *A. cursor*, *A. montensis* e *A. paranaensis*. As sondas obtidas a partir do complemento da última espécie, que apresenta $2n=44$ quase que exclusivamente com cromossomos acrocêntricos, foram particularmente úteis para que fosse superada a limitação da técnica em detectar inversões, uma vez que funcionaram como marcadores, possibilitando demonstrar, com alta resolução, regiões homólogas rearranjadas entre os cariótipos das espécies crípticas, com menores números diploides.

III. 4. MATERIAL E MÉTODOS

As sondas específicas foram geradas a partir de cromossomos separados por citometria de fluxo no Laboratório de Citogenética Molecular, do Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Cambridge, Inglaterra. Os cromossomos foram obtidos a partir de culturas de células de fibroblastos de três espécies de *Akodon*, estabelecidas no Laboratório de Citogenética de Vertebrados, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sendo, uma de *A. paranaensis* (APA, $2n=44$), duas de *A. cursor* (ACU, $2n=15$ e $2n=14$) e uma de *Akodon* sp. n. (ASP, $2n=10$), todas de espécimes machos.

As metáfases de *A. paranaensis*, *A. cursor* e *Akodon* sp. n. usadas para as hibridações *in situ* foram obtidas a partir de células cultivadas *in vitro*; as de *A. montensis* ($2n=24$) foram obtidas a partir de células de medula óssea em preparação direta *in vivo* segundo Ford e Hamerton (1956), com modificações. Os cariótipos dos espécimens utilizados são apresentados em coloração convencional na Figura 1.

Os cromossomos de *A. paranaensis* foram organizados de acordo com a posição em que cada um apareceu, como um pico, no gráfico da citometria de fluxo, os de *A. cursor* foram numerados como descritos por Fagundes e col. (1998), e para os de *Akodon* sp. n. e *A. montensis* seguimos Silva e Yonenaga-Yassuda (1998) e Fagundes e col. (1997b), respectivamente. Para tanto, os pares cromossômicos de cada espécie foram identificados pelo padrão de bandas G e então representados por idiogramas. Os cromossomos nas metáfases hibridadas foram identificados pelos padrões gerados pela coloração com DAPI.

Para obtenção das sondas específicas de cromossomos inteiros foram realizados DOP-PCR a partir de amostras dos cromossomos obtidos por citometria (Telenius e col., 1992; Yang e col., 1995). Cada sonda obtida foi hibridada em metáfases da mesma espécie que gerou os cromossomos com a finalidade de se estabelecer correspondência entre os pares cromossômicos e os picos do gráfico de citometria de fluxo.

Sucintamente, os cromossomos preparados são corados com Hoechst 33258 (2 mg/ml) e Cromomicina A3 (40mg/ml) em solução de sulfato de magnésio (2,5 mmol/L) por 2 h. Sulfato de sódio (25 mmol/L) e citrato de sódio (10mmol/L) são adicionados 15 min antes do início da citometria. Cerca de 400 cromossomos são separados para cada pico registrado pela citometria, diretamente em tubos para PCR contendo 30 ml de água destilada. Essas amostras são amplificadas por DOP-PCR usando primer 6MW (Telenius e col., 1992). Os

produtos desse PCR primário são marcados com biotina-16-dUTP (Boehringer Mannheim), isocitrato de fluoresceína (FITC)-12-dUTP (Amersham) ou Cy3-dUTP em uma segunda rodada de DOP-PCR usando o mesmo primer 6MW.

A hibridação *in situ* das sondas de pintura foi realizada como descrito por Yang e col. (1995): 14 ml de tampão de hibridação e 1 ml do produto de PCR secundário são desnaturados a 37°C por 30 min e pingados em lâminas previamente desnaturadas em solução de 70% formamida/2xSSC por 2min. Os banhos de pós-hibridação incluem 2x 5 min de incubação em solução de 50% formamida/2xSSC a 48°C, seguidos de 2x 5 min em 2xSSC e finalizando 4 min em 4xT (100ml 20xSSC+400ml H₂O+250µl Triton X-100 Sigma-Aldrich). As sondas marcadas com biotina foram detectadas com Cy3-avidina para FISH de cor única e Cy5-avidina para FISH multicolor. As sondas marcadas com FITC tiveram seus sinais amplificados com rabbit anti-FITC seguido de goat anti-rabbit, em ambos procedimentos. Em todas as lâminas a contra-coloração foi feita com DAPI-Vectashield e as imagens analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot equipado com software para captura de imagem (Isis karyotyping system, MetaSystems).

III. 5. RESULTADOS

III. 5. 1. Citometria de fluxo em *Akodon paranaensis*, $2n=44$

Dos 19 picos apresentados no gráfico da citometria do cariótipo de *A. paranaensis*, 16 deles apresentaram sondas de cromossomos únicos, sendo de 14 pares autossômicos e dos cromossomos X e Y. Dois picos apresentaram sondas de dois pares autossômicos (6 e 7; 18 e 19) e um pico, sonda de três pares autossômicos (10, 11 e 12). O gráfico com os respectivos pares autossômicos e sexuais correspondentes a cada pico são mostrados na Figura 2A. A correspondência dos sinais de hibridação de cada sonda foi determinada com a hibridação recíproca entre os complementos das diferentes espécies.

III. 5. 2. Citometria de fluxo em *Akodon cursor*, $2n=15$ e $2n=14$

O gráfico da citometria de fluxo do cariótipo de *A. cursor*, $2n=15$ apresentou 9 picos, dos quais foram obtidas apenas sondas contendo cromossomos únicos (Fig. 2B): 5 pares autossômicos, 2 autossomos ímpares (1 e 3) e os cromossomos X e Y. O maior cromossomo ACU 1+3 não apareceu neste gráfico, e por essa razão a cultura celular de *A. cursor*, $2n=14$

foi utilizada para a obtenção do par autossômico ACU 1+3 (Fig. 2C), configurando um total de 10 picos que abrangem todo o complemento de *A. cursor* ($2n=15$).

III. 5. 3. Citometria de fluxo em *Akodon* sp. n., $2n=10$

Para *Akodon* sp. n., foram obtidas sondas de cromossomos únicos dos 6 picos registrados para cariótipo, sendo os 4 pares autossômicos e os cromossomos X e Y. (Fig. 2D).

III. 5. 4. Pintura cromossômica com as sondas de *A. paranaensis* nos genomas de (I) *A. montensis*, (II) *A. cursor* e (III) *Akodon* sp. n.

(I) As sondas cromossomos-específicas de *A. paranaensis* ($2n=44$) pintaram 23 segmentos no genoma de *A. montensis* ($2n=24$). O padrão obtido pela FISH é mostrado no idiograma da Figura 3A. Quatro sondas hibridaram em cromossomos inteiros de *A. montensis*: APA 19 (AMO 10), APA 21 (AMO 11), APA X (AMO X) e APA Y (AMO Y). As três últimas hibridações são mostradas nas figuras 4A, D e G. Três sondas (APA 1, APA 20 e APA 3) hibridaram em AMO 1 (Fig. 5 A-C). As demais sondas se mostraram homólogas a braços cromossômicos inteiros de *A. montensis*: APA 4 (AMO 2p), APA 2 (AMO 2q), APA 7 (AMO 3p), APA 6 (AMO 3q), APA 10 (AMO 4p), APA 5 (AMO 4q), APA 9 (AMO 5p), APA 8 (AMO 5q), APA 12 (AMO 6p), APA 11 (AMO 6q), APA 16 (AMO 7p), APA 14 (AMO 7q), APA 17 (AMO 8p), APA 15 (AMO 8q), APA 18 (AMO 9p), APA 13 (AMO 9q).

(II) No complemento de *A. cursor* ($2n=15$), foram pintados 24 segmentos no lote haplóide (Fig. 3B). Três sondas hibridaram em cromossomos inteiros de *A. cursor*: APA 21 (ACU 7), APA X (ACU X) e APA Y (ACU Y) (Fig. 4B, E, H). Nove sondas cromossômicas (APA 1, APA 20, APA 3, APA 14, APA 16, APA 13, APA 18, APA 15 e APA 17) hibridaram em ACU 1+3 (Fig. 6), sendo que seis (APA 14, APA 16, APA 13, APA 18, APA 15 e APA 17) correspondem a parte homóloga de ACU 1 e três (APA 1, APA 20 e APA 3) correspondem a parte homóloga a ACU 3 (Fig. 5 D, E e F). APA 20 também exibiu sinal pontual na parte proximal de ACU (1+3)q (Fig. 5 e 6). O cromossomo ACU 2 foi pintado por quatro sondas (APA 6, APA 7, APA 12 e APA 11) e três sondas (APA 9, APA 8 e APA 19) hibridaram em ACU 5 (Fig. 7). Dois cromossomos de *A. cursor* foram hibridados por duas sondas: ACU 4 (APA 4 e APA 2) e ACU 6 (APA 10 e APA 5).

(III) No complemento de *Akodon* sp. n. ($2n=10$), foram pintados 26 segmentos (Fig. 3C). Três sondas hibridaram em cromossomos inteiros de *Akodon* sp. n.: APA 21 (ASP 4), APA X (ASP X) e APA Y (ASP Y) (Fig. 4C, F, I). Nove sondas cromossômicas (APA 13, APA 18, APA 14, APA 16, APA 19, APA 5, APA 10, APA 15 e APA 17) hibridaram em ASP 1, sendo as cinco primeiras em ASP1p e as quatro restantes em ASP 1q (Fig. 8); APA 19 hibridou em dois segmentos de ASP 1p e APA 17 hibridou em dois segmentos de ASP 1q. Cinco sondas (APA 2, APA 4, APA 3, APA 20 e APA 1) hibridaram em ASP 2 e seis (APA 6, APA 7, APA 8, APA 9, APA 12 e APA 11) hibridaram em ASP 3, entretanto, APA 8 exibiu dois segmentos nesse mesmo cromossomo.

III. 5. 5. Pintura cromossômica com as sondas de *A. cursor* nos genomas de (I) *A. montensis* e (II) *Akodon* sp. n.

(I) A hibridação das sondas cromossomo-específicas de *A. cursor* no genoma de *A. montensis* pintou 13 segmentos (Fig. 3A). Seis sondas hibridaram em cromossomos inteiros de *A. montensis*: ACU 3 (AMO 1), ACU 4 (AMO 2), ACU 6 (AMO 4), ACU 7 (AMO 11), ACU X (AMO X) e ACU Y (AMO Y). ACU 1 hibridou em três cromossomos inteiros de *A. montensis* (AMO 7, AMO 8 e AMO 9); ACU 2 hibridou em dois cromossomos, AMO 3 e AMO 6; ACU 5 também hibridou em dois cromossomos, AMO 5 e AMO 10.

(II) A hibridação das sondas de *A. cursor*, por FISH de cor única e multicolor, no genoma de *Akodon* sp. n. revelou 18 segmentos homólogos (Figs. 3C, 9, 10 e 11). Duas sondas hibridaram em cromossomos inteiros de *Akodon* sp. n.: ACU X (ASP X) e ACU Y (ASP Y). Duas sondas hibridaram mais de um cromossomo em *Akodon* sp. n. A sonda de ACU 5 exibiu quatro sinais de hibridação, sendo dois segmentos em ASP 1p, um em ASP 3q e um segmento na posição distal de ASP 4p (Figs. 9 e 10). ACU 6 hibridou um segmento em ASP 1q. As sondas de ACU 1 e ACU 2 pintaram dois segmentos cada: a primeira na partes distais dos diferentes braços do mesmo cromossomo ASP 1 e a segunda pintou dois segmentos em ASP 3 (Fig. 11). Duas sondas, ACU 4 e ACU 3, hibridaram em ASP 2; a primeira em parte do braço curto e a segunda na parte proximal do braço curto e em todo o braço longo. A sonda de ACU 7, além de hibridar em todo ASP 4, hibridou também em dois segmentos de ASP1, um em ASP 1p e outro em ASP 1q.

III. 5. 6. *Pintura cromossômica com as sondas de Akodon sp. n. nos genomas de (I) A. montensis e (II) A. cursor*

(I) A hibridação das sondas cromossomo-específicas de *Akodon* sp. n. no genoma de *A. montensis* revelou 13 segmentos (Fig. 3A). Três sondas hibridaram em cromossomos inteiros: ASP 4 (AMO 11), ASP X (AMO X) e ASP Y (AMO Y). ASP 1 hibridou em cinco cromossomos inteiros: AMO 4, AMO 7, AMO 8, AMO 9 and AMO 10; ASP 2 hibridou em dois cromossomos: AMO 1 e AMO 2; ASP 3 hibridou em três cromossomos: AMO 3, AMO 5 e AMO 6.

(II) Em *A. cursor* (2n=15) foram pintados 10 segmentos (Fig. 3B). Três sondas hibridaram em cromossomos inteiros *A. cursor*: ASP 4 (ACU 7), ASP X (ACU X) e ASP Y (ACU Y). ASP 1 pintou quatro segmentos: todo ACU 1 e ACU 6, ACU (1+3)q e um segmento distal de ACU 5q. A sonda de ASP 2 pintou três segmentos: todo ACU 4 e ACU 3 e ACU (1+3)p. ASP 3 pintou todo o cromossomo ACU 2 mais ACU 5p e parte proximal desse mesmo ACU5q.

III. 5. 7. *Estabelecimento de blocos, segmentos sintênicos e associações específicas a partir da hibridação das sondas de APA nos complementos de A. montensis, A. cursor e Akodon sp. n.*

A hibridação das sondas cromossomo-específicas de *A. paranaensis* (2n=44) no cariótipo de *A. montensis* (2n=24) mostrou que os 23 blocos de APA são mantidos em AMO e que eles se encontram, ou associados em nove segmentos autossômicos, AMO 1 (APA 3/ APA 20/ APA 1), AMO 2 (APA 4/ APA 2), AMO 3 (APA 7/ APA 6), AMO 4 (APA 10/ APA 5), AMO 5 (APA 9/ APA 8), AMO 6p (APA 12/ APA 11), AMO 7 (APA 16/ APA 14), AMO 8 (APA 17/ APA 15) e AMO 9 (APA 18/ APA 13), ou mantidos como blocos únicos nos 4 cromossomos AMO 10, 11, X e Y, que correspondem aos APA 19, APA 21, APA X e APA Y, respectivamente.

Dos 23 blocos de APA, 21 apresentam-se íntegros em *A. cursor*, uma vez que o bloco APA 8 apresenta ou uma inversão pericêntrica ou um reposicionamento de centrômero em ACU 5 e o bloco APA 20 aparece dividido em dois segmentos em ACU 1+3 (Fig. 7). As nove associações de blocos APA observadas em *A. montensis* estão em sintenia em *A. cursor*, e cinco associações específicas foram observadas em *A. cursor*: ACU 1q (APA 16/ APA 13) e (APA 18/ APA 15), ACU 1+3 (APA 3/ APA 20/ APA 14), ACU 2 (APA 7/ APA 12), ACU 5

(APA 8/ APA19). ACU 7, X e Y apresentaram, respectivamente, homologia completa aos cromossomos APA 21, X e Y e aos ACU 11, X e Y.

A hibridação das 23 sondas de APA no cariótipo de *Akodon* sp. n. revelou que nessa espécie 19 blocos permanecem íntegros. Os blocos que se apresentam rearranjados são: APA 19 que pintou dois segmentos em ASP1p, APA 17 que pintou dois segmentos em ASP1q, APA 3 que apresenta inversão pericêntrica ou reposicionamento de centrômero e o bloco APA 8, que em *A. cursor* apresenta ou uma inversão pericêntrica ou um reposicionamento de centrômero, está representado em dois segmentos de ASP 3q. Essa espécie compartilha com *A. montensis* e *A. cursor* oito segmentos sintênicos autossômicos; o segmento sintênico APA 16/APA 14 compartilhado por AMO e ACU não existe em ASP. *Akodon* sp. n. apresenta seis associações específicas, localizadas em: ASP 1p (APA 18/ APA 14/ APA 19/ APA 16/ APA 19/ APA 5), ASP 1q (APA 10/ APA 15) e (APA 17/ APA 15); ASP 2p (APA 4/ APA 3); ASP 3q (APA 7/ APA 8 e APA 8/ APA12). Não houve segmentos sintênicos revelados pelas sondas APA que fossem exclusivamente compartilhados entre ASP e ACU. ASP Y e ASP X foram os únicos cromossomos do complemento de *Akodon* sp. n. que apresentaram correspondência a única sonda, APA Y ou ACU Y e APA X ou ACU X, respectivamente.

III. 5. 8. Outros resultados

Em todas as espécies as regiões homólogas correspondentes aos cromossomos APA 2, e APA 19 apresentam Ag-RONs.

A. montensis e *A. cursor* exibem Ag-RONs também na região homóloga a APA 14. *A. montensis* é a única espécie em que as Ag-RONs se localizam nas regiões homólogas a APA 7 e APA 12; *Akodon cursor* a única que apresenta Ag-RONs nas regiões homólogas a APA 10 e a APA X; e *Akodon* sp. n. em região homóloga a APA 5 (Tabela 1 e Fig. 3).

Nenhuma sonda exibiu sinais de hibridação na região heterocromática do cromossomo X de *Akodon* sp. n. A hibridação de ASP X no complemento de *Akodon* sp. n. revelou sinais adicionais nas regiões pericentroméricas heterocromáticas de ASP 1 e ASP 2 (Fig. 13) e a hibridação de ASP 4 (homólogo a ACU 7) não gerou os sinais adicionais em ASP 1 como os gerados por ACU7 no complemento de *Akodon* sp. n.

As figuras enumeradas de 14 a 17 serão utilizadas para ilustrar algumas das hibridações que servirão de base para as discussões apresentadas a seguir.

Tabela 1. Homologias detectadas através das sondas de *A. paranaensis* (APA) entre os pares cromossômicos portadores de Ag-RONs nas 3 espécies de *Akodon* segundo Yonenaga e col. (1983), Yonenaga e col. (1992) e Silva e Yonenaga-Yassuda (1998).

	APA 2	APA 5	APA 7	APA 10	APA 12	APA 14	APA 19	APA X
AMO	AMO 2q		AMO 3p		AMO 6p	AMO 7q	AMO 10q	
ACU	ACU 4q			ACU 6p		ACU 1p e (1+3)q	ACU 5q	ACU Xp
ASP	ASP 2p	ASP 1q					ASP 1p ASP 4p	

III. 6. DISCUSSÃO

O estabelecimento das posições, segmentações e associações dos blocos de APA, a partir das hibridações das sondas cromossomos-específicas de *A. paranaensis*, 2n=44, nos complementos de *Akodon* sp. n. (2n=10), *A. cursor* (2n=15), *A. montensis* (2n=24) evidenciou que um grande número de rearranjos cromossômicos está envolvido na diferenciação cariotípica dessas espécies.

Os 23 cromossomos de APA permanecem íntegros, porém apresentam nove associações em *A. montensis*, das quais nove são sintênicas em *A. cursor* e oito em *Akodon* sp. n. O bloco APA 8 foi o único que se apresentou rearranjado tanto em *A. cursor* quanto em *Akodon* sp. n., sendo que corresponde a duas regiões proximais nos braços curto e longo de ACU 5, ou apresenta dois sinais de hibridação em ASP 3q. A pintura cromossômica recíproca permitiu identificar pequenos segmentos homólogos que representam rearranjos entre algumas espécies, como no caso dos sinais de hibridação das sondas APA 20 em *A. cursor* e das sondas APA 19, APA 17 e ACU 5 em *Akodon* sp. n. Essas hibridações mostraram que esses complementos apresentam rearranjos intracromossômicos. Foram gerados novos dados sobre o processo de evolução cromossômica entre espécies próximas filogeneticamente, como as espécies aqui estudadas pertencentes ao complexo *cursor* (Silva e col., 2006; Smith e Patton, 2007).

III. 6. 1. Os polimorfismos intra-específicos de autossomos em *A. cursor* e em *Akodon* sp.n. vistos por pintura cromossômica.

Polimorfismos cromossômicos resultantes de inversões pericêntricas, nas formas homozigostas e heterozigotas, dos pares de autossomos ACU 2, ACU 4 e ACU 6 e rearranjo complexo envolvendo inversão pericêntrica e fusão cêntrica nos pares ACU1 e ACU 3 são

descritos em amostras de *A. cursor* com $2n=14-16$ e $NF=18-26$ de diferentes localidades do Brasil. O polimorfismo de ACU 6 é bastante raro e o par se apresenta na grande maioria dos exemplares em homozigose na forma acrocêntrica (Yonenaga, 1972; Yonenaga e col., 1975; Yonenaga-Yassuda, 1979; Sbalqueiro e Nascimento, 1996; Christoff, 1997; Fagundes e col., 1997a; Fagundes e col., 1998).

Na espécie *Akodon* sp. n. com $2n=10$ e $NF=14-16$, foi detectado polimorfismo autossômico do par ASP 3 devido a inversão pericêntrica e monossomia de cromossomo sexual, sendo encontradas quatro formas cariotípicas diferentes (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998).

De acordo com Fagundes e col. (1997a), o posicionamento de uma ITS no braço curto do grande metacêntrico ACU 1+3 sugere que os eventos de inversão pericêntrica seguidos de fusão cêntrica, responsáveis pelo polimorfismo de número diplóide em *A. cursor* ($2n=14$, $2n=15$ e $2n=16$), ocorreram com a conservação de todo ACU 1 e a perda dos segmentos centromérico e telomérico de ACU 3.

Nossos resultados, por outro lado, evidenciam a perda das regiões centroméricas e teloméricas de ACU 1, já que não existe homologia entre ACU 1 e a região pericentromérica de ACU 1+3 e o pequeno segmento observado na região pericentromérica de ACU (1+3)q após hibridação com APA 20 (além de APA 1 e APA 3), confirma a integridade de ACU 3 após inversão pericêntrica seguida de fusão cêntrica (Fig. 14). As ITSs descritas por Fagundes e col. (1997a) devem corresponder às sequências teloméricas do cromossomo ACU 3.

Foi constatado que as regiões dos cromossomos ACU 2 e ASP 3, envolvidas nas inversões pericêntricas, responsáveis pelas formas acrocêntricas ou submetacêntricas desses cromossomos, são segmentos homólogos entre si e correspondem em sua maior parte, ao cromossomo APA 6 que está localizado em *A. montensis*, *A. cursor* e *Akodon* sp. n. no segmento sintênico APA6/APA7.

Em ACU 4 e ACU 6, os rearranjos de inversões pericêntricas ocorrem envolvendo os segmentos sintênicos APA 4/APA 2 e APA 10/APA5, respectivamente. Em ACU 4 o segmento invertido corresponde em sua maior parte a APA 4, e em ACU6 corresponde a APA 10.

III. 6. 2. *Rearranjos cromossômicos evidenciados por pintura cromossômica entre os complementos das espécies de Akodon.*

A discussão que segue, sobre os rearranjos envolvidos na diferenciação dos complementos entre as espécies, leva-se em conta a manutenção da integridade dos blocos referentes a APA, os segmentos sintênicos compartilhados entre *A. montensis*, *A. cursor* e *Akodon* sp. n., assim como as associações específicas encontradas em *A. cursor* e *Akodon* sp. n.

Consideramos que os padrões de hibridação específicos de *A. cursor* em *Akodon* sp. n., gerados pela sonda de ACU 7 em ASP 1p e q, são indicativos de que esses são complementos intimamente relacionados. Esses resultados e os outros rearranjos apontam para que os eventos tenham ocorrido no sentido de redução de número diplóide entre as espécies, sendo *Akodon* sp. n., $2n=10$ a espécie mais derivada e com maior acúmulo de rearranjos detectados por pintura cromossômica.

(I) Rearranjos Robertsonianos e os complementos de *A. paranaensis*, $2n=44$ e *A. montensis*, $2n=24$.

Foram descritas nove associações de sondas de *A. paranaensis* no complemento de *A. montensis*, sendo que oito delas estão relacionadas exclusivamente a ocorrência de rearranjos Robertsonianos. A associação APA 3/ APA 20/ APA 1 está relacionada a um rearranjo Robertsoniano e, como podemos observar em AMO 1q, a ocorrência de um rearranjo em tandem envolvendo APA 1 e APA 20. Esse rearranjo, ou segmento sintênico (APA 1/APA 20), foi descrito por Ventura e col. (2006) através da comparação dos padrões de bandas GTG e FISH telomérica, para as espécies *A. lindberghi*, $2n=42$, *A. boliviensis*, $2n=40$ e *A. azarae*, $2n=38$, e é conservado em todas as espécies de *Akodon* com número diplóide menor que $2n=44$ até então estudadas, incluindo *Akodon* sp. n., *A. cursor* e *A. montensis* apresentadas no atual trabalho. *A. azarae* é a única espécie que apresenta ITS no sítio do rearranjo (Vieira e col., 2004; Ventura e col., 2006).

(II) Inversões pericêntricas, rearranjos em tandem e os complementos de *A. montensis*, $2n=24$ e *A. cursor*, $2n=14$ e $2n=16$

O fato de que as nove associações de APA observadas em *A. montensis* se mantêm sintênicas em *A. cursor* permite direcionar a comparação entre o complemento com $2n=24$ e

os com $2n=14$ e $2n=16$. No primeiro caso podem ser contadas pelo menos cinco inversões pericêntricas envolvendo AMO 1 e ACU (1+3)p; AMO 6 e ACU 2q; AMO 7 e ACU (1+3)q; AMO 8 e ACU (1+3)q; AMO 9 e ACU (1+3)q; quatro rearranjos em tandem envolvendo AMO 9, AMO 8 e ACU (1+3)q e, AMO 6 e ACU 2q e um rearranjo Robertsoniano envolvendo AMO 1, AMO 7 e ACU 1+3. No segundo caso, pode ser contado um menor número de rearranjos, sendo duas inversões pericêntricas e três rearranjos em tandem. Ambos os casos apresentam uma inversão pericêntrica de um pequeno segmento ou reposicionamento de centrômero envolvendo os segmentos de AMO 5q e ACU 5 homólogos a APA 8. Existe manutenção de homologia total dos segmentos sintênicos entre ACU 3 e AMO 1, ACU 4 e AMO 2, ACU 6 (na forma submetacêntrica) e AMO 4, ACU 7 e AMO 11.

Os segmentos mantidos em sintenia nessas duas espécies, relativos a hibridação das sondas de APA, envolvidos nas inversões pericêntricas são: APA 3/APA 20, APA 12/APA 11, APA 16/APA 14, APA 17/APA 15 e APA 18/APA 13. Rearranjos em tandem explicam a origem aos segmentos específicos de *A. cursor*, APA 16/APA 13, APA 18/APA 15, APA 7/APA 12 e APA 8/APA 19, assim como o rearranjo Robertsoniano envolvendo AMO 1, AMO 7 e ACU 1+3, explica a associação APA 3/APA 20/APA 14.

III. 6. 3. *Rearranjos complexos e a diferenciação entre os cariótipos de A. cursor e de Akodon sp. n.*

Pela comparação dos padrões de bandas GTG já foi demonstrado que um menor número de passos e rearranjos menos complexos estariam envolvidos na diferenciação entre o cariótipo de *Akodon sp. n.* com $2n=10$ e o de *A. cursor* com $2n=16$ do que entre aquele complemento e o com $2n=14$ de *A. cursor* (Silva e col., 2006). Assim a discussão é feita com base na comparação entre os cariótipos de $2n=16$ e $2n=10$.

Os resultados de pintura cromossômica com as sondas de *A. cursor* no complemento de *Akodon sp. n.*, após FISH com cor única e multicolor, indicam a ocorrência dos seguintes rearranjos na diferenciação desses dois complementos: (I) inversão pericêntrica ou transposição de centrômero levando a diferença da proporção em tamanho do segmento ACU 3p (observada quando comparamos ACU 3 com sua parte homóloga em ASP 2); (II) rearranjo em tandem envolvendo ACU 3 e ACU 4 (na forma acrocêntrica) na região do braço curto de ASP 2; (III) quebra do cromossomo ACU 5 em três segmentos sendo que, um deles sofre translocação com o braço curto de ACU6 na forma acrocêntrica, o outro é inserido em

ACU 2q, originando o ASP 3 e o terceiro segmento sofreu translocação com o pequeno cromossomo ASP4p. Além disso, posteriormente deve ter ocorrido quebra e inserção de pequeno segmento de ACU 5 em ASP 1p; (IV) inserção do segmento ACU 5/ACU 6, originado por translocação em ACU 1, dando origem à ASP 1. A ITS relatada em ASP 3q (Silva e col., 1998) evidencia a manutenção de telômero do segmento ACU5 inserido no ponto de quebra de ACU 2 ocorrido em altura mediana do braço longo; (V) quebra e inserção de ACU 7 em ACU 1 como observado em ASP 1p e q.

Logo, como podemos ver na figura 3C, o cromossomo ASP 1 é constituído de segmentos cromossômicos de *Akodon cursor* na seguinte ordem, do braço curto para o braço longo: ACU 1; ACU 7; ACU 1; ACU 5; ACU 1; ACU 5; ACU6; ACU 7; e ACU 1. Seguindo a mesma análise constatamos que ASP 2 é constituído por: ACU 4 e ACU 3. O ASP 3 é formado por: ACU 2; ACU 5; e ACU 2. Interessante que até mesmo o pequeno cromossomo metacêntrico marcador do gênero *Akodon* aparece rearranjado em *Akodon* sp. n., sendo formado por ACU 5 e ACU 7 (Fig. 3C, 9 e 10).

Quando um maior número de sondas de APA (espécie com maior número diplóide) é usado em hibridações nas duas espécies, se torna evidente que um número ainda maior de rearranjos deve ser considerado na diferenciação entre os dois complementos ($2n=16$ e $2n=10$).

A associação APA 14/ APA 16/ APA 13/ APA18 é observada em ACU 1, porém quando comparamos as partes homólogas de *Akodon* sp. n. correspondentes a esses blocos, observamos a existência da associação específica APA18/APA14 em ASP 1p. A ocorrência de quebras cromossômicas que possibilitem a inserção da associação APA 13/APA 18 em uma posição mais distal em relação à associação APA 14/APA 16 pode explicar a ocorrência da associação APA 18/APA 14 em ASP 1p.

Pode ser observado que inversão cromossômica ou transposição de centrômero responsável pela diferença da proporção em tamanho do segmento ACU 3p (observada quando comparamos ACU 3 com sua parte homóloga em ASP 2) envolve os segmentos homólogos a APA 3 (Fig. 15).

Foi possível identificar que as partes homólogas a ACU 5 no complemento de *Akodon* sp. n. correspondem a APA 19 em ASP 1p e a APA 8/APA 9/APA 8 em parte de ASP 3q. Portanto, o segmento translocado de ACU 5 para o braço curto de ACU 6 é homólogo a APA 19 e que deve ter sofrido translocação, originalmente no braço curto do segmento homólogo a

APA10, no entanto a associação observada na região pericentromérica em *Akodon* sp. n. é APA 19/ APA 5. Isso leva a sugestão de que posteriormente, uma inversão paracêntrica do segmento APA 10/ APA 5 deva ter ocorrido em ASP 1q. A ocorrência de uma inversão pericêntrica da parte não translocada, que apresenta sua parte distal homóloga a todo cromossomos APA 9 e os dois segmentos proximais, incluindo o centrômero, homólogos a parte de APA 8 concorda com os dois sinais de hibridação gerados pela sonda APA 8 que flanqueiam o bloco hibridado pela sonda APA 9 em ASP 3q.

Também foi evidenciado que a quebra ocorrida em ACU 1, no provável processo de origem de ASP 1, teria ocorrido entre os segmentos homólogos a APA 15 e APA 18. Nesse processo, deve-se considerar a perda da sequência centromérica de ACU 1 (entre os segmentos homólogo a APA 14 e a APA16) pois, como mencionado anteriormente, o centrômero de ASP 1 é o mantido no segmento ACU 5/ACU 6 originado por translocação.

A ocorrência de quebras e inserção de parte do bloco APA 17 pode ser sugerida para explicar os dois sinais de hibridação gerados por esta sonda na região distal de ASP 1q (Fig. 16).

Os mecanismos sugeridos pela comparação dos padrões de bandas G (Silva e col., 2006), que teriam ocorrido durante a diferenciação cromossômica de cariótipo ancestral, similar ao de *A. cursor* com número diplóide de 16 ou maior e o cariótipo de *Akodon* sp. n., $2n=10$, diferem daqueles surpreendentemente complexos evidenciados pela pintura cromossômica. Dificilmente os rearranjos existentes entre os complementos com $2n=16$ e $2n=10$ seriam deduzidos pela comparação direta dos padrões de bandas G dos autossomos o que já foi aventado na publicação de Silva e col. (2006).

III. 6. 4. *Homologia dos cromossomos sexuais*

Os cromossomos X mostraram-se conservados, em sua totalidade, entre as espécies *A. paranaensis*, *A. montensis* e *A. cursor*.

O cromossomo X de *Akodon* sp. n. apresentou sinal de hibridação com as sondas APA X e ACU X em todo braço longo, por exceção da região pericentromérica, a qual apresenta um bloco de heterocromatina constitutiva conspicuo observado em bandas CBG (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998), que não apresentou homologia a qualquer sonda. Essa é uma heterocromatina espécie-específica de mesma natureza das presentes nas regiões pericentroméricas de ASP 1 e ASP 2, como evidenciaram os sinais de hibridação da sonda de

ASP X, mostrando a complexidade dos rearranjos do cariótipo de ASP. Não podemos dizer se a heterocromatina pericentromérica do cromossomo X e dos autossomos ASP1 e ASP2 é de origem autossômica ou sexual. Na espécie de roedor *Cryptomys mehowi* foram detectadas, através de pintura cromossômica, translocações que teriam ocorrido entre quatro autossomos e o cromossomo X (Deuve e col., 2006), porém essas regiões translocadas não representam blocos heterocromáticos como em *Akodon* sp. n.

O cromossomo Y também apresentou homologia total entre as espécies estudadas, indiciando o íntimo relacionamento entre essas espécies de *Akodon*. Os dados de pintura cromossômica indicam que, ao contrário dos segmentos de autossomos e dos cromossomos X, a manutenção de homologia entre os cromossomos Y de diferentes espécies, como observado em *Akodon*, é bastante rara (Glas e col., 1999; Muller e col., 1999, Yang e col., 2003; Tian e col., 2004; Li e col., 2004).

III. 6. 5. *Sítios suscetíveis à ocorrência de rearranjos em Akodon sp. n.*

Foram observados em *Akodon* sp. n. sinais de hibridação que parecem indicar regiões cromossômicas ou sítios suscetíveis à ocorrência de rearranjos.

As sondas APA 19 e ACU 5 exibiram sinais em pequenos segmentos de ASP 1p localizados em sítio próximo ou correspondentes a ITS (Fig. 15B). Foi também observado que a ITS descrita para ASP 3q (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998) está localizada entre os sítios de hibridação de APA 7 e APA 8 (ou ACU 2 e ACU 5) (Fig. 15C). Os sinais de hibridação observados em ASP 1p e q gerados pela sonda ACU 7 (Fig. 3C, 12A e B), estão co-localizados com os supostos sítios de ocorrência de quebras cromossômicas; a sonda APA 17 gerou um sinal bastante próximo ao sítio relacionado a quebras, hibridado por ACU 7 em ASP 1q (Fig. 16). Em ASP 1p, os sinais de ACU 7 estão localizados entre os segmentos sintênicos APA13/APA18 e APA14/APA16 e, em ASP 1q entre os segmentos sintênicos APA5/APA10 e APA15/APA17 (Fig. 3C). Assim sendo, esses sítios são coincidentes em ASP 1p com o provável ponto de quebra onde teria ocorrido a inserção do segmento APA 13/APA 18, e em ASP1q ao ponto de quebra de ACU 1 e de inserção do segmento originário por translocação ACU 5/ACU 6. Os sinais de hibridação gerados pela sonda ACU 7 em ASP 1p e 1q são específicos para esta sonda uma vez que, a hibridação de ASP 4 e APA 21 (homólogos a ACU 7) no complemento de *Akodon* sp. n. não exibiu tais sinais (Fig. 17). Esse é mais um indício de que esses dois complementos são intimamente relacionados. O fato de um cromossomo que se

apresenta, aparentemente, tão conservado entre as espécies de *Akodon*, se apresentar rearranjado em *Akodon* sp. n. evidencia mais uma vez a complexidade do cariótipo de *Akodon* sp. n., $2n=10$, originado no processo de ampla redução do número diplóide, o menor entre os roedores.

III. 6. 6. *Ag-RONs*

A Ag-RON de ASP 1q, está relacionada a parte do segmento homólogo a APA 5, enquanto que em ACU 6 (APA 10/ APA 5) a Ag-RON corresponde a parte do segmento homólogo a APA 10. O segmento sintênico APA 10/ APA 5 em ASP 1q teria sofrido inversão paracêntrica tendo como pontos de quebra um sítio logo abaixo da Ag-RON (que estaria originalmente relacionada ao segmento homólogo a APA 10) e a atual região hibridada por ACU 7, que está entre APA 10 e APA 15.

Uma vez considerado que a Ag-RON localizada na espécie *Akodon* sp. n. em ASP 1q é originalmente relacionada ao segmento homólogo a APA 10, assumindo ocorrência de inversão paracêntrica do segmento sintênico APA 10/ APA 5 temos que as RONS em ACU 6p e em ASP 1q são originárias do mesmo segmento homólogo.

Em *A. cursor* aos braços cromossômicos ACU 4q, ACU 6p e ACU 5q são os que carregam as Ag-RONs que ocorrem com maior frequência nessa espécie (Yonenaga-Yassuda e col., 1983) enquanto que as Ag-RONs relacionadas a ACU 1p, ACU 1+3q são as menos frequentes. Em *A. montensis* as Ag-RONs estão localizadas em AMO 2q, AMO 3p, AMO 7q e AMO 10q sendo que o par 10 é o que apresenta marcação mais frequente e o par 7 menos frequente (Yonenaga-Yassuda e col., 1992). Essas Ag-RONs pouco frequentes nas duas espécies estão relacionadas a APA 14 e parece não ter sido mantida ativa na espécie *Akodon* sp. n. Temos que em todas as espécies estudadas os segmentos homólogos a APA 2 e a APA 19 carregam Ag-RONs, esses são os segmentos homólogos que carregam as RONS mais frequentes em *Akodon montensis* e *Akodon cursor* que correspondem respectivamente à AMO 2q e AMO 10q e, ACU 4q e ACU 5q (Tabela 1).

III. 6. 7. *Considerações finais*

Podemos constatar a presença de alguns sítios frágeis nos quais a ocorrência de rearranjos cromossômicos parecem ser favorecidos: 1) o ponto de fusão em tandem entre AMO 9 e AMO 8 em ACU 1 é o delimitado pela hibridação de APA 18 e de APA 15. Esse é o

mesmo sítio envolvido no processo de quebra e inserção do segmento ACU 5/ ACU 6 originado por translocação no cromossomo ASP 1 e é também o ponto de inserção de um segmento translocado de ACU 7 naquele mesmo cromossomo.

2) o ponto de fusão em tandem entre AMO 10 e AMO 5 em ACU 5 é o delimitado pela hibridação de APA 8 e APA 19. Esse é o mesmo sítio envolvido na quebra e consequente translocação recíproca entre parte de ACU 5 e o braço curto de ACU 6.

3) o ponto de fusão em tandem entre AMO 3 e AMO 6 é o delimitado pela hibridação de APA 7 e APA 12 em ACU 2. Esse é o mesmo sítio que está envolvido no processo de quebra e consequente inserção de parte de ACU 5 no cromossomo ASP3.

Uma correlação entre localização de sítios cromossômicos frágeis e pontos de quebra recorrentes também foi demonstrada em diversas espécies (Robinson e Elder, 1987; Ronne, 1992; Stone e col., 1993; Yang e Long, 1993; Rodriguez e col., 2002; Ruiz-Herrera e col., 2002, 2006; Ruiz-Herrera e Robinson, 2007), sugerindo a existência de regiões instáveis como um dos fatores envolvidos na evolução cariotípica de mamíferos.

A pintura cromossômica empregando o conjunto de sondas de APA de 21 autossomos mais cromossomos X e Y evidenciou oito segmentos sintênicos compartilhados entre *A. montensis*, *A. cursor* e *Akodon* sp. n. e cinco associações exclusivas para *A. cursor* e seis para *Akodon* sp. n.

Hass e col. (2008) estabeleceram o mapa de homologias cromossômicas entre o camundongo e cinco espécies de roedores, entre elas *A. cursor*, *A. montensis* e *A. paranaensis*, por meio de Zoo-FISH unidirecional com sondas cromossômicas de *Mus musculus* (MMU). Os autores buscaram detectar os rearranjos cromossômicos responsáveis pela variação cariotípica dentro da tribo Akodontini; entretanto, algumas das homologias apontadas entre essas três espécies não estão em acordo com as reveladas aqui pela pintura cromossômica recíproca. Por exemplo, a hibridação das sondas de APA em *A. montensis* mostrou que cada autossomo acrocêntrico do complemento de *A. paranaensis*, por exceção de APA 19 e APA 20, é homólogo a um segmento que corresponde a um braço cromossômico inteiro nos autossomos de dois braços em *A. montensis*; esse padrão não foi detectado por Hass e col (2008) em 7 dos braços autossômicos de *A. montensis*.

Os resultados revelaram homologia completa entre os complementos de *Akodon* sp. n., $2n=10$, *A. cursor*, $2n=15$, *A. montensis*, $2n=24$ e *A. paranaensis*, $2n=44$ e evidenciaram muitos rearranjos autossômicos entre os complementos das espécies tais como, rearranjos

Robertsonianos e em tandem, inversões pericêntricas e/ou reposicionamento de centrômero, translocações, inserções e evidenciaram a existência de sítios frágeis nos complementos. Os cromossomos sexuais apresentam-se conservados, exceto pela região de heterocromatina de ASP X que é específica e apresenta rearranjos envolvendo as regiões pericêntricas heterocromáticas de ASP 1 e ASP 2. Não há dúvidas de que o cariótipo de *Akodon* sp. n., $2n=10$, é o mais rearranjado de todos os apresentados, envolvendo cromossomos autossômicos e o X.

As sondas obtidas a partir do complemento de *A. paranaensis*, que apresenta $2n=44$ quase que exclusivamente com cromossomos acrocêntricos, foram particularmente úteis para que fosse superada, em parte a limitação da técnica em detectar inversões e rearranjos intracromossômicos, possibilitando demonstrar, com alta resolução, regiões homólogas rearranjadas entre os cariótipos das espécies crípticas, com menores números diplóides e serem úteis como marcadores cromossômicos em *Akodon* sp. n..

O fato de essas espécies apresentarem complementos altamente rearranjados entre si, em contraposição a conservação dos cromossomos Y, que geralmente apresentam sequências específicas, mostra que essas são espécies intimamente relacionadas que passaram por um processo recente de intensa diferenciação autossômica, no qual, ainda se conserva a homologia total, por exceção da região heterocromática de ASP X e que constitui uma incógnita que merece ser explorada com maiores detalhes futuramente.

Figura 1. Cariótipos em coloração convencional das espécies de *Akodon* utilizadas no presente trabalho. (A) *A. paranaensis*, 2n=44. O cariótipo apresentado é de fêmea, porém, o complemento de uma macho foi usado na citometria de fluxo; (B) *A. montensis* 2n=24; (C) *A. cursor*, 2n=15 com rearranjo complexo envolvendo ACU 1, ACU 3 e ACU 1+3, ACU 2 heterozigoto e ACU 4 acrocêntrico; (D) *Akodon* sp. n., 2n=10 com ASP 3 heterozigoto.

Figura 2. Gráficos das citometrias de fluxo dos cariótipos das espécies de *Akodon*. Os cromossomos foram separados, quando possível, pela quantidade de DNA e pela razão de pares de base AT/CG após coloração com Hoechst 33258 (eixo vertical) and cromomicina A (eixo horizontal). (A) *A. paranaensis*, $2n=44$ (B) *A. cursor*, $2n=15$ (C) *A. cursor*, $2n=14$ (D) *Akodon* sp. n., $2n=10$.

A

Figura 3. Continua

B

Figura 3. Continua

C

Figura 3. Idiogramas dos cariótipos das espécies de *Akodon*, baseado nos padrões de bandas G. Os sítios de hibridação e o números das sondas estão indicados dos lados dos cromossomos – APA a direita, ACU e/ou ASP a esquerda. (A) *Akodon montensis* 2n=24; (B) *Akodon cursor*, 2n=15; (C) *Akodon* sp. n., 2n=10. ● representa as regiões organizadoras de nucléolo (RONS). H = heterocromatina. ☆ = sequências intersticiais: teloméricas (amarelo) e correspondentes a ACU 7 e/ou APA 17 (verde).

Figura 4. Hibridação em *A. montensis*, $2n=24$ (A, D, G); *A. cursor*, $2n=15$ (B, E, H) e *Akodon* sp. n., $2n=10$ (C, F, I) usando sondas APA 21 (A-C), APA X (D-F) e APA Y (G-I). Em cada figura está indicado no canto direito superior a sonda usada em cada hibridação e em *itálico* o cromossomo hibridado.

Figure 5. (A-C) Metáfases de *A. montensis*, 2n=24 (D-F) cromossomos ACU 1+3 e ACU 3 de *A. cursor*, 2n=15 pintadas com APA 1 (A e D), APA 20 (B e E) e APA 3 (C e F). Em cada figura está indicado no canto direito superior a sonda usada em cada hibridação e em *itálico* o cromossomo hibridado. Deve existir a perda ou inativação de centrômero de APA 1 em *A. montensis* (A) e em *A. cursor* (D).

Figura 6. Sinais de hibridação obtidos por nove diferentes sondas de *A. paranaensis* (APA) ao longo de todo o cromossomo ACU 1+3. A sonda que gerou cada padrão está indicada logo abaixo da figura do cromossomo ACU 1+3 hibridado. Note os dois sinais de hibridação gerados por APA 20.

Figura 7. (A-C) Cromossomo 5 de *A. cursor* (ACU 5) pintado com: (A) APA 9 que hibridou na parte distal ACU 5p; (B) APA 8 que hibridou na região proximal pericentromérica de ACU 5 p e q; (C) APA 19 que hibridou na parte distal de ACU 5q. Em cada figura está indicada no canto direito superior a sonda usada em cada hibridação. Deve existir inativação ou perda da sequência centromérica de APA 9 e APA 19. O centrômero funcional em ACU 5 é homólogo a APA 8, após reposicionamento ou inversão pericêntrica.

Figura 8. Sinais de hibridação obtidos por nove sondas diferentes de *A. paranaensis* (APA) ao longo de todo o cromossomo ASP 1. A sonda que gerou cada padrão está indicada logo abaixo da figura do cromossomo ASP 1 hibridado. Note os dois sinais de hibridação gerados por APA 19 e APA 17.

Figura 9. FISH multicolor realizada no complemento de *Akodon* sp. n., $2n=10$ usando sondas de *A. cursor*. Homologia com o complemento de ACU é indicada a direita de cada segmento colorido. * indica os cromossomos de ACU que apresentaram mais de um segmento homólogo, sendo ACU5 cuja sonda hibridou nos cromossomos ASP 1 e ASP 3; ACU 1 cuja sonda hibridou em duas regiões de ASP 1 e ACU 2 cuja sonda hibridou em dois segmentos de ASP 3.

Figura 10. Sinais gerados pela hibridação da sonda ACU 5 no complemento de *Akodon* sp. n. (A) FISH de cor única (vermelho) (B) FISH multicolor – ACU 1 rosa; ACU 2 turquesa; ACU 3 azul; ACU 4 branco; ACU 5 amarelo; ACU 6 vermelho; ACU 7 verde. Setas indicam sinais de hibridação correspondentes em (A). Os números de um dos homólogos são indicados nas figuras.

Figura 11. Sondas de ACU que hibridaram em dois segmentos de um mesmo cromossomo de *Akodon* sp. n. (A) ASP 1 hibridado pela sonda ACU 1. (B) ASP 3 hibridado pela sonda ACU 2. No canto direito superior estão indicados os números das sondas ACU usadas nas hibridações e, em itálico, abaixo, os pares cromossômicos de *Akodon* sp. n. Os sinais de hibridação são mostrados em cor rosa.

Figura 12. (A) Metáfase de *Akodon* sp. n. pintada com ACU 7. (B) ASP 1 a esquerda hibridado com sondas de sequência telomérica e a direita com FISH multicolor; (C) ASP 3 a esquerda hibridado com sondas de sequência telomérica e a direita com FISH multicolor. Na FISH multicolor as cores correspondem: Azul a ACU 1, Verde a ACU 7, Laranja ACU 5, Vermelho ACU 6 e Branco a ACU 2. Note que a ITS em (B) corresponde a região pericentromérica que é heterocromática e a um segmento de ACU 5 (laranja) e em (C) ao sítio de junção entre ACU 2 (branco) e ACU 5 (laranja). Os sinais em ASP 1 em (A) correspondem aos sinais em verde em (B).

Figura 13. Cariótipo de *Akodon* sp. n. pintado com sonda de ASP X. Note que além do cromossomo X totalmente marcado as regiões pericentroméricas de ASP 1 e ASP 2 também apresentam sinais de hibridação.

Figura 14. (A) Cromossomos ACU 1+3 e ACU 1 pintados com ACU1. Note ausência de homologia entre ACU 1 e a região pericentromérica, indicada pela seta. (B) Cromossomos ACU 1+3 e ACU 3 pintados com APA 20. Note que o sinal pontual na região pericentromérica de ACU (1+3)q, indicado pela seta, confirma a manutenção de todo ACU 3 após inversão e fusão cêntrica.

Figura 15. Sonda do cromossomo acrocêntrico APA 3 pintando (A) *A. montensis* AMO 1p; (B) *A. cursor* ACU 3p; (C) região pericentromérica de ASP 2. Note a inversão pericêntrica ou reposicionamento de centrômero em ASP 2. As setas indicam as posições dos centrômeros.

Figura 16. Cromossomo ASP 1 à esquerda em coloração por DAPI em (A) e (B); e, à direita, em (A) pintado com sonda de ACU7 e em (B) pintado com APA 17. As setas indicam os sítios próximos que são pintados pelas duas sondas.

Figura 17. Hibridação da sonda do cromossomo ASP 4 em metáfase de *Akodon* sp. n. Nenhuma marcação além de ASP 4 é observada.

III. 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHRISTOFF, A. U. 1997. Contribuição à sistemática das espécies do gênero *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) do leste do Brasil: estudos anatômicos, citogenéticos e de distribuição geográfica. PhD Thesis. Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CHOWDHARY, B. P., E T. RAUDSEPP. 2001. Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. *Methods in Cell Science* 23: 37–55.
- DEUVE, J. L., N. C. BENNETT, P. C. M. O'BRIEN, M. A. FERGUSON-SMITH, E C. G. FAULKES. 2006. Complex evolution of the X and Y autosomal translocations in the giant mole-rat, *Cryptomys mechowii* (Bathyergidae). *Chromosome Research*. 14:681-691.
- FAGUNDES V., A. M. VIANNA-MORGANTE, E Y. YONENAGA-YASSUDA. 1997a. Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of a polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent *Akodon cursor* (2n=14, 15 and 16). *Chromosome Research* 5:228-232.
- FAGUNDES V., J. M. SCALZI-MARTIN, K. SIMS, J. HOZIER, E Y. YONENAGA-YASSUDA. 1997b. ZOO-FISH of a microdissection DNA library and between the Brazilian rodents *Akodon cursor* and *A. montensis*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 78:224-228.
- FAGUNDES V., A. U. CHRISTOFF, E Y. YONENAGA-YASSUDA. 1998. Extraordinary chromosomal polymorphism with 28 different karyotypes in the neotropical species *Akodon cursor* (Muridae, Sigmodontinae), one of the smallest number in rodents (2n=16, 15 and 14). *Hereditas*: 129:263-247.
- FERGUSON-SMITH, M. A., F. YANG, E P. C. M. O'BRIEN. 1998. Comparative mapping using chromosome sorting and painting. *ILAR Journal* 39: 68–76.
- FORD, C. E., E J. L. HAMERTON. 1956. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol* 31: 247-251.
- GEISE, L., F. C. CANAVEZ, E H. N. SEUÁNEZ. 1998. Comparative karyology in *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) from Southwestern Brazil. *Journal of Heredity* 89:158-163.
- GLAS, R., A. A. DE LEO, M. L. DELBRIDGE, K. REID, M. A. FERGUSON-SMITH, P. C. M. O'BRIEN, M. WESTERMAN, E J. A. M. GRAVES. 1999. Chromosome painting in marsupials: genome conservation in the kangaroo family. *Chromosome Research*: 7: 167- 176.
- HASS, I., J. I. SBALQUEIRO, E S. MULLER. 2008. Chromosomal phylogeny of four Akodontini species (Rodentia, Cricetidae) from Southern Brazil established by Zoo-FISH using *Mus musculus* (Muridae) painting probes. *Chromosome Research* 16(1): 75-88.
- KASAHARA, S., E Y. YONENAGA-YASSUDA. 1984. A progress report of cytogenetic data on Brazilian rodents. *Revista Brasileira de Genética* 63: 156-159.

- LI, T., P. C. M. O'BRIEN, L. BILTUEVA, B. FU, J. WANG, W. NIE, M. A. FERGUSON-SMITH, A. S. GRAPHODATSKY, E. F. YANG. 2004. Evolution of genome organizations of squirrels (Sciuridae) revealed by cross-species chromosome painting. *Chromosome Research*. 12:317-35.
- MÜLLER, S., R. STANYON, P. C. M. O'BRIEN, M. A. FERGUSON-SMITH, R. PLESKER, E. J. WIENBERG. 1999. Defining the ancestral karyotype of all primates by multidirectional chromosome painting between tree shrews, lemurs and humans. *Chromosoma*. 108: 393-400.
- RODRIGUEZ, V., S. LIAMBI, A. POSTIGLIONI, K. GUEVARA, G. RINCON, G. FERNÁNDEZ, B. MERNIES E, M. V. ARRUGA. 2002. Localization of aphidicolin-induced break points in Holstein-friesian cattle (*Bos taurus*) using RBG-banding. *Genetics Selection Evolution*. 39: 40-50.
- ROBINSON, T. J. E, F. F. ELDER. 1987. Multiple common fragile sites are expressed in the genome of the laboratory rat. *Chromosoma* 96: 45-49.
- RONNE, M. 1992. Putative fragile sites in the horse karyotype. *Hereditas*. 117: 127-136.
- RUIZ-HERRERA, A., M. PONSÁ, F. GARCIA, J. EGOZCUE E, M. GARCIA. 2002. Fragile sites in human and *Macaca fascicularis* are breakpoints in chromosome evolution. *Chromosome Research*. 10: 33-44.
- RUIZ-HERRERA, A., J. CATRESANA E, T. J. ROBINSON. 2006. Is mammalian evolution driven by regions of genome fragility? *Genome Biology*. 7: R115.
- RUIZ-HERRERA, A. E, T. J. ROBINSON. 2007. Chromosomal instability in Afrotheria: fragile sites, evolutionary breakpoints and phylogenetic inference from genome sequence assemblies. *BMC Evolutionary Biology*. 7:199.
- SBALQUEIRO, I. J., E. A. P. NASCIMENTO. 1996. Occurrence of *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae) with 14, 15 and 16 chromosome cytotypes in the same geographic area in South Brazil. *Brazilian Journal of Genetics* 19 (4):565-569.
- SILVA, M. J. J., E. Y. YONENAGA-YASSUDA. 1998. Karyotype and chromosomal polymorphism of an undescribed *Akodon* from Central Brazil, a species with the lowest known diploid chromosome number in rodents. *Cytogenetic and Cell Genetic* 81:46-50.
- SILVA, M. J. J., J. L. PATTON, E. Y. YONENAGA-YASSUDA. 2006. Phylogenetic relationships and karyotype evolution in the sigmodontine rodent *Akodon* with (2n=10 and 2n=16) from Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 29 (3):469-474.
- SMITH, M. F., E. J. L. PATTON. 2007. Molecular phylogenetics and diversification of South American grass mice, genus *Akodon*. Pp 827-858 in *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson* (D. A. Kelt, E. P. Lessa, J. Salazar-Bravo and J. Patton, eds.). University of California Publications in Zoology, University of California Press, California.

- STONE, D. N., K. E. STEPHENS E, J. DOLES. 1993. Folate-sensitive and aphidicolin-inducible fragile sites are expressed in the genome of the domestic cat. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 65: 130-134.
- TELENIUS, H., A. PELMEAR, E A. TUNNACLIFFE. 1992. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 4: 257–263.
- TIAN, Y, W. NIE, J. WANG, M. A. FERGUSON-SMITH, E F. YANG. 2004. Chromosome evolution in bears: reconstructing phylogenetic relationships by cross-species chromosome painting. *Chromosome Research* 12: 55-63.B
- VENTURA, K., M. J. J. SILVA, V. FAGUNDES, U. A. CHRISTOFF, E Y. YONENAGA-YASSUDA. 2006. Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG)_n arrays in heterochromatic and aechromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). *Cytogenetics and Genome Research* 115 (2): 169-175.
- VIEIRA, A., M. I. ORTIZ, E. OINNA-SENN, G. DALMASSO, J. L. BELLA, E J. A. LISANTI. 2004. Chromosomal localization of telomeric sequences in three species of *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae). *Cytogenetics and Genome Research* 107: 99–10.
- YANG, F. E, S. E. LONG. 1993. Folate sensitive commom fragile sites in chromosomes of the domestic pig (*Sus scrofa*). *Research in Veterinary Science* 55: 231-235.
- YANG, F., N. P. CARTER, L. SHI, E M. A. FERGUSON-SMITH. 1995. A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma* 103: 642–652.
- YANG, F., E. Z. ALKALAEVA, P. L. PERELMAN, A. T. PARDINI, W. R. HARRISON, P. C. M. O'BRIEN, B. FU, A. S. GRAPHODATSKY, M. A. FERGUSON-SMITH, E T. J. ROBINSON. 2003. Reciprocal chromosome painting among human, aardvark, and elephant (superorder Afrotheria) reveals the likely eutherian ancestral karyotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 100:1062-1066.
- YONENAGA, Y. 1972. Chromosomal polymorphism in the rodent *Akodon arviculoides* ssp. (2n=14) resulting from two pericentric inversions. *Cytogenetics* 11: 448-499.
- YONENAGA, Y., S. KASAHARA, E. J. C. ALMEIDA, E A. L. PERACCHI. 1975. Chromosomal banding patterns in *Akodon arviculoides* (2n=14), *Akodon* sp. (2n=24 and 25), and two male hybrids with 19 chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetic* 15: 388-399.
- YONENAGA-YASSUDA, Y. 1979. New karyotypes and somatic and germ-cell banding in *Akodon arviculoides* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenetics and Cell Genetic* 23:241-249.
- YONENAGA-YASSUDA, Y., M. DE F. L. ASSIS, S. KASAHARA, M. L. L'ABBATE, E M. J. SOUZA. 1983. Nucleolar organizer regions in *Akodon arviculoides* (Cricetidae, Rodentia): evidence for activity of rDNA genes in both X chromosomes of females. *Cytogenetic and Cell Genetics*. 35: 143-147.

YONENAGA-YASSUDA, Y., M. DE F. L. ASSIS, E S. KASAHARA. 1992. Variability of the nucleous organizer regions and the presence of the rDNA genes in the supernumerary chromosome of *A. aff. arviculoides*. *Caryologia*. 45:163-174.

IV. RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE *DELTAMYS* SP.: UM NOVO CARIÓTIPO COM 2N=40 E NF=40, XX: XY PROCEDENTE DA REGIÃO SUL DO BRASIL

IV. 1. ABSTRACT

Member of the tribe Akodontini, *Deltamys* Thomas 1917 is a poorly studied and rarely collected taxon. Based on morphological or genetic characters, some authors considered *Deltamys* as a full genus while others regarded it as subgenus or synonym of *Akodon*. The single described species, *Deltamys kempfi* presents a basic karyotype with $2n=37$ in males and $2n=38$ in females, $FN=38$, and with sex determination system of the type $X_1X_1X_2X_2: X_1X_2Y$. A cytogenetic character that distinguishes *Deltamys* from *Akodon* is the presence of a small metacentric pair marker in *Akodon*. A karyotype with $2n=40$ and $FN=40$; XX: XY was related to the genus *Akodon*, but as in *Deltamys kempfi*, this complement does not present the small metacentric pair. Phylogenetic analyses of maximum parsimony and maximum likelihood based on sequences of the mitochondrial gene cytochrome b evidenced the monophyly of a clade grouping specimens of *Akodon* sp. $2n=40$ and monophyly of a clade containing specimens of *Deltamys kempfi*. Besides that, the analyses showed that *Akodon* sp. is the sister-group of *Deltamys kempfi*, thus more related to this genus than to other species of *Akodon* and suggesting the placement of specimens with $2n=40$ *Deltamys*. The genus *Deltamys* is, thus, more diverse than previously thought, grouping two lineages: *Deltamys kempfi*, $2n=37-38$; $X_1X_1X_2X_2: X_1X_2Y$ and *Deltamys* sp. $2n=40$, XX: XY, with a marked genetic divergence of 12,1% between them.

Key-words: *Deltamys*, cytochrome b, cytogenetics, phylogenetics, sex chromosomes.

IV. 2. RESUMO

Pertencente a tribo Akodontini, *Deltamys* Thomas 1917 é um táxon pouco estudado e que é raramente capturado. Utilizando-se de caracteres morfológicos ou genéticos, alguns autores consideram *Deltamys* como um gênero pleno enquanto outros acreditaram que esse devesse ser referido como subgênero ou sinônimo de *Akodon*. A única espécie formalmente descrita é

Deltamys kempi que apresenta cariótipo básico com $2n=37$ nos machos e $2n=38$ nas fêmeas, $NF=38$, com sistema de determinação de sexo do tipo $X_1X_1X_2X_2: X_1X_2Y$. Uma característica citogenética que distingue *Deltamys* de *Akodon* é a presença de um pequeno par metacêntrico marcador em *Akodon*. Um cariótipo com $2n=40$ e $NF=40$; $XX: XY$ foi relacionado ao gênero *Akodon* porém, como em *Deltamys kempi*, esse complemento não apresenta o pequeno par metacêntrico. As análises filogenéticas de máxima parcimônia e máxima verossimilhança baseadas em sequências do gene mitocondrial do citocromo *b* evidenciaram o monofiletismo dos espécimens de *Akodon* sp. $2n=40$, e o monofiletismo de *Deltamys kempi*. Além disso, revelaram que *Akodon* sp. é grupo irmão de *Deltamys kempi*, estando mais relacionado a este último gênero do que às demais espécies de *Akodon*, sugerindo a inclusão dos espécimens portadores do cariótipo com $2n=40$ em *Deltamys*. Dessa forma, o gênero *Deltamys* se mostrou mais diverso do que até então se tinha conhecimento, agrupando duas linhagens: *Deltamys kempi*, $2n=37-38$; $X_1X_1X_2X_2: X_1X_2Y$ e *Deltamys* sp. $2n=40$, $XX: XY$, que apresentam entre si uma marcante divergência genética que chega a 12,1%.

Palavras-chave: *Deltamys*, citocromo *b*, citogenética, cromossomos sexuais, filogenia.

IV. 3. INTRODUÇÃO

Pertencente a tribo Akodontini, *Deltamys* Thomas 1917 é um táxon pouco estudado e desde sua descrição original tem sua classificação sistemática controversa. Além do mais, este roedor é raramente capturado. Segundo Montes e col. (2008) desde a primeira captura feita por R. Kemp no início do século XX até a publicação de Udrizar Sauthier e col. (2005), apenas 117 espécimens de *D. kempi* haviam sido reportados. Se somados os apresentados por Montes e col. (2008) esse número sobe para 145 (Thomas, 1917; Massoia, 1964; Fronza e col., 1981; Sbalqueiro e col., 1984; Castro e col., 1991; Bianchini e Delupi, 1994; González e Massoia, 1995; D'Elia e col., 2003), sendo que 70 deles foram capturados no Brasil (Montes e col. 2008). *Deltamys kempi*, ocorre nas áreas costeiras, incluindo áreas de campo alagadas, embora não apresente adaptações externas especializadas para a vida semi-aquática (Massoia 1964; González e Massoia 1995). Sua distribuição vai do nordeste da Argentina, passando pelo Uruguai e estendendo-se pelo litoral Atlântico do estado brasileiro do Rio Grande do Sul

(Massoia, 1964; Fronza e col., 1981; Castro e col., 1991; Bianchini e Delupi, 1994; González e Massoia, 1995; González e Pardiñas 2002; Montes e col., 2008, Teta e col. 2008).

Utilizando-se de caracteres morfológicos ou genéticos, alguns autores consideram *Deltamys* como um gênero pleno (Thomas, 1917; Gyldenstolpe, 1932; Massoia, 1980, Bianchini e Delupi, 1994; González e Massoia, 1995, D'Elia e col., 2003; Musser e Carleton, 2005, Smith e Patton, 2007; Montes e col. 2008), enquanto outros acreditam que esse deva ser referido como subgênero ou sinônimo de *Akodon* (ex. Ellerman, 1941; Cabrera, 1961; Massoia, 1964; Honacki e col. 1982; Reig, 1987; Musser e Carleton, 1993; Smith e Patton, 1999). Até agora, uma única espécie, *Deltamys kemp*i Thomas, 1917 foi descrita, embora duas subespécies sejam consideradas. As populações da Argentina correspondem a *D. k. kemp*i enquanto que as do Uruguai a *D. k. langguthi*; as populações com ocorrência no Brasil tem sido relacionadas a *Deltamys kemp*i *langguthi* (González e Massoia, 1995).

Em estudo morfológico conduzido por González e Pardiñas (2002), *Deltamys kemp*i pouco se distinguiu externamente, com base na coloração geral das partes dorsais e nas escamas epidérmicas da cauda, das espécies de *Akodon* que apresentam tamanho do corpo mediano. Para Gyldenstolpe (1932) o crânio é estreito e menor do que em *Akodon* Thomas 1917, particularmente o rostro, região anterior dos ossos frontais e arcos zigomáticos.

As análises filogenéticas baseadas em dados moleculares de sequência do gene mitocondrial citocromo *b*, apresentadas por D'Elia e col. (2003) mostraram que *Deltamys* é grupo irmão do clado que contém as espécies de *Akodon*. Apesar dessa relação apresentar baixo suporte de *bootstrap* os autores entenderam que *Deltamys* merece o status de gênero pleno.

A presença de um pequeno par de autossomos metacêntricos nas espécies do gênero *Akodon* (Bianchi e col. 1971; Yonenaga e col., 1975; Lobato e col., 1982; Geise e col. 1998; Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998a; Christoff e col., 2000) é o que distingue citogeneticamente as duas entidades taxonômicas uma vez que *Deltamys* não apresenta tal par marcador (Fronza e col., 1981; Sbalqueiro e col. 1984; Castro e col., 1991).

Deltamys apresenta cariótipo variação de cariótipo de $2n=35$ a $2n=38$, $NF=38$ considerando-se os cromossomos sexuais (Castro e col., 1991), e sistema de determinação de sexo do tipo $X_1X_1X_2X_2$: X_1X_2Y (Sbalqueiro e col. 1984), sendo o cariótipo básico $2n=37$ nos machos e $2n=38$ nas fêmeas. Rearranjos Robertsonianos em autossomos, que podem estar presentes em htero e homozigose ($2n=35$ e $2n=36$) e que são restritos a localidades distintas,

são descritos para *Deltamys* assim como translocação Y-autossomo para os cariótipos dos machos (Sbalqueiro e col. 1984; Castro e col. 1991).

Um cariótipo com $2n=40$ e $NF=40$, considerando-se também os cromossomos sexuais e com determinação de sexo do tipo XX: XY, que como em *Deltamys kempi*, não apresenta o pequeno par metacêntrico característico de *Akodon*, foi apresentado por Christoff e col. (2003) e por Ventura (2004) como pertencente a espécimens do gênero *Akodon*. O objetivo do atual estudo foi estabelecer as relações filogenéticas dos espécimens portadores desse cariótipo $2n=40$ e $NF=40$, com espécies de *Akodon*, *Deltamys* e gêneros relacionados, com base em sequências do gene mitocondrial do citocromo *b*, para fornecer novos dados para a citotaxonomia do grupo.

IV. 4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidas sequências completas do gene mitocondrial do citocromo *b* de quatro espécimens de *Akodon* sp., $2n=40$ coletados em áreas de campo úmido próximas a remanescentes de Floresta Ombrófila Mista em Esmeralda, RS (Fig.1). As sequências completas do gene mitocondrial do citocromo *b* com 1140pb de 4 espécies de *Akodon*, *Deltamys kempi* e *Thaptomys nigrita*, também foram obtidas como mostra a Tabela 1. Além disso, foram utilizadas na análise sequências acessadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabela 2).

Tabela 1. Exemplares utilizados nas análises filogenéticas que tiveram a sequência do gene do citocromo *b* obtidas para este estudo, com suas respectivas localidades e número diplóide

Gênero	Espécie	Identificação	Localidade	Estado	2n
<i>Akodon</i>	<i>lindberghi</i>	CIT 1538	Juiz de fora	MG	42
<i>Akodon</i>	<i>serrensis</i>	CIT 358	Piraquara	PR	46
<i>Akodon</i>	sp. n	CIT 743	Vila Rica	MT	10
<i>Akodon</i>	sp	CIT 945	Esmeralda	RS	40
		CIT 946	Esmeralda	RS	40
		CIT 944	Esmeralda	RS	40
		CIT 947	Esmeralda	RS	40
<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	AC 876	Tapes	RS	ND
		No. 1	Arroio Grande	RS	ND
		FP 105	Arroio Grande	RS	ND
<i>Thaptomys</i>	sp.	CIT 913	Una	BA	50
<i>Thaptomys</i>	<i>nigrita</i>	LGA977	PEPA-Domingos Martins	ES	52
		II - M077	Ortigueira	PR	52

Nota: ES=Espírito Santo; MG=Minas Gerais; MT=Mato Grosso; SP=São Paulo; PR=Paraná; RS=Rio Grande do Sul; 2n=número diplóide; ND=não disponível

Tabela 2. Sequências do gene do citocromo *b* que foram acessadas pelo GenBank

Gênero	Espécie	Número GenBank
<i>Akodon</i>	<i>albiventer</i>	AY494838
<i>Akodon</i>	<i>cursor</i>	AF184051
<i>Akodon</i>	<i>mimus</i>	M35710
<i>Akodon</i>	<i>molis</i>	U03546
<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	AF184055
<i>Akodon</i>	<i>mystax</i>	AF184054
<i>Akodon</i>	<i>paranaensis</i>	AY195866
<i>Akodon</i>	<i>reigi</i>	AY195865
<i>Akodon</i>	<i>serrensis</i>	AF184058
		AY273908
<i>Akodon</i>	<i>siberiae</i>	AY273909
<i>Akodon</i>	<i>torques</i>	M35700
<i>Bucepattersonius</i>	<i>iheringi</i>	AF108667
<i>Bucepattersonius</i>	<i>soricinus</i>	AY277486
<i>Deltamys</i>	<i>kempi kempi</i>	AY195860
<i>Deltamys</i>	<i>kempi langguth</i>	AY195862
<i>Necomys</i> *	<i>urichi</i>	AY273919
<i>Thalpomys</i>	<i>cerradensis</i>	AY273915

* Segundo Musser e Carleton (2005), mas referido como *Bolomys* no NCBI (GenBank).

O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de fígado ou músculo, preservadas em álcool ou em ultrafreezer (-70°C), segundo protocolo descrito por Fetzner (1999).

Para ampliar os fragmentos do gene mitocondrial do citocromo *b* foram empregados, para a realização do PCR, os pares de *primers* MVZ 05 e MVZ 16; MVZ 127 e MVZ 14 ou MVZ 127 e MVZ 108 desenvolvidos pelo *Museum of Vertebrate Zoology* (MVZ) da Universidade da Califórnia, Berkeley, EUA (Smith e Patton, 1993, 1999). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram feitas a um volume de 25 µl para cada amostra, com reagentes nas seguintes quantidades: 4,0µl de dNTPs (5mM); 2,5 µl de Buffer 10x; 2,5 µl de MgCl₂ (25mM); 2,0 µl de cada *primer*; 9,5 µl de H₂O deionizada; 0,5 µl de *Taq* DNA Polymerase Recombinant (5 U/µl) e 2,0 µl de DNA; sob o seguinte regime de temperaturas: desnaturação inicial 94°C/5 min; 40 ciclos de desnaturação 94°C/30 s, hibridação 48°C/45 s, extensão 72°C/1min; e extensão final a 72°C/10 min.

A limpeza dos produtos de PCR foi feita com o kit ExoSAP-IT™ produzido pela USB Corporation, seguindo as instruções do fabricante. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o ABI PRISM® Big Dye™ Terminators v 3.0 kit (Applied Biosystems) usando o regime de temperaturas: 25 ciclos de 96°C/10 s, 50°C/5 s, 60°C/4 min. As amostras foram

sequeenciadas usando sequenciador automático ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (PE Applied Biosystems Foster City, CA, USA).

As sequências de cadeias leve e pesada obtidas após o sequenciamento foram editadas e alinhadas manualmente e comparadas entre si utilizando o programa Sequence Navigator™ (Applied Biosystems). Foram feitos alinhamentos automáticos usando o programa Clustal X. O quadro de leitura das sequências obtidas foi inferido utilizando o programa MacClade, buscando minimizar códons de parada.

As análises filogenéticas foram executadas no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003) utilizando-se os métodos de reconstrução filogenética de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV). As análises usando MP ocorreram reconstruindo-se uma filogenia através de busca heurística por adição por passos (*stepwise addition*) com algoritmo de rearranjo de ramos do tipo TBR (tree bisection and reconnection) com 10.000 réplicas. A análise de MV foi conduzida usando-se o modelo apropriado de substituição de nucleotídeos que foi selecionado pelo Modeltest (versão 3.06, Posada e Crandall, 1998); os parâmetros desse modelo foram utilizados para se reconstruir a filogenia através de busca heurística por adição por passos (*stepwise addition*) com algoritmo de rearranjo de ramos do tipo TBR com 1.000 réplicas.

O suporte dos nós recuperados nas árvores de MP e de MV foram estimados por *bootstrap* (Felsenstein, 1985) utilizando-se PAUP*. Os valores de suporte foram obtidos com re-amostragem dos dados com 1000 (MP) e 500 (MV) pseudo-réplicas. Nas árvores de MP foi usado também o índice Bremer como medida de suporte (Bremer, 1994), calculado usando o programa TreeRot 2.0 (Sorenson, 1999). *Brucepattersonius* foi usado para enraizar as árvores. As sequências acessadas do GenBank tem seus números de acesso entre parênteses listados nos cladogramas apresentados.

A matriz de distância genética par a par, corrigida pelo modelo de máxima verossimilhança, entre os haplótipos dos exemplares de *Akodon* sp. e de *Deltamys kemp*i foi gerada no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003).

Foi realizada a comparação entre os cariótipos de *Akodon* sp. 2n=40 (Ventura, 2004) e de *Deltamys kemp*i (Sbalqueiro e col., 1984), ambos apresentados em coloração diferencial de bandas CBG.

IV. 5. RESULTADOS

Foram encontrados três haplótipos de *Akodon* sp. em nossa amostra. Os exemplares CIT 944 e CIT 945 compartilham da mesma sequência.

A matriz gerada reuniu 31 sequências completas do gene mitocondrial citocromo *b* (Tabelas 1 e 2) de *Akodon* sp., 2n=40 (Ventura, 2004), outras espécies de *Akodon*, *Deltamys kemp*i e gêneros relacionados totalizando 1140pb dos quais, 715 são constantes, 49 não informativos e 376pb são informativos para a parcimônia.

A análise de MP recuperou 3 árvores mais parcimoniosas com comprimento de 1421 passos, índice de retenção (IR) 0,66 e índice de consistência (IC) 0,38. As relações filogenéticas recuperadas pela MP são representadas na árvore de consenso estrito acrescida dos valores de *bootstrap* e índices de Bremer (Fig. 2).

Para MV, o modelo mais adequado encontrado através do Modeltest 3.06 (Posada e Crandall, 1998) foi o modelo TrN+I+G: (Tamura-Nei, 1993) ou Modelo de substituição de DNA de Tamura-Nei, que considera três tipos de substituições (transversões e duas classes de transições), uma proporção de sítios invariáveis e distribuição gama entre as sequências. Na figura 3 é apresentada a árvore de máxima-verossimilhança, acrescida dos valores de *bootstrap*.

Os exemplares de *Akodon* sp. 2n=40 aparecem, em ambos os métodos de reconstrução filogenética, como grupo irmão de *Deltamys kemp*i (clado A). Esse agrupamento possui valor de *bootstrap* de 95% e índice de Bremer de 12 em MP e valor de *bootstrap* de 98% em MV. Assim, ambas as análises recuperaram, com altos valores de suporte o clado A e dois subclados irmãos entre si: um incluindo os representantes de *D. kemp*i, e outro englobando *Akodon* sp. 2n=40. Tanto MP quanto MV agruparam o clado A com dois outros clados formados por espécies de *Akodon*, comuns em ambas as análises, apesar de suportado por baixos valores de *bootstrap* e Bremer. Além disso, em MV o clado A foi agrupado com um grupo de espécies de *Akodon* referido como clado B, formando nesta análise um clado mais inclusivo chamado de clado C. A análise de MP não recuperou o clado C, resultando numa politomia envolvendo os clados A, B e o clado com as demais espécies de *Akodon* com exceção que *Akodon serrensis*. Este, por sua vez, apareceu em ambas as reconstruções como a espécie mais basal dentro do clado marcado *, representando a linhagem irmã do grupo monofilético formado pelos clados A, B e espécies do complexo *A. cursor* mais *A. lindberghi*.

Em MP, o clado ((*Thaptomys Necromys*) *Thalpomys*) resultou como grupo irmão do clado formado pelas espécies de *Akodon* e *Deltamys kempi* mais *Akodon* sp 2n=40 (clado A). Já em MV, estes três gêneros não resultaram em um grupo monofilético, sendo *Thalpomys* o grupo irmão do clado composto por *Akodon* e *Deltamys kempi* mais *Akodon* sp 2n=40 (clado A). Embora as relações entre estes gêneros seja diferente nas duas análises e seus índices de suporte serem baixos, o clado formado por *Necromys*, *Thalpomys*, *Thaptomys* e as espécies de *Akodon* e *Deltamys kempi* mais *Akodon* sp 2n=40 (clado A) foi recuperado em ambas as análises com suporte máximo de *bootstrap*, além do elevado valor de índice de Bremer no caso da MP.

A distância genética entre os exemplares de *Akodon* sp. variou de 0% a 0,9%, e entre os exemplares de *Deltamys kempi* variou de 0,09% a 1,4%. Entre os exemplares das duas linhagens a variação foi de 11% a 12,1% (Tabela 3).

Tabela 3. Diagonal inferior: matriz de distância genética, em porcentagem, corrigida entre os exemplares de *Deltamys*.

	CIT944	CIT945	CIT946	CIT947	AY195860	AY195862	AC876	FP105	No1
<i>Akodon</i> sp. CIT944	0								
<i>Akodon</i> sp. CIT945	0,00	0							
<i>Akodon</i> sp. CIT946	0,009	0,008	0						
<i>Akodon</i> sp. CIT947	0,003	0,004	0,008	0					
<i>D. kempi</i> AY195860	0,116	0,12	0,12	0,119	0				
<i>D.kempi</i> AY195862	0,118	0,121	0,12	0,12	0,009	0			
<i>D.kempi</i> AC876	0,113	0,118	0,119	0,11	0,013	0,014	0		
<i>D.kempi</i> FP105	0,111	0,115	0,116	0,114	0,005	0,006	0,009	0	
<i>D.kempi</i> No1	0,118	0,121	0,121	0,12	0,002	0,003	0,014	0,006	0

A comparação entre os complementos, em coloração diferencial de bandas CBG, de *Akodon* sp., 2n=40 e NF=40 e *D. kempi*, 2n=37-38 e NF=38, considerando-se os cromossomos sexuais (Sbalqueiro e col., 1984) revelou similaridades e particularidades entre os dois cariótipos (Fig. 4). Ambos cariótipos são compostos exclusivamente por elementos autossômicos acrocêntricos decrescentes em tamanho. Em *Deltamys kempi*, o cromossomo X original é um acrocêntrico grande e o Y é translocado em um autossomo e apresenta forma

submetacêntrica sendo o maior cromossomo do complemento. Em *Akodon* sp. o X é um acrocêntrico médio e o Y um pequeno acrocêntrico, o menor do complemento. Ambas espécies apresentam heterocromatina constitutiva na região pericentromérica dos autossomos, porém em *D. kemp*i esses blocos heterocromáticos são mais conspícuos. Entre os cromossomos sexuais essa diferença em relação a quantidade de heterocromatina constitutiva é bem mais marcante. Em *Deltamys kemp*i o X original apresenta um grande bloco heterocromático proximal que representa mais do que 41% deste cromossomo que por sua vez corresponde a 7.8% do lote haplóide e, o Y possui o braço curto totalmente heterocromático. Em *Akodon* sp. o cromossomo X apresenta um pequeno bloco heterocromático pericentromérico e o Y diminuto apresenta o braço longo heterocromático.

IV. 6. DISCUSSÃO

As análises filogenéticas apresentadas evidenciaram, com altos valores de suporte, o monofiletismo dos espécimens de *Akodon* sp. $2n=40$, assim como o monofiletismo de *Deltamys kemp*i.

Akodon sp. foi revelado como grupo irmão de *Deltamys kemp*i e desta forma é mais relacionado a este último gênero do que às demais espécies de *Akodon* o que torna mais adequado a inclusão dos espécimens portadores do cariótipo com $2n=40$ no gênero *Deltamys*. Assim, consideramos *Akodon* sp., $2n=40$ como *Deltamys* sp. $2n=40$.

Dessa forma, o clado A, recuperado nas análises (Fig 2 e 3) representa o gênero *Deltamys* que agrupa duas linhagens com os cariótipos básicos: *Deltamys kemp*i, $2n=37$ nos machos e 38 nas fêmeas; $X_1X_1X_2X_2$: X_1X_2Y e *Deltamys* sp. $2n=40$, XX : XY , e que apresentam entre si uma marcante divergência genética que chega a 12,1%. Segundo Smith e Patton (2007), a divergência entre *Deltamys* e as 34 espécies de *Akodon* estudadas pelos autores, é em média 16%. Foi constatada, pelas análises filogenéticas e pela comparação citogenética dos complementos e de seus padrões de bandas CBG, uma diversidade genética e cromossômica, de autossomos e sexuais, até então desconhecida para gênero *Deltamys*.

As relações filogenéticas de *Deltamys* ainda não foram esclarecidas. D'Elia (2003) e D'Elia e col. (2003) propuseram que *Deltamys kemp*i fosse o grupo irmão de *Akodon* com exceção de *A. serrensis*. Já análises apresentadas por Smith e Patton (2007) posicionaram *Deltamys* como grupo irmão de *A. mimus* na base de um clado chamado pelos autores de complexo *aerosus* e que corresponde ao clado B recuperado nas análises apresentadas (Fig. 2

e 3). No cladograma de consenso estrito proveniente das três árvores obtidas na análise de MP, *Deltamys* (clado A) resultou em uma politomia com o clado B e o clado contendo as demais espécies de *Akodon* indicando a incerteza acerca das relações desse gênero com *Akodon*. Duas das três árvores mais parcimoniosas agruparam *Deltamys* com as espécies de *Akodon* do clado B, o que é mais próximo do resultado obtido por Smith e Patton (2007); por outro lado a outra árvore fundamental indicou que o clado B é mais próximo das demais espécies de *Akodon* do que de *Deltamys* o que está de acordo com a hipótese de D'Elia (2003) e D'Elia e col. (2003). A hipótese obtida em MV é similar ao resultado apresentado por Smith e Patton (2007) em que *Deltamys* e as espécies do clado B formam um clado monofilético.

A comparação entre os complementos cariotípicos mostrou que como *Deltamys kempi*, *Deltamys* sp. não apresenta um pequeno par metacêntrico, que é observado nas espécies de *Akodon* e tido como par marcador para as espécies do gênero. Desta forma, a ausência de tal par continua sendo uma característica citogenética que distingue *Deltamys* das espécies de *Akodon*. A diferença no NF entre as duas linhagens, NF=40 em *Deltamys* sp. e NF=38 em *D. kempi* deve ser resultado de um rearranjo em tandem entre dois elementos dos complementos apresentados.

As características marcantes entre os dois complementos são, as diferenças nos tamanhos dos blocos pericentroméricos de heterocromatina constitutiva que levam ao aumento de tamanho evidente dos cromossomos sexuais de *Deltamys kempi* em relação aos de *Deltamys* sp. e a diferença quanto ao sistema de determinação de sexo das linhagens. Alguns autores acreditam que a variação na quantidade de heterocromatina constitutiva pode representar um mecanismo potencial para o desencadeamento do processo de especiação em roedores. Em *Nesokia*, por exemplo, foi evidenciada pressão seletiva favorecendo indivíduos com grandes blocos heterocromáticos em X e Y, já que blocos heterocromáticos reduzidos nos cromossomos sexuais levaram à redução de fertilidade em espécimens de *Nesokia indica* (Thelma e col., 1988; Juyal e col., 1989). Entretanto essa questão é polêmica, uma vez que polimorfismos de cromossomos sexuais relativos a quantidade de heterocromatina constitutiva é relativamente comum em grupos de roedores, e. g. roedores brasileiros *Oryzomys*, *Oligoryzomys*, *Nectomys*, *Rhipdomys*, *Thricomys* e *Clyomys* (Souza e Yonenaga-Yassuda, 1982; 1984; Svartman e Almeida, 1993; Leal-Mesquita e col., 1993, Silva e Yonenaga-Yassuda, 1997; Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998b).

IV. 6. 1. Considerações finais

As análises filogenéticas apresentadas por Montes e col. (2008) usando somente o gene do citocromo *b* ou desse combinado com o gene nuclear RAG2, mostraram o gênero *Deltamys* como monofilético com alto suporte. Segundo os autores esse monofiletismo era esperado, uma vez que as análises cromossômicas demonstraram que esse gênero é portador de um caráter único apomórfico em Sigmodontinae, o sistema de cromossomos sexuais múltiplos na forma $X_1X_1X_2X_2$; X_1X_2Y . A configuração meiótica desse sistema previne seus portadores de se reproduzirem com portadores de outros sistemas, incluindo XX; XY. As análises aqui apresentadas sugerem que a espécie *D. kemp* é portadora do sistema de cromossomos sexuais múltiplos e não o gênero *Deltamys* uma vez que foi mostrado que esse agrupa duas linhagens com os dois sistemas de determinação de sexo, além do múltiplo, o do tipo XX: XY.

O presente estudo abordou as relações filogenéticas de *Deltamys kemp* e seu clado irmão *Deltamys* sp. com base nas sequências do gene mitocondrial do citocromo *b*. Os dados gerados contribuíram para a citotaxonomia assim como ampliaram a área de distribuição geográfica do gênero *Deltamys*. Enquanto o monofiletismo desse gênero e de suas duas linhagens pode ser considerado bem definido, as relações dele com os demais akodontinos permanecem não esclarecidas. Parte das hipóteses obtidas no presente estudo corroboram o padrão proposto por D'Elia (2003) e D'Elia e col. (2003) com base em sequências de genes mitocondriais e nucleares, enquanto que as demais hipóteses apontam para o maior relacionamento entre *Deltamys* e o clado B de *Akodon*, que havia sido proposto por Smith e Patton (2007) com base em sequências do citocromo *b*. A inclusão de novos marcadores moleculares pode fornecer evidências adicionais sobre o posicionamento de *Deltamys* na tribo Akodontini.

Figura 1. Mapa com as localidades amostradas no presente trabalho. (1) Esmeralda, RS (51°11'S 28°03'W), (2) Arroio Grande, RS (32°14'S; 53°05'W) e (3) Tapes, RS (30°40'; 51°23'W); (4) San Jose', UR (34°21'S; 57°06'W) referente a sequência AY195862; (5) Buenos Aires, AR (34°54'S; 57°45'W), referente a sequência AY195860. Mapa com a distribuição de *Delatmys kempii* (em cinza) modificado de Gonzáles e Pardiñas (2002)

Figura 2. Consenso das três árvores mais parcimoniosas obtidas com 10000 réplicas pelo método de MP. IR= 0,66 e IC= 0,38. Números acima dos clados são valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas e abaixo índices de Bremer. Entre parênteses estão os códigos de acesso de sequências retiradas do GenBank. ¹ *Akodon cursor*, *Akodon* sp. n., *A. montensis*, *A. mystax*, *A. paranaensis*, *A. reigi* e *A. lindberghi*. ² agrupamento de três exemplares de *Thaptomys* apresentados na tabela I. * clado formado por *Akodon* parafilético e *Deltamys kemp*.

Figura 3. Árvore mais provável de relações filogenéticas obtida com 1000 réplicas pelo método de MV. Números nos clados são valores de *bootstrap* obtidos com 500 réplicas. Entre parênteses estão os códigos de acesso de sequências retiradas do GenBank. ¹ *Akodon cursor*, *A. montensis*, *A. mystax*, *A. paranaensis*, *A. reigi* e *A. lindberghi*. ² agrupamento de três exemplares de *Thaptomys* apresentados na tabela I. * clado formado por *Akodon* parafilético e *Deltamys kempi*.

Figura 4. Cariótipos em bandamentos CBG. (A) *Akodon* sp., 2n=40; XX, XY. Em destaque o par sexual de um macho. Note o Y diminuto e heterocromático. (B) *Deltamys kempi*, 2n=38; X₁X₁X₂X₂ ou 2n=37; X₁X₂Y. Em destaque acima cromossomos sexuais de macho, abaixo de fêmea. Note o grande bloco heterocromático na região pericentromérica e proximal de X₁ e o braço curto do Y totalmente heterocromático. A e B extraídos de Ventura (2004) e Sbalqueiro e col. (1984), respectivamente.

IV. 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIANCHI, N. O., O. A. REIG, O. J. MOLINA, E F. N. DULOUT. 1971. Cytogenetics of south american akodont rodents (Cricetidae). I. A progress report of Argentinan and Venezuelan forms. *Evolution*. 25: 724-736.
- BIANCHINI, J., E L. DELUPI. 1994. Consideraciones sobre el estado sistematico de *Deltamys kemp* Thomas, 1917 (Cricetidae, Sigmodontinae). *Physis*. 49:27–35.
- BREMER, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics*. 10:295-304.
- CABRERA, A. 1961. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Ciencias Zoológicas* 4:309–732.
- CASTRO, E. C., M. S MATTEVI, S.W. MALUF, E L. F. B. OLIVEIRA. 1991. Distinct centric fusions in different populations of *Deltamys kemp* (Rodentia, Cricetidae) from South America. *Cytobios*. 68:153–159.
- CHRISTOFF, A. U., V. FAGUNDES, I. J. SBALQUEIRO, M. S. MATTEVI, E Y. YONENAGA-YASSUDA. 2000. Description of a new species of *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) from Southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 81 (3):838-851.
- CHRISTOFF, A. U., V. FAGUNDES; Y. YONENAGA-YASSUDA. 2003. Uma nova forma de *Akodon* com $2n=40$ (rodentia; Sigmodontinae) para o extremo sul do Brasil. P. 271 in *Livro de Resumos do II Congresso Brasileiro de Mastozoologia*. Belo Horizonte : Sociedade Brasileira de Mastozoologia
- D'ELIA, G. 2003. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics* 19:307-323.
- D'ELIA, G., E. M. GONZALES, E U. F. J. PARDIÑAS. 2003. Phylogenetic analyses of sigmodontine rodents (Muroidea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. *Mammalian Biology* 68:351-364.
- ELLERMAN, J. R. 1941. The families and genera of living rodents. Family Muridae. *British Museum of Natural History*. London.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- FETZNER, J. W. 1999. Extracting high-quality DNA from shed reptile skins: a simplified method. *Bio Techniques* 26 (6):1052-1054.
- FRONZA, M., R. WAINBERG, E. G. CATALEO. 1981. Multiple sex chromosomes in *Deltamys kemp* (Rodentia: Cricetidae): Preliminary steps towards the establishment of the $XY_1Y_2 / X_1X_1X_2X_2$ system. *Caryologia* 34: 457–466.

- GEISE, L., F. C. CANAVEZ, E H. N. SEUÁNEZ. 1998. Comparative karyology in *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) from Southwestern Brazil. *Journal of Heredity* 89:158-163.
- GONZÁLEZ, E. M., E E. MASSOIA. 1995. Revalidación del género *Deltamys* Thomas, 1917, con la descripción de una nueva subespecie de Uruguay y sur de Brasil (Mammalia: Rodentia: Cricetidae). *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*. 12: 1–8.
- GONZÁLEZ, E. M., E U. F. J. PARDIÑAS. 2002. *Deltamys kemp*i. *Mammalian Species* 711: 1–4.
- GYLDENSTOLPE, N. 1932. A manual of Neotropical sigmodont rodents. *Kunglia Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*, Stockholm. 11:1–164.
- HONACKI, J. H., K. E. KINMAN, E J. W. KOEPPL. 1982. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Allen Press, Inc. and The Association of Systematics Collections, Lawrence, Kansas.
- JUYAL, R. C., B. K. THELMA, E S. R. V. RAO. 1989. Heterochromatin variation and spermatogenesis in *Nesokia*. *Cytogenetic and Cell Genetics*. 50:206-210.
- LEAL-MESQUITA, E. R., V. FAGUNDES, Y. YONENAGA-YASSUDA, E P. L. B. ROCHA. 1993. Comparative cytogenetic studies of two karyomorphs of *Tricomys apereoides* (Rodentia, Echymidae). *Revista Brasileira de Genética*. 16:639-651.
- LOBATO, L., G. CANTOS, B. ARAÚJO, N. O. BIANCHI, E S. MERANI. 1982. Cytogenetics of the South American akodont rodents (Cricetidae). . X. *Akodon mollis*: a species with XY females and B chromosomes. *Genetica* 57: 199-205.
- MASSOIA, E. 1964. Sistemática, distribución geográfica y rasgos etoecológicos de *Akodon (Deltamys) kemp*i (Rodentia, Cricetidae). *Physis* 24:299–305.
- MASSOIA, E. 1980. Nuevos datos sobre *Akodon*, *Deltamys* y *Cabreramys* con la descripción de una nueva especie y subespecie (Mammalia, Rodentia, Cricetidae). *Nota preliminar*. *Historia Natural* 1:179.
- MONTES, M. A., L. F. B. OLIVEIRA, S. L. BONATTO, S. M. CALLEGARI-JACQUES, E M. S. MATTEVI. 2008. DNA sequence analysis and the phylogeographical history of the rodent *Deltamys kemp*i (Sigmodontinae, Cricetidae) on the Atlantic Coastal Plain of south of Brazil.
- MUSSER, G. G., E M. D. CARLETON. 1993. Family Muridae. Pp. 501-755. in *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.). Smithsonian Institution. Washington.
- MUSSER, G. G., E M. D. CARLETON. 2005. Superfamily Muroidea. Pp. 894–1531 in *Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference* (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.). 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- POSADA, D., E K. A. CRANDALL. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9):817-818.

- REIG, O. A. 1987. An assessment of the systematics and evolution of the Akodontini, with description of new fossil species of Akodon (Cricetidae, Sigmodontinae). Pp. 347-399 in Studies in Neotropical Mammology. Essays in honor of Philip Hershkovitz (B. D. Patterson and R. M. Tim, eds). Fieldiana Zoological New series v.39.
- SBALQUEIRO, I. J., M. S. MATTEVI, E L. F. B. OLIVEIRA. 1984. An $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ mechanism of sex determination in a South American rodents, *Deltamys kemp*i. (Rodentia, Cricetidae). Cytogenetic and Cell Genetics 38: 50-55.
- SILVA, M. J. J., E Y. YONENAGA-YASSUDA. 1997. New karyotypes of two related species of *Olygoryzomys* genus (Cricetidae, Rodentia) involving centric fusion with loss of NORs and distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences. Hereditas. 127:217-229.
- SILVA, M. J. J., E Y. YONENAGA-YASSUDA. 1998a. Karyotype and chromosomal polymorphism of an undescribed *Akodon* from Central Brazil, a species with the lowest known diploid chromosome number in rodents. Cytogenetic and Cell Genetic 81:46-50.
- SILVA, M. J. J., E Y. YONENAGA-YASSUDA. 1998b. Heterogeneity and meiotic behaviour of B and sex chromosomes, banding patterns and localization of (TTAGGG)_n sequences by fluorescence *in situ* hybridization in the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). Chromosome Research. 6:455-462.
- SMITH, M. F., E J. L. PATTON. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontini tribe. Biological Journal of the Linnean Society 50: 149-177.
- SMITH, M. F., E J. L. PATTON. 1999. Phylogenetic Relationships and the Radiation of Sigmodontine Rodents in South America: Evidence from Cytochrome b. Journal of Mammalian Evolution 6(2): 89-128.
- SMITH, M. F., E J. L. PATTON. 2007. Molecular phylogenetics and diversification of South American grass mice, genus *Akodon*. Pp 827-858 in The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson (D. A. Kelt, E. P. Lessa, J. Salazar-Bravo and J. Patton, eds.). University of California Publications in Zoology, University of California Press, California.
- SORENSEN, M. D. 1999. TreeRot, ver. 2 Boston: Boston University.
- SOUZA, M. J., E Y. YONENAGA-YASSUDA. 1982. Chromosomal variability of sex chromosomes and NOR's in *Thricomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). Cytogenetic and Cell Genetics. 33:197-203.
- SOUZA, M. J., E Y. YONENAGA-YASSUDA. 1984. G- and C-patterns and nucleolus organizer regions (NORs) in somatic chromosomes of *Clyomys laticeps laticeps* (Rodentia, Cricetidae). Experientia 40: 96-97.
- SVARTMAN, M., E E. J. C. ALMEIDA. 1993. Pericentric inversion and X chromosome polymorphism in

- Rhipdomys* sp. (Cricetide, Rodentia) from Brazil. *Caryologia*. 46:219-225.
- SWOFFORD, D. L. 2003. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.02b. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TAMURA, K., E M. NEI. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in human and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10: 512-526.
- TETA, P., G. CUETO, E O. SUÁREZ. 2008. New data on morphology and natural history of *Deltamys kempi* Thomas, 1919 (Cricetidae, Sigmodontinae) from central-eastern Argentina. *Zootaxa*. 1665: 43–51.
- THELMA, B. K., R. C. JUYAL, R. TEWARI, E S. R. V. RAO. 1988. Does heterochromatin variation potentiate speciation? A study in *Nesokia*. *Cytogenetic and Cell Genetics*. 47:204-208.
- THOMAS, O. 1917. On small mammals from the Delta del Parana *Journal of Natural History*. (=Ann. Mag. Nat. Hist.) 20: 95–100.
- UDRIZAR SAUTHIER, D. E., A. M. ABBA, L. G. PAGANO, E U. F. J. PARDIÑAS. 2005. Ingreso de micromamíferos brasílicos en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Mastozoología Neotropical* 12:91-95.
- VENTURA, K. 2004. Novos cariótipos, caracterização e diferenciação cromossômica para espécies brasileiras dos gêneros *Thaptomys* e *Akodon* (Sigmodontinae, Akodontini), com uso de citogenética clássica e FISH telomérica. Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- YONENAGA, Y., S. KASAHARA, E. J. C. ALMEIDA, E A. L. PERACCHI. 1975. Chromosomal banding patterns in *Akodon arviculoides* (2n=14), *Akodon* sp. (2n=24 and 25), and two male hybrids with 19 chromosomes. *Cytogenetic and Cell Genetics* 15:388-399.

V. *THAPTOMYS* THOMAS, 1916 COM CARIÓTIPOS $2N=50$, $NF=48$ E $2N=52$, $NF=52$: DUAS LINHAGENS RECUPERADAS POR ANÁLISES FILOGENÉTICAS MOLECULARES

V. 1. ABSTRACT

A karyotype with $2n=50$, $FN=48$ has been described for specimens of *Thaptomys* Thomas, 1916 collected at Una, State of Bahia, Brazil, which are morphologically indistinguishable from *Thaptomys nigrita* with $2n=52$, $FN=52$ found in other Brazilian localities. It has been hence proposed that this new karyotype with $2n=50$ could belong to a distinct species, cryptic of *Thaptomys nigrita*, once chromosome rearrangements observed along with the geographic distance could represent a reproductive barrier between both forms. Molecular phylogenetic analyses using the cytochrome *b* sequences of eighteen karyotyped specimens of *Thaptomys* were performed attempting to establish the relationships among the individuals along the geographic distribution of the genus. Two major clades, Northeastern (A) with specimens with $2n=50$ and Southeastern (B) with specimens with $2n=52$, were reconstructed by maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML). The intra-generic relationships recovered by phylogenetic analyses corroborated the distinct diploid numbers. The $2n=50$ and $2n=52$ karyotypes appeared as monophyletic separated by the basal cladogenesis of the genus, sister-group to each other.

Key words: Atlantic rain forest rivers, cytochrome *b*, endemism, karyotypes, *Thaptomys*.

V. 2. RESUMO

Um cariótipo com $2n=50$, $NF=48$ foi descrito para espécimes de *Thaptomys* Thomas, 1916, coletados em Una, estado da Bahia, Brasil, que são indistinguíveis morfologicamente dos *Thaptomys nigrita* que apresentam $2n=52$, $NF=52$, encontrados em outras localidades brasileiras. Foi então proposto que esse novo cariótipo com $2n=50$ pertencesse a uma espécie críptica de *Thaptomys nigrita*, uma vez que os rearranjos cromossômicos observados somados a distância geográfica pode representar uma barreira reprodutiva entre as duas formas. Com o intuito de se estabelecer as relações entre indivíduos de *Thaptomys* com os dois números

diplóides, análises filogenéticas moleculares foram realizadas com o uso de dezoito sequências do gene mitocondrial do citocromo *b* provenientes de espécimes cariotipados coletados ao longo da distribuição geográfica do gênero. Dois clados principais, Nordeste (A) que agrupa espécimens com $2n=50$ e Sudeste (B) que agrupa espécimes com $2n=52$, foram recuperados por análises de máxima parcimônia e máxima verossimilhança. As relações filogenéticas intra-genéricas corroboram os distintos números diplóides, e mostram os cariótipos com $2n=50$ e $2n=52$ como clados irmãos entre si separados pela cladogênese basal de *Thaptomys*.

Palavras-chave: cariótipos, citocromo *b*, endemismo, Mata Atlântica, *Thaptomys*.

V. 3. INTRODUÇÃO

Embora muitas das redefinições dos agrupamentos e relações inter-genéricas dentro da subfamília Sigmodontinae tenham sido propostas nos últimos anos por análises filogenéticas usando marcadores moleculares (Smith e Patton, 1991, 1993, 1999, 2007; D'Elia 2003; D'Elia e col., 2003), muito do debate a respeito de sua taxonomia e sistemática tem sido historicamente focado em categorias taxonômicas menos inclusivas (Reig, 1987). Essa situação é especialmente evidente na tribo Akodontini, com respeito ao estabelecimento de alguns táxons morfológicamente similares a *Akodon* (e.g. *Deltamys*, *Hypsimys*, *Microxus*, *Thaptomys* e *Thalpomys*).

Thaptomys Thomas, 1916 foi descrito para alocar *Hesperomys subterraneus* Hensel, 1873 (= *Mus nigrita* Lichtenstein, 1829). Massoia (1963) esclareceu a identidade de *H. subterraneus*, tipo de *Thaptomys*, como sinônimo do nome mais antigo *M. nigrita*, ampliando assim a distribuição da espécie. Esse táxon tem sido, então, referido como um subgênero de *Akodon* (Ellerman, 1941; Cabrera, 1961) ou mesmo como gênero pleno (Reig, 1987). Em revisão taxonômica, Hershkovitz (1990, 1998) reconsiderou as características morfológicas únicas de *Thaptomys* e atribuiu *status* genérico ao grupo seguindo sua descrição original.

Estudos filogenéticos moleculares realizados por Smith e Patton (1999), utilizando sequência de citocromo *b*, estabeleceram suporte filogenético para o gênero *Thaptomys* e permitiram reconhecer como pertencentes à Akodontini, uma tribo de roedores Sigmodontíneos, os gêneros *Akodon* (incl. *Microxus*, *Deltamys* e *Hypsimys*), *Thaptomys*,

Necromys (referido como *Bolomys*), *Oxymycterus*, *Lenoxus*, *Blarinomys*, *Brucepattersonius*, *Podoxymys*, *Juscelinomys*, *Thalpomys*, *Scapteromys*, *Kunsia* e *Bibimys*.

Thaptomys é um gênero monotípico (Musser e Carleton, 2005) representado pela espécie *T. nigrita*, que apresenta distribuição ao longo da costa leste do Brasil, Paraguai e Uruguai. Espécimes com o mesmo cariótipo com $2n=52$ e $NF=52$, considerando-se somente os braços autossômicos, são registrados para os estados brasileiros do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo (Ventura e col., 2004).

Ventura e col. (2004) descreveram um cariótipo novo para espécimes de *Thaptomys* sp. $2n=50$ e $NF=48$ coletados em Una, estado da Bahia, Brasil, que são morfologicamente indistinguíveis de *Thaptomys nigrita* com $2n=52$, encontrado em outras localidades do território brasileiro. Os padrões de bandas G e o sinal de FISH telomérica intersticial (ITS) sugerem que a diferenciação do número diplóide entre as formas com $2n=52$ em *Thaptomys nigrita* e $2n=50$, referida como *Thaptomys* sp., é devido a uma fusão em tandem dos pares 2 e 24 da primeira resultando no par 2 da última. Também é sugerida, com base na marcação de Ag-RONs, inversão pericêntrica de um pequeno par metacêntrico (par 25) do cariótipo com $2n=52$, que apresenta morfologia acrocêntrica (par 24) no cariótipo com $2n=50$. Foi então proposto que esse novo cariótipo com $2n=50$ poderia pertencer a uma nova espécie, críptica de *Thaptomys nigrita*, uma vez que parecem ser morfologicamente indistinguíveis. Os rearranjos cromossômicos somados a distância determinada pela localização geográfica podem representar uma barreira reprodutiva entre as duas formas

Análises filogenéticas moleculares utilizando sequências de citocromo *b* de exemplares de *Thaptomys* que apresentam $2n=52$, $NF=52$ e $2n=50$, $NF=48$ foram realizadas na tentativa de se estabelecer as relações filogenéticas entre os indivíduos ao longo da distribuição geográfica do gênero no território brasileiro, identificar as linhagens evolutivas monofiléticas e relacioná-las aos complementos cromossômicos.

V. 4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sequências do gene mitocondrial citocromo *b* de dezoito exemplares cariotipados com $2n=50$ e $2n=52$ do gênero *Thaptomys* provenientes de diferentes localidades ao longo da Mata Atlântica no território brasileiro (Tab. 1 e Fig. 1). Exemplares de *Brucepattersonius*, *Necromys* e *Thalpomys* foram usados como grupo externo.

O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de fígado ou músculo, preservadas em álcool ou em ultra freezer (-70°C), segundo protocolo descrito por Fetzner (1999). Para amplificar os fragmentos do gene mitocondrial do citocromo *b* foram empregados, para a realização do PCR, os pares de *primers* MVZ 05 e MVZ 16; MVZ 127 e MVZ 14 desenvolvidos pelo *Museum of Vertebrate Zoology* (MVZ) da Universidade da Califórnia, Berkeley, EUA (Smith e Patton, 1993, 1999). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram feitas a um volume de 25 µl para cada amostra, com reagentes nas seguintes quantidades: 4,0µl de dNTPs (5mM); 2,5 µl de Buffer 10x; 2,5 µl de MgCl₂ (25mM); 2,0 µl de cada *primer*; 9,5 µl de H₂O deionizada; 0,5 µl de *Taq* DNA Polymerase Recombinant (5 U/µl) e 2,0 µl de DNA; sob o seguinte regime de temperaturas: desnaturação inicial 94°C/5 min; 40 ciclos de 94°C/30 s, 48°C/45 s, 72°C/1min; e extensão final a 72°C/10 min.

Tabela 1. Amostras de *Thaptomys*, *Thalpomys*, *Necromys* e *Brucepattersonius* utilizadas no presente estudo com os respectivos números de identificação, localidades e números diplóides (2n) quando disponíveis.

Gênero	espécie	Identificação	Localidade	LN	UF	Coordenadas	2n
<i>Thaptomys</i>	sp.	CIT 904	Una	❶	BA	15°29'S; 39°07'W	50
		CIT 935					50
		CIT 913					50
<i>Thaptomys</i>	<i>nigrita</i>	LGA 116	Santa Teresa	❷	ES	19°56'S; 40°36'W	52
		LGA 117					52
		LGA 956	Domingos Martins	❸	ES	20°21'S; 40° 39'W	52
		LGA 977					52
		LGA 974					52
		UNIBAN 2132	Biritiba Mirim	❹	SP	23°57'S; 46°03'W	52
		UNIBAN 2031					52
		CIT 1667	São Bernardo do Campo	❺	SP	23°69'S; 46°56'W	52
		CIT 1133	Pilar do Sul	❻	SP		52
		CIT 1034					52
		CIT 175	Iguape	❼	SP	24°42'S, 47°33'W	52
		CIT 323					52
		MII 082	Ortigueira	❽	PR	24°12'S, 50° 56'W	52
		MII 078					52
		MII 077					52
<i>Thalpomys</i>	<i>cerradensis</i>	AY273916*					
<i>Necromys</i>	<i>urich</i>	AY273919*					
<i>Brucepattersonius</i>	<i>iheringi</i>	AF108667*					
<i>Brucepattersonius</i>	<i>soricinus</i>	AY277486*					

UF – Estados brasileiros: BA=Bahia; ES=Espírito Santo; PR=Paraná; SP=São Paulo

LN – Número das localidades representadas no mapa da figura 1 e nos cladogramas (Figs. 2 e 3)

* Sequências acessadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A limpeza dos produtos de PCR foi feita com o kit ExoSAP-IT™ produzido pela USB Corporation e distribuído pela Amersham Biosciences, seguindo-se a indicação do fabricante. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o ABI PRISM® Big Dye™ Terminators v 3.0 kit (Applied Biosystems). As amostras foram sequenciadas usando seqüenciador automático ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (PE Applied Biosystems Foster City, CA, USA).

As seqüências de cadeias leve e pesada obtidas após o seqüenciamento foram editadas e alinhadas manualmente e comparadas entre si utilizando o programa Sequence Navigator™ (Applied Biosystems). Foram feitos alinhamentos automáticos usando o programa Clustal X. O quadro de leitura das seqüências obtidas foi inferido utilizando o programa MacClade, buscando minimizar códons de parada.

As análises filogenéticas foram executadas no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003) utilizando-se os métodos de reconstrução filogenética de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV). As análises usando MP ocorreram através de busca heurística por adição por passos (*stepwise addition*) com algoritmo de rearranjo de ramos do tipo TBR (tree bisection and reconnection) com 10.000 réplicas. A análise de MV foi conduzida usando-se o modelo apropriado de substituição de nucleotídeos que foi selecionado pelo Modeltest (versão 3.06, Posada e Crandall, 1998); os parâmetros desse modelo foram utilizados para se reconstruir a filogenia através de busca heurística por adição por passos (*stepwise addition*) com algoritmo de rearranjo de ramos do tipo TBR com 1.000 réplicas.

O suporte dos nós recuperados nas árvores de MP e de MV foram estimados por *bootstrap* (Felsenstein, 1985) utilizando-se PAUP*. Os valores de suporte foram obtidos com re-amostragem dos dados com 1000 (MP) e 500 (MV) pseudo-réplicas. Nas árvores de MP foi usado também o índice Bremer como medida de suporte (Bremer, 1994), calculado usando o programa TreeRot 2.0 (Sorenson, 1999).

V. 5. RESULTADOS

A matriz gerada a partir de todas as seqüências apresentadas na tabela 1 possui 1077pb, com 783pb constantes, 87pb não-informativos e 207pb informativos na análise de parcimônia. A análise de MP recuperou 5 árvores mais parcimoniosas com 416 passos, índice de consistência (IC) de 0,82 e índice de retenção (IR) de 0,83. A figura 2 apresenta a árvore de consenso estrito de MP acrescida dos valores de *bootstrap*.

Foram encontrados 15 haplótipos na amostra, sendo que um mesmo haplótipo foi encontrado para os indivíduos, UNIBAN 2132, UNIBAN 2031 e CIT 1667 procedentes de Biritiba-Mirim e de São Bernardo do Campo, SP, e um outro para os dois indivíduos CIT 175 e CIT 323 de Iguape, SP.

Na análise de MV, o modelo mais adequado encontrado pelo teste de razão de verossimilhança do Modeltest 3.06 (Posada e Crandall, 1998) foi o GTR+I+G (*General Time Reversible*) (Tavaré, 1986) que prevê taxas variáveis para todos os tipos de substituição, com frequências distintas para cada base, mais taxas variáveis com distribuição gama entre os sítios. A figura 3 mostra a árvore de máxima verossimilhança obtida, com os valores de *bootstrap*.

Ambos métodos de reconstrução filogenética recuperaram um clado com suporte de *bootstrap* de 100% e índice de Bremer de 31 contendo as duas linhagens cariotípicas (A e B) de *Thaptomys* (clado ★) (Fig. 2 e 3), confirmando o monofiletismo do gênero nos dois casos. Uma dicotomia basal recupera *Thaptomys* em duas linhagens, uma da região Nordeste (clado A) que agrupa espécimens com 2n=50, restritos a Una, BA, e, outra da região Sudeste (clado B) que agrupa os representantes com 2n=52, com distribuição ao longo da Mata Atlântica da costa leste e sul do Brasil. É importante ressaltar que no caso da MV, cada um desses cladogramas (A e B) apresentaram baixo valor de *bootstrap*, no entanto as duas análises recuperaram ambas linhagens cariotípicas como monofiléticas, irmãs entre si.

O clado B apresentou três subgrupos monofiléticos, B₁, B₂ e B₃, tanto em MP quanto MV. O clado B₁ agrupa espécimens de Santa Teresa e Domingos Martim no Estado do Espírito Santo. B₂ reúne espécimes de Biritiba-Mirim, São Bernardo do Campo e Pilar do Sul, no Estado de São Paulo. B₃ agrupa espécimens de Iguape e Ortigueira nos estados de São Paulo e Paraná, respectivamente. No método de MP a relação entre esses três cladogramas não foi resolvida, enquanto que em MV, B₃ é grupo irmão do clado formado por B₁ e B₂, no entanto com baixo valor de *bootstrap*.

A matriz de distância genética corrigida é apresentada na tabela 2. A distância genética entre os indivíduos das linhagens cariotípicas A e B varia em média 2,7% (de 1,9% a 3,5%), enquanto que, entre os agrupamentos dentro do clado B, varia em média 1% (de <1% a 2,1%). Indivíduos de áreas geográficas próximas próximas (2 e 3), (4, 5 e 6) apresentaram entre si divergência de sequência < 1%.

Tabela 2. Diagonal superior: matriz Y de distância genética, em porcentagem, corrigida pelo modelo de MV entre os exemplares de *Thaptomys*.

	①	①	①	②	②	③	③	③	④	④	⑤	⑥	⑥	⑦	⑦	⑧	⑧	⑧
①	0	0,002	0,008	0,027	0,027	0,029	0,028	0,028	0,029	0,025	0,024	0,028	0,031	0,025	0,022	0,030	0,028	0,030
①		0	0,011	0,025	0,025	0,027	0,026	0,026	0,027	0,023	0,023	0,026	0,029	0,022	0,020	0,028	0,027	0,029
①			0	0,029	0,029	0,031	0,030	0,030	0,027	0,019	0,019	0,019	0,027	0,028	0,025	0,034	0,033	0,035
②				0	0,002	0,002	0,003	0,001	0,007	0,006	0,006	0,009	0,009	0,015	0,012	0,015	0,013	0,014
②					0	0,004	0,003	0,003	0,007	0,005	0,005	0,008	0,009	0,014	0,011	0,014	0,013	0,014
③						0	0,004	0,003	0,009	0,008	0,008	0,011	0,011	0,016	0,013	0,017	0,015	0,016
③							0	0,004	0,008	0,006	0,006	0,009	0,010	0,015	0,012	0,015	0,014	0,015
③								0	0,008	0,006	0,006	0,009	0,010	0,015	0,012	0,015	0,014	0,015
④									0	0,000	0,000	0,003	0,002	0,018	0,016	0,017	0,018	0,018
④										0	0,000	0,003	0,001	0,016	0,016	0,018	0,016	0,018
⑤											0	0,003	0,001	0,016	0,016	0,017	0,016	0,017
⑥												0	0,001	0,019	0,019	0,021	0,019	0,021
⑥													0	0,019	0,017	0,019	0,020	0,020
⑦														0	0,000	0,004	0,002	0,004
⑦															0	0,004	0,003	0,004
⑧																0	0,002	0,003
⑧																	0	0,001
⑧																		0

Nota: Os números da coluna mais a esquerda e da linha superior representam as localidades do mapa da figura 1.

V. 6. DISCUSSÃO

Segundo Smith e Patton (1999), *Thaptomys* é monofilético e geneticamente distinto dentro da tribo Akodontini. O gênero é grupo irmão de *Akodon*, e o clado *Thaptomys* + *Akodon* é grupo irmão de *Necromys*.

Filogenias moleculares baseadas em análises de sequências do gene mitocondrial citocromo *b* ou em análises combinadas daquelas sequências com as do gene nuclear IRBP (D'Elia, 2003; D'Elia e col., 2003) mostraram *Akodon serrensis* Thomas 1902, reconhecido como espécie desde sua descrição (Gyldenstolpe, 1932; Cabrera, 1961; Moojen, 1952;

Musser e Carleton, 1993; Reig, 1987), como grupo irmão do gênero monotípico *Thaptomys*. Esse clado (*Thaptomys* + “*Akodon*” *serrensis*) aparece como grupo irmão de *Necomys* ou de (*Necomys* + *Thalpomys*). Não foi possível, portanto, para D’Elia (2003) afirmar se *Akodon serrensis* deve ser colocado em um gênero próprio ou em *Thaptomys*. Em trabalho mais recente publicado por Smith e Patton (2007) os autores concluíram que as relações de *A. serrensis* permanecem não esclarecidas. Além disso, análise molecular preliminar envolvendo várias espécies de *Akodon*, incluindo *A. serrensis* e os gêneros *Thaptomys* e *Deltamys* mostrou que *A. serrensis* e *Thaptomys* não estão proximamente relacionados (dados não publicados). Por haver controvérsia na relação de grupo-irmão entre esses táxons, *A. serrensis* não foi incluído na presente análise, já que o ponto de interesse do trabalho foi buscar esclarecer as relações filogenéticas intra-genéricas, correlacionando os números diplóides de *Thaptomys*.

As relações intra-genéricas evidenciadas pelas análises de MP e MV corroboram o monofiletismo das linhagens cariotípicas e as apresentam como grupos irmãos, embora essa relação tenha baixo suporte de *bootstrap* em MV. O monofiletismo dessas linhagens pode ser testado em uma outra análise incluindo outros caracteres (*e.g.* outros genes), outros táxons adicionais ou ambos. Por exemplo, existe uma lacuna geográfica na amostragem entre os rios Jequitinhonha e Doce (Fig. 1) que necessita ser melhor investigada, e representantes de *Thaptomys* que sejam eventualmente encontrados nessas localidades podem fornecer subsídios para se testar o monofiletismo dos clados com baixo suporte.

A média de divergência genética de 2,7% encontrada entre os indivíduos que apresentam $2n=50$ e $2n=52$ é compatível com os dados de divergência genética intrapopulacionais apresentadas para espécies akodontinas que, segundo Smith e Patton (1991, 1993) é tipicamente menor que 5% , variando de 0,25% a 8% e ainda segundo Smith e Patton (1999), é, em média, de 3,7% variando de 0,4% a 9,7%.

Assim, os diferentes números diplóides poderiam ser interpretados como variantes cariotípicas geográficas pertencentes a uma mesma espécie amplamente distribuída, *Thaptomys nigrita* $2n=50-52$, $NF=48-52$, que apresenta polimorfismo tanto de número diplóide quanto de número de braços autossômicos. Por outro lado, na distribuição até então conhecida para o gênero, essas linhagens parecem estar isoladas geograficamente e o cariótipo com $2n=50$ parece ser endêmico da região de Una no Estado da Bahia (Figs. 1, 2 e 3; Tabela 2), o que levou Ventura e col. (2004) a proporem que esse complemento

pertencesse a uma espécie nova, críptica de *Thaptomys nigrita* com $2n=52$. Diante desta problemática apenas um estudo taxonômico detalhado, envolvendo representantes de ambos os cariótipos e de toda área de distribuição do gênero poderá determinar se as duas linhagens monofiléticas em *Thaptomys* representam variações da mesma espécie ou se constituem táxons distintos.

Essa abordagem multidisciplinar reforça a importância da caracterização cromossômica para o conhecimento da biodiversidade e na identificação de variantes geográficas de entidades que aparentemente não se distinguem morfologicamente. Além disso, as análises moleculares corroboraram os dados cromossômicos e indicaram o citocromo *b* como bom marcador para se estabelecer as relações filogenéticas nesse grupo de roedores.

Figura 1. Mapa com as localidades dos exemplares de *Thaptomys* com $2n=50$ e $2n=52$ utilizados do presente trabalho. As setas do norte para o sul indicam os rios (A) Pardo e Jequitinhonha, (B) Doce, (C) Paraíba do Sul e (D) Iguape. Localidades: ❶ Una, BA; ❷ A Santa Teresa, ES; ❸ Domingos Martins, ES; ❹ Biritiba Mirim, SP; ❺ São Bernardo do Campo, SP; ❻ Pilar do Sul, SP ❼ Iguape, SP; ❽ Ortigueira, PR.

Figura 2. Consenso das 5 árvores mais parcimoniosas obtidas (IC=0,82 e IR=0,83) com 10000 réplicas pelo método de MP para 18 exemplares de *Thaptomys* mais grupos externos. Números acima dos clados são valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas e abaixo índices de Bremer. Entre parênteses estão os códigos de acesso de sequências retiradas do GenBank. ❶ a ❽ representam as localidades de cada exemplar no mapa da figura 1.

Figura 3. Árvore mais provável obtida com 1000 réplicas pelo método de MV para 18 exemplares de *Thaptomys* mais grupos externos. Números nos clados são valores de *bootstrap* obtidos com 500 réplicas. Entre parênteses estão os códigos de acesso de sequências retiradas do GenBank. ① a ⑧ representam as localidades de cada exemplar no mapa da figura 1.

V. 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- BREMER, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics*. 10:295-304.
- CABRERA, A. 1961. Catalogo de los Mamiferos de America del sur. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia*. Buenos Aires 4: 309-732.
- D'ELIA, G. 2003. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics* 19: 307-323.
- D'ELIA, G., E. M. GONZALES, E U. F. J. PARDIÑAS. 2003. Phylogenetic analyses of sigmodontine rodents (Muroidea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. *Mammalian Biology* 68:351-364.
- ELLERMAN, J. R. 1941. The Families and Genera of Living Rodents. Vol. II. Family Muridae. British Museum (Natural History). London
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- FETZNER, J. W. 1999. Extracting high-quality DNA from shed reptile skins: a simplified method. *Bio Techniques* 26 (6):1052-1054.
- GYLDENSTOLPE, N. 1932. A manual of Neotropical sigmodont rodents. *Kunglia Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*, Stockholm. 11:1-164.
- HERSHKOVITZ, P. 1990. Mice of the *Akodon boliviensis* size class (Sigmodontinae, Cricetidae) with the description of two new species from Brazil. *Fieldiana Zoology* 57: 1-35.
- HERSHKOVITZ, P. 1998. Report on some sigmodontine rodents collected in southeastern Brazil with descriptions of a new genus and six new species. *Bonner Zoologische Beiträge* 47: 193-256.
- MASSOIA, E. 1963. Sobre la posición sistemática y distribución geográfica de *Akodon (Thaptomys) nigrita* (Rodentia - Cricetidae). *Physis* 24: 73-80.
- MOOJEN, J. 1952. Os roedores do Brasil. Instituto Nacional do Livro. Rio de Janeiro, 214 pp.
- MUSSER, G. G., E M. D. CARLETON. 1993. Family Muridae. Pp. 501-755 in *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.). 2nd ed. Smithsonian Institution Press, Washington DC and London.
- MUSSER, G. G., E M. D. CARLETON. 2005. Superfamily Muroidea. Pp. 894-1531 in *Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference* (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.). 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- POSADA, D., E K. A. CRANDALL. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9):817-818.
- REIG, O. A. 1987. An assessment of the systematics and evolution of the Akodontini, with description of new fossil species of *Akodon* (Cricetidae, Sigmodontinae). Pp 347-399 in *Studies in Neotropical*

- mammology. Essays in honor of Philip Hershkovitz (B. D. Patterson and R. M. Tim, eds.). Fieldiana Zoology New Series, Chicago, Illinois.
- SMITH, M. F., E J. L. PATTON 1991. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae; Sigmodontinae). *Molecular and Biology Evolution* 8: 85-103.
- SMITH, M. F., E J. L. PATTON 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontini tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50: 149-177.
- SMITH, M. F., E J. L. PATTON 1999. Phylogenetic Relationships and the Radiation of Sigmodontine Rodents in South America: Evidence from Cytochrome b. *Journal of Mammalian Evolution* 6(2): 89-128.
- SMITH, M. F., E J. L. PATTON, J.L. 2007. Molecular phylogenetics and diversification of South American grass mice, genus *Akodon*. Pp 827-858 in *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson* (D. A. Kelt, E. P. Lessa, J. Salazar-Bravo and J. Patton, eds.). University of California Publications in Zoology, University of California Press, California.
- SORENSEN, M. D. 1999. TreeRot, ver. 2 Boston: Boston University.
- SWOFFORD, D. L. 2001. PAUP* 4.0 - Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- TAVARÉ, S. 1986. Some probabilistic and statistic problems in the analysis of DNA sequences. Pp 57-86 in: *Some mathematical question in biology. DNA sequence analysis* (R. M. Miura, ed.). American Mathematical Society, Providence. RI.
- VENTURA, K., M. J. J. SILVA, V. FAGUNDES, R. PARDINI, E Y. YONENAGA-YASSUDA 2004. An undescribed karyotype for *Thaptomys* (2n=50) and the mechanism of differentiation from *Thaptomys nigrita* (2n=52) evidenced by FISH and Ag-NORs. *Caryologia* 57(1): 89-97.

VI. FILOGENIA MOLECULAR DE *BLARINOMYS* THOMAS, 1896 (SIGMODONTINAE, AKODONTINI) E A EXTRAORDINÁRIA DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA DO GÊNERO DEVIDO A REARRANJOS ROBERTSONIANOS E SUPERNUMERÁRIOS

VI. 1. ABSTRACT

We present molecular phylogenetic and cytogenetic data on the monotypic fossorial rodent genus *Blarinomys*. Maximum parsimony and maximum likelihood based on cytochrome *b* gene sequences were performed for a sample of 11 individuals from nine localities of four states of Eastern Brazil. All topologies recovered two main lineages: a Northeastern (A) and a Southeastern clade. The Southeastern grouped two sister-clades B and C. Sequence divergence between individuals ranged from 4.7-8.0% between northeastern and southeastern clades, from 4.3-5.7% between clades B and C, from 6.1-8.0% between clades northeastern and B, and from 4.7-6.4% between clades northeastern and C. Within the clades, divergence varied from 0- 4.2% in the northeastern clade, was 0.7% in the clade B, and varied from 0.1-1.3% in clade C. Variation among specimens from the same geographic regions ranged from 0-1.3%. Cytogenetic studies of five individuals revealed high karyotypic diversity with five distinct diploid numbers: $2n=52$ (48A+2Bs,XY) from state of Bahia, and $2n=43$ (37A+4Bs,XX), $2n=37$ (34A+1B,XY), $2n=34$ (32A,XX), and $2n=31$ (27A+2Bs,XX) from state of São Paulo; and same number of autosomic arms (FN=50) excluding sex chromosomes and supernumeraries. Polymorphisms are due to Robertsonian rearrangements, in addition to the variation from none to four B chromosomes, which are heterogeneous regarding morphology, heterochromatin constitution and presence of interstitial telomeric signals (ITS). ITSs were also observed in the pericentromeric regions of some biarmed autosomic pairs of three specimens. Our results revealed a high unknown diversity for *Blarinomys*, showing two distinct lineages corresponding to regions of the Atlantic Rainforest, besides an extraordinary chromosomal polymorphism.

Key words: Atlantic Rainforest, B chromosomes, *Blarinomys*, chromosome painting, telomeric FISH, Robertsonian rearrangements.

VI. 2. RESUMO

No presente trabalho são apresentados estudos de filogenia molecular e citogenética para o gênero monotípico de roedor fossorial *Blarinomys* Thomas 1896. Foram realizadas análises de máxima parcimônia e máxima verossimilhança com base em sequências do gene mitocondrial citocromo *b*, para amostra de 11 exemplares de *B. breviceps* provenientes de nove localidades de quatro estados do território brasileiro. Todas as topologias recuperaram duas linhagens principais: um clado Nordeste (A) e outro Sudeste. O clado sudeste agrupou dois clados irmãos, B e C. A divergência de sequência entre os indivíduos variou de: 4,7-8,0% entre os clados nordeste e sudeste; 4,3-5,7% entre os clados B e C; 6,1-8,0% entre os clados nordeste; e B, e 4,7-6,4% entre os clados nordeste e C. Dentro dos clados a divergência variou de 0- 4,2% no clado nordeste, foi de 0,7% no clado B, e variou de 0,1-1,3% no clado C. Variação entre espécimes da mesma região geográfica foi de 0-1,3%. Os estudos de citogenética de cinco exemplares revelaram alta diversidade cariotípica com cinco números diplóides distintos: $2n=52$ (48A+2Bs, XY), $2n=43$ (37A+4Bs, XX), $2n=37$ (34A+1B, XY), $2n=34$ (32A, XX) e $2n=31$ (27A+2Bs, XX) e mesmo número de braços autossômicos (NF=50), excluindo-se os cromossomos sexuais e os supernumerários. Foram observados polimorfismos decorrentes de rearranjos Robertsonianos, além de variação de 0 a 4 cromossomos Bs, que são heterogêneos quanto a morfologia, constituição de heterocromatina e presença de sinais teloméricos intersticiais (ITS). ITS também foram observados na região pericentromérica de alguns pares autossômicos com dois braços em três dos exemplares. Foi realizada pintura cromossômica com sonda do cromossomo X de *Akodon cursor* (ACU X). Nossos dados revelaram uma diversidade até então desconhecida para *Blarinomys*, mostrando duas linhagens distintas correspondentes a regiões na Mata Atlântica e um extraordinário polimorfismo cromossômico.

Palavras-chave: *Blarinomys*, cromossomos B, FISH telomérica, Mata Atlântica, pintura cromossômica, rearranjos Robertsonianos.

VI. 3. INTRODUÇÃO

Blarinomys Thomas, 1896 juntamente com os gêneros *Akodon*, *Bibimys*, *Bucepattersonius*, *Deltamys*, *Juscelinomys*, *Kunsia*, *Lenoxus*, *Necomys*, *Oxymycterus*, *Podoxymys*, *Scapteromys*, *Thalpomys* e *Thaptomys* compõe a tribo Akodontini (D'Elia e col.,

2007), um grupo sul-americano de roedores sigmodontíneos que apresentam adaptações para uma vida exclusivamente terrestre e/ou semi-fossorial (Smith e Patton, 1999). O gênero é endêmico da Mata Atlântica e pouco conhecido em aspectos de sua biologia; apresenta características morfológicas adaptativas ao seu hábito fossorial que incluem cabeça curta e cônica, olhos diminutos, orelhas pequenas com poucos pêlos, cauda curta e garras bem desenvolvidas (Moojen, 1952; Matson e Abravaya, 1977).

Segundo Muller (1973), *Blarinomys* possivelmente diferenciou-se de um ancestral akodontino (HersHKovitz, 1966) que teria se isolado no centro de dispersão na região da Serra do Mar durante o Plioceno (5,3 a 1,8 milhões de anos).

As relações de *Blarinomys* com os demais Akodontini, de acordo com estudos de filogenia molecular utilizando sequências do gene mitocondrial citocromo *b*, é de gênero irmão de *Bucepattersonius* (Smith e Patton, 1999; D'Elía e col., 2003), ou do clado *Bucepattersonius* + *Lenoxus*, se sequências do gene nuclear IRBP (interphotoreceptor retinoid-binding protein gene) forem somadas à análise (D'Elía, 2003).

A única espécie, *Blarinomys breviceps*, foi originalmente descrita por Winge (1887) no gênero *Oxymycterus*, tendo como base parte de um crânio fóssil coletado em uma caverna em Lapa do Capão Secco, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil, datado da Idade Lujaniense no Pleistoceno (130.000 a 7.000 anos) (apud Matson e Abravaya, 1977). Desde sua descrição, esta espécie tem se mostrado difícil de ser amostrada e, portanto, é rara em coleções zoológicas.

B. breviceps ocorre em região de Mata Atlântica, porém a localidade tipo da espécie, Lagoa Santa no Estado de Minas Gerais, é atualmente coberta pelo bioma Cerrado (Silva e col., 2003). Estes autores argumentaram que a presença de uma fauna extinta de floresta em uma região atualmente coberta por cerrado pode ser explicada por ciclos climáticos com alternância de temperatura e de umidade, desde 30.000 anos até os dias atuais, que levaram a mudanças ambientais como expansões e retrações da floresta úmida, e também das áreas abertas e secas na região do Brasil central (Suguio e col., 1993; Parizzi e col., 1998).

Paglia e col. (2005) registraram a ocorrência da espécie em região de transição da Mata Atlântica de interior com o Cerrado no estado de Minas Gerais. Em termos latitudinais, *B. breviceps* ocorre de Buerarema (14° 57' 34''S; 39° 17' 59''W), Estado da Bahia, Brasil (Laemmert e col., 1946), e tem seu limite mais ao sul em Eldorado, Argentina (26° 24' S; 54° 38'W) (Chebez e Massoia, 1996). Considerando todos os registros disponíveis, *Blarinomys*

parece ocorrer desde altitudes ao nível do mar até aproximadamente 1570m (Geise e col., 2008).

Silva e col. (2003) capturaram dois espécimes no Estado de São Paulo; estes dados foram incorporados aos reunidos pelos autores em uma compilação das informações disponíveis de exemplares depositados em museus. Foram contabilizadas 16 localidades de coleta para *Blarinomys* e estendida a distribuição do gênero no Estado de São Paulo.

Geise e col. (2008) adicionaram 14 novas localidades a este mapa de distribuição e apresentaram um cariótipo com $2n=28$ e $NF=50$ em coloração convencional para um exemplar de *B. breviceps* do Estado do Rio de Janeiro, coletado no município de Valença.

No presente trabalho foi analisada uma amostra de doze exemplares de *Blarinomys* procedentes de nove localidades na região da Mata Atlântica brasileira. A partir de 11 sequências no gene mitocondrial citocromo *b* foram calculadas as distâncias genéticas entre os exemplares e conduzidas análises filogenéticas que recuperaram uma dicotomia basal em *Blarinomys*. Os estudos de citogenética clássica e molecular em cinco exemplares revelaram um extraordinário polimorfismo cromossômico.

VI. 4. MATERIAL E MÉTODOS

VI. 4. 1. Amostra

A amostra de *Blarinomys* (Fig. 1) é composta por 12 exemplares provenientes de nove localidades de 4 estados brasileiros (Tab. 1; Fig. 2.)

VI. 4. 2. Análises filogenéticas

Foram reunidas 11 sequências de gene mitocondrial citocromo *b* de exemplares do gênero *Blarinomys* provenientes de diferentes localidades ao longo da Mata Atlântica (L1, L2, L3, L4, L5a, L6, L7a, L7b, L7c e L8) (Fig. 2; Tab. 1). As reconstruções filogenéticas foram realizadas utilizando como grupo externo espécies dos gêneros akodontinos, *Brucepattersonius* e *Scapteromys*, e dos gêneros orizominos *Oecomys* e *Euryoryzomys* (após Weksler e col., 2006). Segundo dados publicados por Smith e Patton (1999) a tribo Oryzomyini é bem definida e distinta de Akodontini nas análises de MP e MV e o agrupamento monofilético. Análises realizadas por D'Elia (2003) e D'Elia e col. (2003), apontaram para as mesmas relações filogenéticas.

As sequências que foram retiradas do GenBank têm os números de acesso entre parênteses nos cladogramas que serão apresentados.

Tabela 1. Amostra de *Blarinomys* utilizada no presente trabalho com respectivos números de campo e localidades com coordenadas e altitudes aproximadas.

Nº campo	Nº laboratório	Localidade	L	UF	Coordenadas	Altitude
<u>ST 191</u>	CIT 1538	Jussari	1	BA	15° 19'S; 39° 49'W	150m
AF108668*		Una	2	BA	15° 29'S; 39° 07'W	30m
MTR 13511		Trancoso	3	BA	16° 31'S; 39° 07'W	50m
MTR 12313		Linhares	4	ES	19° 39'S; 40° 07'W	30m
MTR 11577		PARNA Caparaó	5a	ES	20° 28'S; 41° 44'W	1350m
MTR 10772		PARNA Caparaó	5b	MG	20° 25'S; 41° 50'W	1350m
<u>UNIBAN3290</u>	CIT 1391	PE Serra da Cantareira	6	SP	23° 70'S; 46° 63'W	780m
<u>IT-M0022</u>	CIT 1633	São Bernardo do Campo	7a	SP	23° 69'S; 46° 56'W	760m
<u>M322</u>	CIT 2259		7b			760m
M333			7c			760m
CIT 2139		Biritiba-Mirim	8	SP	23° 57'S; 46° 03'W	780m
<u>ROD 66**</u>		PE Serra Mar	9	SP	23° 19'S; 45° 05'W	720m

Nota: BA=Bahia; ES=Espírito Santo; MG=Minas Gerais; SP=São Paulo

* sequência AF108668 foi acessada do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

** sem sequência do gene citocromo *b*

Os cinco exemplares sublinhados apresentam cariótipo disponível.

L – Localidades apresentadas no mapa da Figura 2: 1. Jussari, BA; 2. Una, BA; 3. Trancoso, BA; 4. Linhares, ES; 5. Parque Nacional da Serra do Caparaó, ES e MG; 6. São Paulo, Parque Estadual da Serra da Cantareira, SP; 7. São Bernardo do Campo, SP; 8. Biritiba-Mirim, SP; 9. Natividade da Serra, Parque Estadual da Serra do Mar, SP.

O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de fígado ou músculo, preservadas em álcool ou em ultrafreezer (-70°C), segundo protocolo descrito por Fetzner (1999). Fragmentos com cerca 800 pb foram amplificados utilizando-se os *primers* MVZ 05 para cadeia leve e MVZ 16 para cadeia pesada, desenvolvidos pelo *Museum of Vertebrate Zoology* (MVZ) da Universidade da Califórnia, Berkeley, EUA (Smith e Patton, 1993; 1999). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram feitas a um volume de 25 µl para cada amostra, com reagentes nas seguintes quantidades: 4,0µl de dNTPs (5mM); 2,5 µl de Buffer 10x; 2,5 µl de MgCl₂ (25mM); 2,0 µl de cada *primer*; 9,5 µl de H₂O deionizada; 0,5 µl de *Taq* DNA Polymerase Recombinant (5 U/µl) e 2,0 µl de DNA; sob o seguinte regime de temperaturas:

desnaturação inicial 94°C/5 min; 40 ciclos de 94°C/30 s, 47°C/45 s, 72°C/1min; e extensão final a 72°C/10 min.

A limpeza dos produtos de PCR foi feita com o kit ExoSAP-IT™ produzido pela USB Corporation e distribuído pela Amersham Biosciences, seguindo-se a indicação do fabricante. As reações de seqüenciamento foram feitas utilizando o ABI PRISM® Big Dye™ Terminators v 3.0 kit (Applied Biosystems). As amostras foram seqüenciadas usando seqüenciador automático ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (PE Applied Biosystems Foster City, CA, USA).

As seqüências de cadeias leve e pesada obtidas após o seqüenciamento foram editadas e alinhadas manualmente e comparadas entre si utilizando o programa Sequence Navigator™ (Applied Biosystems). Foram feitos alinhamentos automáticos usando o programa Clustal X. O quadro de leitura das seqüências obtidas foi inferido utilizando o programa MacClade, buscando minimizar códons de parada.

As análises filogenéticas utilizando-se os métodos de reconstrução de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV) foram executadas no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003). As análises usando MP ocorreram através de busca heurística por adição por passos (*stepwise addition*) com algoritmo de rearranjo de ramos do tipo TBR (tree bisection and reconnection) com 10.000 réplicas. A análise de MV foi conduzida usando-se o modelo apropriado de substituição de nucleotídeos que foi selecionado pelo Modeltest (versão 3.06, Posada e Crandall, 1998); os parâmetros desse modelo foram utilizados para se reconstruir a filogenia através de busca heurística por adição por passos (*stepwise addition*) com algoritmo de rearranjo de ramos do tipo TBR com 1.000 réplicas.

O suporte dos nós recuperados nas árvores de MP e de MV foram estimados por *bootstrap* (Felsenstein, 1985) utilizando-se PAUP*. Os valores de suporte foram obtidos com re-amostragem dos dados com 1000 (MP) e 500 (MV) pseudo-réplicas. Nas árvores de MP foi usado também o índice Bremer como medida de suporte (Bremer, 1994), calculado usando o programa TreeRot 2.0 (Sorenson, 1999).

A matriz de distância genética par a par, corrigida pelo modelo de máxima verossimilhança, entre os haplótipos do exemplares de *Blarinomys* foi gerada no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003).

VI. 4. 3. Citogenética

Foram cinco os espécimes que tiveram dados citogenéticos disponíveis: CIT1538 (L1), CIT1633 (L7a), CIT 2259 (L7b), CIT1391 (L6) e ROD 66 (L9) (Tab. 1). As metáfases foram obtidas de preparação *in vivo* de medula óssea e baço, com modificações de Ford e Hamerton (1956), e foi estabelecida cultura de fibroblastos a partir de biópsia de orelha do exemplar CIT1391 em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), acrescido com 20% de soro bovino fetal, com a qual foram obtidas metáfases por preparação *in vitro*.

Foram utilizadas técnicas de (I) coloração convencional com Giemsa para estabelecimento do número diplóide (2n) e do número fundamental (NF), para o qual consideramos somente os braços dos autossomos, de (II) coloração diferencial, seguindo-se protocolos de rotina de bandas CBG, GTG, RBG e de regiões organizadoras de nucléolo por nitrato de prata (Ag-RONs); (III) hibridação *in situ* fluorescente (FISH) telomérica foi realizada empregando-se “DAKO Telomere PNA FISH Kit/Cy3 (K 5326) ou FITC (K 5325)” seguindo as recomendações do fabricante; (IV) pintura cromossômica foi realizada com o uso de sondas geradas por DOP-PCR a partir do cromossomo X de *Akodon cursor*, obtido por citometria de fluxo no laboratório de Citogenética Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Cambridge, Inglaterra. A sonda específica do cromossomo X foi marcada em um segundo DOP-PCR tomando-se 1 ml do produto primário e acrescido de (FITC)-12-dUTP (Amersham). A FISH de pintura com as sondas foi realizada como descrita por Yang e col. (1995). As sondas foram detectadas com rabbit anti-FITC, seguido do anticorpo goat anti-rabbit e DAPI-Vectashield foi usado como contra-coloração. As imagens foram analisadas utilizando-se fotomicroscópio (ZeissAxiophot) equipado com filtros RBG (Red, Blue, Green) e com software Isis FISH Imaging System (MetaSystems).

VI. 5. RESULTADOS

São registradas na amostra seis novas localidades de ocorrência para *Blarinomys* no território brasileiro, sendo: Trancoso, BA; Linhares, ES; Parque Nacional da Serra do Caparaó, ES/MG; São Bernardo do Campo, SP; Biritiba-Mirim, SP; e Parque Estadual da Serra do Mar, Natividade da Serra, SP.

VI. 5. 1. *Análises filogenéticas moleculares*

Dez haplótipos foram encontrados em nossa amostra sendo que os espécimens de Jussari e Una, no Estado da Bahia, apresentaram total similaridade de sequência.

A matriz, que incluiu as 11 sequências de espécimes do gênero *Blarinomys* e também sequências de espécies de *Brucepattersonius*, *Scapteromys*, *Euryoryzomys* e *Oecomys*, apresenta 755pb das quais 519 são constantes, 51 não informativos e 185 informativos na análise de parcimônia.

Em todas as análises filogenéticas, o gênero *Blarinomys* apresentou-se monofilético e grupo irmão de *Brucepattersonius* (Figs. 3 e 4).

A análise de MP recuperou uma árvore mais parcimoniosa com comprimento de 430 passos, índice de consistência (IC) de 0,68 e índice de retenção (IR) de 0,75. Na figura 3 é apresentada a árvore mais parcimoniosa com os índices de Bremer e valores de *bootstrap*. Foram obtidos dois agrupamentos principais, clado Nordeste (A) e clado Sudeste, irmãos entre si. O primeiro grupo (clado A) apresentou índice de Bremer de 5 e *bootstrap* de 91%; sua distribuição inclui os Estados da Bahia e do Espírito Santo e é representada por exemplares provenientes da região de baixada na faixa litorânea em altitudes inferiores a 50 metros e de Jussari em altitude aproximada de 150 metros. Na análise de MP, este grupo inclui dois clados irmãos (L1 L2) e (L3 L4). O clado Sudeste apresenta índice de Bremer de 6 e *bootstrap* de 94% e reúne os exemplares da região sudeste do Brasil, nos Estados do Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo. Nesse clado estão dois grupos irmãos, o clado B (L5a L5b) (*bootstrap* 100%, índice de Bremer 15) com representantes que habitam maiores altitudes, em torno de 1350 metros na Serra do Caparaó e o clado C ((L6 L7a L8) (L7b L7c)) (*bootstrap* 100% e índice de Bremer 7) com exemplares provenientes do planalto no Estado de São Paulo em altitudes que variam de 720 a 780 metros.

Na análise de MV, o modelo mais adequado encontrado pelo teste de razão de verossimilhança foi o GTR+G: (*General Time Reversible*) ou Modelo Geral Reversível, que prevê taxas variáveis para todos os tipos de substituição, mais taxas variáveis com distribuição gama entre os sítios. Na figura 4 é apresentada a árvore de verossimilhança obtida com valores de *bootstrap*. A topologia da árvore obtida através de MV é similar à descrita acima para a análise de MP. Além disso, os valores de *bootstrap* dos clados que são comuns nas análises são próximos (Fig. 3 e 4), com exceção do clado A que apresenta menor valor de *bootstrap* de 73% em MV. Assim, foram recuperados por MV dois clados principais,

Nordeste (A) e Sudeste, este último agrupando dois clados monofiléticos e irmãos entre si, B e C. A diferença entre a topologia obtida por MP e a encontrada por MV consiste nas relações internas no clado A, em que L3 e L4 não formam um grupo monofilético, e nas relações internas do clado C, em que o subclado (L6 L7a L8) obtido através da MP colapsou-se em MV, restando apenas o subclado (L7b L7c) como monofilético dentro do clado C.

A matriz de distância genética corrigida é apresentada na Tabela 2. A divergência entre as sequências dos indivíduos dos clados Nordeste (A) e Sudeste variou entre 4,7% e 8,0%, enquanto que, entre os indivíduos dos clados B e C a variação encontrada foi de 4,3% a 5,7%; entre os indivíduos do clado Nordeste e do clado B a variação foi de 6,1% a 8,0% e entre os indivíduos do clado Nordeste e do clado C variou de 4,7% a 6,4%. Dentro dos clados a divergência genética variou de 0% to 4,2% no clado Nordeste, foi de 0,7% no clado B, e variou de 0,1% a 1,3% no clado C. A divergência encontrada entre as sequências de espécimens localizados em mesma região geográfica variou de 0% a 1,3%. Os exemplares de L3 e L4, que se apresentaram parafiléticos em MV apresentam entre si divergência de 2,8%.

Tabela 2. Diagonal inferior: matriz de distância genética, em porcentagem, corrigida entre os exemplares de *Blarinomys*.

	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5a	L 5b	L 6	L 7a	L 7b	L 7c	L 8
L 1	0										
L 2	0,0	0									
L 3	0,040	0,040	0								
L 4	0,042	0,040	0,028	0							
L 5a	0,080	0,077	0,065	0,080	0						
L 5b	0,076	0,076	0,061	0,078	0,007	0					
L 6	0,061	0,061	0,047	0,061	0,046	0,043	0				
L 7a	0,063	0,063	0,048	0,063	0,048	0,045	0,001	0			
L 7b	0,063	0,063	0,054	0,063	0,051	0,049	0,005	0,007	0		
L 7c	0,059	0,058	0,058	0,063	0,057	0,056	0,011	0,013	0,013	0	
L 8	0,064	0,064	0,048	0,059	0,049	0,045	0,001	0,003	0,003	0,013	0

Nota: L1 – L8 representam as localidades de cada exemplar no mapa da figura 2.

VI. 5. 2. *Análises citogenéticas*

Os exemplares do Estado de São Paulo (clado C) apresentaram quatro números diplóides distintos de $2n=43$, $2n=37$, $2n=34$ e $2n=31$ podendo apresentar cromossomos supernumerários, porém o mesmo número de braços autossômicos de $NF=50$, sem que fossem considerados os supernumerários ou os cromossomos sexuais, o exemplar de Jussari na Bahia (clado A) apresentou $2n=52$, conforme apresentado a seguir:

(I) CIT 1391, exemplar fêmea da Serra da Cantareira, SP apresentou em coloração convencional $2n=43$ cromossomos, sendo seis pares de cromossomos meta/submetacêntricos decrescentes em tamanho, um par (5) heterozigoto mediano constituído por três cromossomos, sendo um submetacêntrico e dois acrocêntricos de tamanhos diferentes, decorrentes de rearranjo Robertsoniano, 11 pares acrocêntricos decrescentes em tamanho, quatro cromossomos supernumerários que são pequenos metacêntricos e os cromossomos X acrocêntricos médios (Fig. 5A). O padrão de banda GTG permitiu a identificação dos autossomos homólogos (incluindo o par heterozigoto 5) e dos cromossomos X; os pequenos metacêntricos são negativos para bandas GTG (Fig 5B). Com o uso da técnica de bandas RGB por incorporação de 5-BrdU foi possível detectar que, além de um dos cromossomos X, os quatro pequenos cromossomos metacêntricos supernumerários também possuem replicação tardia (Fig. 6). As Ag-RONs se mostraram múltiplas, variando de três a sete marcações (Fig. 7). Pouca heterocromatina constitutiva foi evidenciada pela técnica de bandamento CBG; os pequenos blocos localizam-se na região pericentromérica em alguns cromossomos acrocêntricos, dos cromossomos X e em três dos pequenos metacêntricos (Fig. 8A). Após a FISH telomérica, todos os telômeros apresentaram-se marcados. ITS foi observada na região centromérica de um dos menores cromossomos submetacêntricos (par 7) e os pequenos metacêntricos supernumerários apresentaram uma marcação telomérica diferenciada, na qual os telômeros aparecem mais intensos (Fig. 8B).

(II) CIT1633, exemplar macho de São Bernardo do Campo, SP, apresentou em coloração com Giemsa $2n=37$ cromossomos, sendo o cariótipo composto por oito pares de cromossomos meta/submetacêntricos decrescentes em tamanho e nove pares de acrocêntricos decrescentes em tamanho. Foi observado um pequeno cromossomo supernumerário metacêntrico ímpar em todas as metáfases analisadas (Fig. 9A). O cromossomo X é um acrocêntrico médio e o Y um acrocêntrico pequeno. O padrão de bandas G possibilitou a identificação dos pares de homólogos e do X e o cromossomo B apresentou uma banda

positiva distal em cada braço cromossômico (Fig. 9B). Após o procedimento de bandamento C, com exceção do cromossomo X que apresentou um bloco heterocromático na região pericentromérica, não foi observada heterocromatina constitutiva em nenhum outro cromossomo, nem no cromossomo B (Fig. 10A). A FISH telomérica resultou na marcação de todos os telômeros e na detecção de ITS na região centromérica de um dos menores pares submetacêntricos. O pequeno cromossomo metacêntrico apresentou marcação telomérica diferenciada, mais evidente como nos Bs do exemplar CIT 1391 (Fig. 10B).

(III) CIT2259 é uma fêmea, também procedente de São Bernardo do Campo, SP, e apresentou $2n=34$ cromossomos. O cariótipo possui oito pares de cromossomos meta/submetacêntricos, cinco pares de acrocêntricos e dois pares heterozigotos para rearranjo Robertsoniano, sendo um deles (par 3) composto por um submetacêntrico grande e dois acrocêntricos de tamanhos diferentes e outro (par 6) por um metacêntrico médio e dois acrocêntricos pequenos de tamanhos semelhantes. O par sexual X é acrocêntrico. Os padrões das bandas longitudinais gerados pela coloração com DAPI permitiram a identificação de todos os pares homólogos, incluindo os pares heterozigotos para os rearranjos e permitiram também a identificação dos cromossomos X com duas bandas no braço longo (Fig. 11A). A pintura cromossômica com sonda do cromossomo ACU X revelou sinais de hibridação nos braços longos dos cromossomos sexuais X que são acrocêntricos grandes (Fig. 11B).

(IV) O exemplar ROD 66, procedente de Natividade da Serra, SP, é uma fêmea e apresentou $2n=31$. O cariótipo é constituído por onze pares com dois braços que são decrescentes em tamanho, um par heterozigoto para rearranjo Robertsoniano formado por um metacêntrico médio e dois acrocêntricos de tamanhos semelhantes (par 7), um par acrocêntrico pequeno (par 13) e dois supernumerários metacêntricos pequenos. Os cromossomos X são acrocêntricos grandes (Fig. 12A). Os padrões das bandas GTG permitiram realizar o emparelhamento de todos os homólogos, incluindo os cromossomos do par heterozigoto para o rearranjo Robertsoniano e os cromossomos X (Fig. 12B). Pequenos blocos heterocromáticos foram evidenciados na região pericentromérica de alguns autossomos e os cromossomos X mostraram-se heteromórficos quanto ao tamanho do bloco de heterocromatina no pequeno braço curto. Os cromossomos Bs não apresentaram região heterocromática (Fig. 13A). Todos os telômeros apresentaram-se marcados após a FISH, e sinais adicionais (ITS) foram observados na região centromérica de um par metacêntrico mediano (par 6) e dos dois menores pares submetacêntricos (11 e 12) (Fig. 13B).

(V) O exemplar CIT1538, macho, proveniente de Jussari, BA, apresentou 52 cromossomos. O cariótipo apresenta 23 pares de autossomos decrescentes em tamanho acrocêntricos, e o par 4 submetacêntrico. Foi constatada a presença de dois pequenos metacêntricos supernumerários. O cromossomo X é acrocêntrico um dos maiores do complemento e o Y um acrocêntrico pequeno (Fig. 14A). As bandas CBG revelaram blocos heterocromáticos em regiões pericentroméricas de alguns cromossomos, em um dos braços dos cromossomos Bs e o cromossomo Y heterocromático (Fig. 14B). Todos os telômeros foram marcados após a FISH com sondas teloméricas e cada pequeno metacêntrico supernumerário apresentou ITS na região heterocromática de um dos braços (Fig. 14C).

Como os pequenos cromossomos metacêntricos foram considerados como supernumerários, uma vez que houve a constatação da replicação tardia dos mesmos em CIT 1391 (Fig. 6) e eles aparecerem em número variável (0-4) levando ao polimorfismo cromossômico quanto ao número, tamanho, natureza da heterocromatina e de sequências teloméricas, temos que os exemplares de *Blarinomys* estudados no presente trabalho apresentaram: (I) CIT 1391, $2n=43$ (37A+4Bs, XX) e NF=50 com número de autossomos ímpar por ocorrência de um rearranjo Robertsoniano heterozigoto no par 5 envolvendo um metacêntrico e dois acrocêntricos; (II) CIT1633, $2n=37$ (34A+1B, XY) e NF=50; (III) CIT2259, $2n=34$ (32A, XX) e NA=50 com ocorrência de dois pares heterozigotos (3 e 6) para rearranjos Robertsonianos; (IV) ROD 66, $2n=31$ (27A+2Bs, XX) e NF=50 com o par 7 heterozigoto para rearranjo Robertsoniano. O exemplar coletado em Jussari, Estado da Bahia, apresentou (V) $2n=52$ (48A+2Bs, XY) e NF=50 com os elementos autossômicos acrocêntricos, por exceção do par 4 submetacêntrico e 2 cromossomos Bs metacêntricos.

A comparação dos padrões de bandas GTG entre os pares cromossômicos dos complementos de São Paulo revelou a homologia entre seus autossomos e cromossomos sexuais. Identificamos 3 diferentes pares heteromórficos envolvidos em rearranjos Robertsonianos, que são, o par 5 do complemento de $2n=43$, o par 3 do complemento com $2n=34$ e, os pares 6 e 7, respectivamente, dos complementos $2n=34$ e $2n=31$ apresentam o mesmo rearranjo entre os mesmos cromossomos homólogos. Na figura 15 é mostrada a comparação dos padrões de bandas GTG entre alguns cromossomos homólogos que se apresentam rearranjados entre quatro dos complementos.

VI. 6. DISCUSSÃO

VI. 6. 1. *Filogenia molecular*

As análises de filogenia molecular evidenciaram o monofiletismo de *Blarinomys* provenientes de diferentes localidades da Mata Atlântica. Foram recuperadas duas linhagens principais (Nordeste e Sudeste) nas árvores de MP e de MV (Fig. 3 e 4). O clado A (Nordeste) agrupa exemplares de Una e Jussari (BA), com exemplares de Linhares (ES) e Trancoso (BA), que habitam altitudes inferiores a 150m; já o clado Sudeste agrupa exemplares do alto da Serra do Caparaó, ES e MG, altitude entre 1350m (clado B) com os provenientes do planalto Paulistano, altitudes entre 720m e 780m, de São Bernardo do Campo, São Paulo e Biritiba-Mirim, SP (clado C).

As análises moleculares demonstraram a existência de duas linhagens disjuntas geograficamente na região da Mata Atlântica, permitindo identificar duas grandes regiões dentre desse domínio, cujo limite entre elas ocorre aproximadamente na latitude de 20 graus. Estudos anteriores envolvendo diferentes grupos de vertebrados também reconheceram duas grandes regiões na Mata Atlântica, separando a fauna em um componente Nordeste e outro Sudeste, como demonstrado para espécies de lagartos (Vanzolini, 1988; Pellegrino e col., 2005), aves (Bates e col., 1998; Cabanne e col., 2007), e pequenos mamíferos não voadores (Costa e col., 2000; Costa, 2003).

A relação de grupo irmão entre os componentes Nordeste e Sudeste, proposta no presente estudo, foi encontrada em três desses exemplos: o marsupial *Metachirus nudicaudatus* (Costa, 2003), o lagarto *Gymnodactylus darwinii* (Pellegrino e col., 2005) e a ave *Xiphorhynchus fuscus* (Cabanne e col., 2007), sendo que Pellegrino e col. (2005) atribuíram essa quebra a presença do sistema do Rio Doce em um processo de vicariância. Os dados de *Blarinomys* são compatíveis com essa hipótese do Rio Doce como barreira na Mata Atlântica, uma vez que a disjunção geográfica entre as duas linhagens originadas na dicotomia basal ocorre na região do sistema do Rio Doce. Infelizmente, as localidades amostradas no presente estudo não permitem testar tal hipótese, já que a altitude de onde as amostras são provenientes deve ser levada em consideração. Assim, o clado A, que ocorre exclusivamente ao norte do Rio Doce, inclui somente exemplares provenientes de baixas altitudes, enquanto que os representantes dos clados B e C, que ocorrem exclusivamente ao sul do Rio Doce, são provenientes de altitudes maiores, sendo o clado B com exemplares amostrados no alto da Serra do Caparaó (> 1300m) e o clado C com exemplares do planalto

paulistano (720-780m). Segundo Geise e col. (2008), *Blarinomys breviceps* ocorre também em região de altitude elevada (620-771m) ao norte do Rio Doce (e.g., Conceição do Mato Dentro, Lagoa Santa e Santa Bárbara, Minas Gerais) e altitudes baixas ao sul deste rio (60m) como em Aracruz, Espírito Santo. Com a inclusão de exemplares provenientes destas localidades na análise e seu posicionamento nos clados recuperados, a influência da presença do rio e da diferença altitudinal na diversificação de *Blarinomys* poderá ser melhor compreendida.

VI. 6. 2. *Divergência entre sequências*

Segundo Smith e Patton (2007), a divergência genética das sequências do gene mitocondrial do citocromo *b* entre espécies de *Akodon* é, em média, 12 %, enquanto que, dentro de clados, que agrupam de cinco a oito espécies, a distância genética varia de 7% a 9%.

Dados de distâncias genéticas de sequências de citocromo *b* de *Brucepattersonius*, grupo irmão de *Blarinomys*, levaram Smith e Patton (1999) a sugerirem a existência de duas espécies do gênero em suas amostras. Segundo os autores, divergência genética intra-específica variou de 0,7% a 1,6% e entre as espécies sugeridas de 8,2% a 9,0%.

A divergência genética encontrada entre os representantes de *Blarinomys* dos clados Nordeste e Sudeste e entre representantes dos clados nordeste (A) e B chegaram a 8%. Esse valor pode ser, portanto, representativo de divergência entre espécies.

VI. 6. 3. *Extraordinário polimorfismo cromossômico devido a rearranjos Robertsonianos e sistema de cromossomos supernumerários*

As análises citogenéticas revelaram cinco complementos cromossômicos distintos para *Blarinomys* sendo $2n=52$ (48A+2Bs, XY), $2n=43$ (37A+4Bs, XX), $2n=37$ (34A+1B, XY), $2n=34$ (32A, XX) e $2n=31$ (27A+2Bs, XX), que apresentam o mesmo NF=50. Os dados cariotípicos aqui levantados em conjunto com o apresentado por Geise e col. (2008) para um exemplar de *Blarinomys* do Estado do Rio de Janeiro com $2n=28$ (26A, XY) e NF=50 levam a uma caracterização cromossômica para o gênero *Blarinomys* na qual o número diplóide varia de $2n=28$ a $2n=52$ enquanto o NF=50 se mantém constante. A diferença nos números diplóides se dá pela presença de cromossomos Bs, que são pequenos metacêntricos com replicação tardia e que variam em número de um a quatro, e de eventos de rearranjos

Robertsonianos. Além da constância no número de braços de autossomos, os rearranjos de fusão/fissão cêntricas são evidentes quando notamos o par 5 que é heterozigoto constituído por dois acrocêntricos e um metacêntrico, responsável pelo número diplóide ímpar de $2n=43$ em um dos exemplares e apresenta-se na forma homozigota constituído por dois metacêntricos nos exemplares com $2n=37$, $2n=34$ e $2n=31$; a presença de ITS na região centromérica nos homólogos do par 7 do exemplar CIT1391, dos homólogos do par 6 de CIT1633 e em três pares de homólogos em ROD 66 também é uma evidência da ocorrência de rearranjos Robertsonianos.

Segundo revisão realizada por Slijepcevic (1998) os mecanismos de formação dos rearranjos Robertsonianos do tipo fusão, requerem eliminação ou inativação das sequências teloméricas antes que haja a reorganização, levando à presença ou ausência de ITS nos sítios de fusão dos cromossomos resultantes. As sequências teloméricas remanescentes de cromossomos ancestrais envolvidos em evento de fusão cêntrica, após amplificação que levaria a maturação de neo-telômeros/neo-cêntromeros, possibilitariam, posteriormente, a fissão cêntrica (Ruiz-Herrera e col., 2008). Em *Blarinomys* foi evidenciado pela FISH telomérica que alguns cromossomos com dois braços apresentam sinais de sequências teloméricas na região pericentromérica. Esse padrão de hibridação das sequências teloméricas pode indicar que ocorreram tanto a eliminação, quando a região pericentromérica não apresenta marcação, quanto a inativação das sequências teloméricas retidas por um suposto mecanismo de fusão cêntrica. Se considerarmos o processo de aumento no número diplóide por fissão cêntrica essas sequências intersticiais podem ser interpretadas como sequências que propiciariam a formação de neo-telômeros e centrômeros para os cromossomos originários desse processo.

Em uma pequena amostra de seis exemplares de *Blarinomys* até então cariotipados, foi possível identificar um alto grau de polimorfismo devido a rearranjos Robertsonianos, responsável pela variação cariotípica de números de autossomos de 48 a 26, onde estão representados praticamente os dois extremos do sistema, já que no primeiro caso é observado 46 autossomos acrocêntricos e dois submetacêntricos e no segundo, 24 autossomos meta/submetacêntricos e dois acrocêntricos. Assumindo consecutivos eventos de fusão/fissão cêntrica, existem no cariótipo com $2n=28$ (26A, XY) (Geise e col., 2008) 44 autossomos fusionados (22 rearranjos Robertsonianos) em relação ao cariótipo de CIT 1538 com $2n=52$ (48A+2Bs, XY) e trata-se do extremo (menor diplóide possível) dentre as possibilidades

desse mecanismo, ou vice-versa, uma vez que os elementos autossômicos restantes são apenas os homólogos de um par de acrocêntrico. Nesse cenário é possível que existam em populações naturais de *Blarinomys*, uma extrema variação de números diplóides com 24 possibilidades, sem que seja considerada a ocorrência de supernumerários.

VI. 6. 4. *Natureza dos supernumerários*

A ocorrência de cromossomos Bs, segundo revisão de Silva e Yonenaga-Yassuda (2004), já foi relatada na literatura para oito espécies de sete gêneros de roedores brasileiros que são *Akodon montensis* ($2n=24+0-2Bs$), *Sooretamys angouya* ($2n=58+0$ ou $2Bs$) (referido como *Oryzomys angouya* antes de Weksler e col., 2006), *Holochilus brasiliensis* ($2n=56+0-2Bs$), *Nectomys rattus* ($2n=52+0-3Bs$), *N. squamipes* ($2n=56+0-3Bs$), *Oligoryzomys flavescens* ($2n=64+0-2Bs$), *Proechimys* sp. 2 ($2n=26+0-1B$) e *Trinomys iheringi* ($2n=60+1-6Bs$). Na maioria dos casos citados, os supernumerários são heterocromáticos e, como os de *Blarinomys* ($2n=37+4Bs$, XX), possuem replicação tardia; são heterogêneos quanto ao tamanho, morfologia, padrão de bandas e presença ou ausência de Ag-RONs ou ITS após FISH telomérica. Em nossa amostra, notamos que nos distintos exemplares de *Blarinomys* diferentes características são atribuídas aos supernumerários. Eles podem ser caracterizados pela ausência ou presença de heterocromatina constitutiva, e quando presente, pode estar localizada na região pericentromérica ou em um dos braços do elemento supernumerário metacêntrico. Também apresentam distintas marcações após FISH telomérica, com sinais na região dos telômeros bastante intensos, e podem apresentar ITSs em um dos braços, co-localizadas com a região de heterocromatina constitutiva que nesse caso apresenta natureza semelhante à sequência telomérica.

VI. 6. 5. *A evolução cromossômica em **Blarinomys***

O agrupamento monofilético dos indivíduos que possuem grandes diferenças cromossômicas da linhagem de *Blarinomys* mostra uma entidade taxonômica na qual rearranjos cromossômicos do tipo fusão/fissão cêntrica e presença de cromossomos Bs parecem ser característicos. A linhagem ao Nordeste tem um representante que apresenta número diplóide mais elevado, com complemento composto em sua grande maioria por elementos acrocêntricos, e na linhagem Sudeste indivíduos com números diplóides menores e que apresentam marcante presença de cromossomos metacêntricos em sua composição. A

diferenciação cromossômica na amostra de *Blarinomys* do Estado de São Paulo ocorre predominantemente por fusão/fissão cêntrica de autossomos. Na condição heterozigótica, um cromossomo de dois braços usualmente se segrega normalmente dos acrocêntricos homólogos com quem emparelha durante a meiose, de modo que os gametas tem genoma haplóide completo após segregação equilibrada do trivalente (Futuyma, 1997). Assim, é possível a manutenção destes rearranjos em heterozigose, como observado nos exemplares de São Paulo. Segundo os modelos tradicionais de evolução cromossômica, este tipo de rearranjo é mais facilmente fixado na população, porém é ineficiente no isolamento reprodutivo, caso sejam selecionados mecanismos de segregação balanceada do trivalente.

Porém podemos considerar que, se esse mecanismo de evolução cromossômica da nossa amostra de *Blarinomys*, que se dá por fusão cêntrica dos autossomos, ele pode levar ao isolamento reprodutivo como o previsto pelo modelo de fusão cêntrica monobraquial que, segundo Baker e Bickham (1986), ocorre de forma espontânea e prevê isolamento geográfico. Nesse modelo uma eficiente barreira reprodutiva, que leva a esterilidade, pode ser formada entre diferentes populações que apresentem fixação de fusões cêntricas que resultem em homologias monobraquiais (na qual um braço é homólogo mas o outro não) dos cromossomos resultantes com dois braços. A hibridação por contato secundário resulta então na formação de multivalentes complexos, os quais encontram problemas na segregação e produzem gametas não-balanceados.

VI. 6. 6. *Considerações finais*

O tamanho da atual amostra limita a obtenção de resultados mais conclusivos, como por exemplo através de abordagens biogeográficas mais elaboradas. Deve-se ter em mente, no entanto, que *Blarinomys* é um grupo de roedores raros em coleções científicas e de difícil obtenção em capturas, limitando a disponibilidade de material para estudos citogenéticos e moleculares. Novas coletas devem ser realizadas em pontos estratégicos com a finalidade de se obter novos exemplares que possam esclarecer questões levantadas sobre a taxonomia e biogeografia de *Blarinomys*. Isso é especialmente evidente nos casos da amostragem da localidade-tipo do gênero, Lagoa Santa, MG, além de áreas de altitude moderada ao norte do Rio Doce e áreas de baixada ao sul do Rio Doce. Os resultados combinados de filogenia molecular e citogenética e as inferências de divergência genética apresentados neste trabalho

revelam uma diversidade até então desconhecida para *Blarinomys* e um interessante cenário evolutivo da Mata Atlântica que merece maiores investigações.

Figura 1. Exemplar de *Blarinomys* (CIT 1391) fêmea, procedente do Parque Estadual da Serra da Cantareira (Núcleo Pedra Grande), SP.

Figura 2. Mapa com as localidades dos exemplares do gênero *Blarinomys* amostrados nesse trabalho (●): 1. Jassari, Serra do Teimoso, BA. 2. Una, BA; 3. Trancoso, BA; 4. Linhares, ES; 5. Parque Nacional da Serra do Caparaó, ES/MG. 6. Parque Estadual da Serra da Cantareira, Núcleo Pedra Grande, São Paulo, SP; 7. São Bernardo do Campo, SP; 8. Biritiba-Mirim, SP; 9. Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia, Natividade da Serra, SP. As setas em vermelho indicam, de cima para baixo, os rios: Pardo e Jequetinhonha, Doce e Paraíba do Sul, respectivamente.

Figura 3. Árvore mais parcimoniosa (IC=0,68 e IR=0,75) obtida com 10000 réplicas pelo método de MP para 11 exemplares do gênero *Blarinomys* e grupos externos. Números acima dos clados são valores do índice de Bremer e abaixo, valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Os parênteses indicam os códigos de acesso de sequências retiradas do GenBank. L1 – L8 representam as localidades de cada exemplar no mapa da Figura 2.

Figura 4. Árvore mais provável de relações filogenéticas obtida com 1000 réplicas pelo método de MV entre 11 exemplares do gênero *Blarinomys* e gupos externos. Números nos clados são valores de *bootstrap* obtidos com 500 réplicas. Os parênteses indicam os códigos de acesso de sequências retiradas do GenBank. L1 – L8 representam as localidades de cada exemplar no mapa da Figura 2.

Figura 5. Cariótipos do exemplar fêmea CIT1391 com $2n=43$ (37A+4Bs, XX) e NF=50. (A) coloração convencional. Em destaque pequenos metacêntricos supernumerários de outra metáfase; (B) bandas GTG. Em destaque o rearranjo do par 5 heterozigoto de outra metáfase.

Figura 6. Metáfase do exemplar CIT1391, $2n=43$ (37A+4Bs, XX) e NF=50 em bandamento RBG por incorporação de 5-BrdU. O cromossomo X de replicação tardia é indicado pela letra "X" e os pequenos metacêntricos supernumerários, são indicados por asteriscos. No canto inferior direito, o par sexual mostrando o X de replicação tardia (Xt) e o precoce (Xp) de outra metáfase.

Figura 7. Cromossomos portadores Ag-RONs do CIT1391 (A) 4 Ag-RONs e associação de 3 cromossomos. (B) 7 Ag-RONs, uma associação de dois cromossomos.

Figura 8. Metáfases do CIT1391 $2n=43$ (37A+4Bs, XX) e NF=50. (A) Bandas CBG com pequenos blocos heterocromáticos em alguns cromossomos incluindo três supernumerários. (B) FISH com sondas teloméricas; nos quadrados, à direita, estão os homólogos do par 7 portador de ITS de outra metáfase. Os asteriscos mostram os pequenos metacêntricos supernumerários em A e B.

Figura 9. Cariótipos do exemplar macho CIT1633, $2n=37$ (34A+1B, XY) e NF=50. (A) Coloração convencional. (B) Bandas GTG.

Figura 10. Metáfases do CIT1633, $2n=37$ (34A+1B, XY) e NF=50. (A) padrão das bandas CBG com uma tênue marcação na região pericentromérica do X. (B) FISH telomérica. Em destaque, à direita, os homólogos que apresentam ITS de outra metáfase. Os asteriscos marcam o pequeno metacêntrico supernumerário em A e B.

Figura 11. Cariótipo e metáfases de fêmea CIT2259, $2n=34$ (32A, XX) e NF=50, com pares 3 e 6 heteromórficos. (A) Coloração por DAPI invertida. (B) Pintura cromossômica com sonda ACU X em verde; a sonda do cromossomo X aparece hibridada na região do braço longo, com exceção da região pericentromérica.

Figura 12. Cariótipos do exemplar fêmea ROD 66, 2n=31 (27A+2Bs, XX) e NF=50 com o par 7 heteromórfico. (A) Coloração convencional. (B) Bandas GTG. Em destaque o par heteromórfico 7 de outra metáfase.

Figura 13. Metáfases de ROD 66, $2n=31$ (27A+2Bs, XX) e NF=50. (A) padrão das bandas CBG. (B) FISH telomérica. As setas indicam os três pares que apresentam ITS. Os asteriscos marcam os pequenos metacêntricos supernumerários em A e B.

Figura 14. Cariótipo e metáfases de macho, CIT1538 $2n=52$ ($48A+2Bs$, XY) e NF=50. (A) Coloração convencional. Note o par 4 submetacêntrico. (B) Metáfase mostrando bandas CBG. Note o cromossomo X com banda positiva pericentromérica, o Y heterocromático e os Bs não foram identificados. (C) Metáfase mostrando padrão da FISH telomérica. Os asteriscos indicam os pequenos metacêntricos supernumerários que apresentam ITS em um dos braços. À direita, detalhe dos pequenos metacêntricos de outra metáfase.

Figura 15. (A-C) Identificação das homologias pelos padrões de bandas GTG de três pares cromossômicos envolvidos em rearranjos Robertsonianos nos exemplares de *Blarinomys* com (I) 2n=43 (37A+4Bs, XX), (II) 2n=37 (34A+1B, XY), (III) 2n=34 (32A, XX) e (IV) 2n=31 (27A+2Bs, XX). Os números dos cromossomos de cada exemplar, são mostrados nas figuras. Quando o par se apresenta heterozigoto para rearranjo Robertsoniano os três cromossomos são mostrados. Os asteriscos indicam o local de ocorrência dos rearranjos.

VI. 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, R. J., E J. W. BICKHAM. 1986. Speciation by monobrachial centric fusions. *Proceedings Natural Academy of Sciences*. 83: 8245–8248.
- BATES, J. M., S. J. HACKETT, E J. CRACRAFT. 1998. Area-relationships in the neotropical lowlands: an hypothesis based on raw distributions of passerine birds. *Journal of Biogeography*, 25,783–793.
- BREMER, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics*. 10: 295-304.
- CABANNE, G. S., F. R. SANTOS, E C. Y. MIYAKI. 2007. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of Linnean Society*. 91: 73-84.
- CHEBEZ, J. C., E E. MASSOIA. 1996. Mamíferos de la provincia de Misiones. Pp. 180-308 in *Fauna Misionera. Catálogo sistemático y zoogeográfico de los vertebrados de la provincia de Misiones (Argentina)* (J.C. Chebez, ed.). L.O.L.A. (Literature of Latin America), Buenos Aires.
- COSTA, L.P., Y. L. R. LEITE, G. A. B. D. FONSECA, E M. T. D. FONSECA. 2000. Biogeography of South American forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica*. 32: 872–881.
- COSTA, L. P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*. 30:71-86.
- D'ELIA, G. 2003. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics* 19: 307-323.
- D'ELIA, G., E. M. GONZALES, E U. F. J. PARDIÑAS. 2003. Phylogenetic analyses of sigmodontine rodents (Muroidea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. *Mammalian Biology* 68:351-364.
- D'ELÍA, G., U. F. J. PARDIÑAS, P. TETA, E J. L. PATTON. 2007. Definition and diagnosis of a new tribe of sigmodontine rodents (Cricetidae, Sigmodontinae), and a revised classification of the subfamily. *Gayana*. 7: 187-194.
- GEISE, L., H. G. BERGALLO, C. E. L. ESBERARD, C. F. D. ROCHA, E M. V. SLUYS. 2008. The karyotype of *Blarinomys breviceps* (Mammalia: Rodentia: Cricetidae) with comments on its morphology and some ecological notes. *Zootaxa (Online)*. 1907: 47-60.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- FETZNER, J. W. 1999. Extracting high-quality DNA from shed reptile skins: a simplified method. *Bio Techniques* 26 (6):1052-1054.
- FORD, C. F., E J. L. HAMERTON. 1956. A colchicin hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosome. *Stain Thechnics*. 31: 247-251.

- FUTUYMA, D. J. 1997. *Biologia Evolutiva* (trad. Mario de Vivo). 2.ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto. 646pp.
- HERSHKOVITZ, P. 1966. Mice, land bridges and Latin American faunal interchange. Pp. 725-751 in *Ectoparasites of Panama*. (R. L. Wenzel and V. J. Tipton, eds.) Field Museum of Natural History, Chicago.
- LAEMMERT JR., H. W., L. C. FERREIRA, E R. M. TAYLOR. 1946. An epidemiological study of jungle yellow fever in an epidemic area in Brazil. II - Investigations of vertebrate hosts and arthropod vectors. *American Journal of Tropical Medicine*. 26(6):23-69.
- MATSON, J. O., E J. P. ABRAYAYA 1977. *Blarinomys breviceps*. *Mammalian Species*. 74: 1-3.
- MOOJEN, J. 1952. *Os roedores do Brasil*. Instituto Nacional do Livro. Rio de Janeiro, 214 pp.
- MULLER, P. 1973. The dispersal centres of terrestrial vertebrates in Neotropical Realm. *Biogeographica* 2:1-244.
- PARIZZI, M. G., M. L. SALGADO-LABOURIAU, E H. C. KOHEL. 1998. The holocene. 8: 311-320.
- PAGLIA, A. P., F. A. PERINI, M. O. G LOPES, E C. F. S. PALMUTI. 2005. Novo registro de *Blarinomys breviceps* (Winge, 1888) (Rodentia, Sigmodontinae) no estado de Minas Gerais, Brasil. *Lundiana*. 6(2): 155-157.
- PELLEGRINO, K. C. M., M. T. RODRIGUES, N. A. WAITE, M. MORANDO, YONENAGA-YASSUDA, Y., E J. W. SITES J.R. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of Linnean Society*. 85: 13-26.
- POSADA, D., E K. A. CRANDALL. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9):817-818.
- RUIZ-HERRERA, A., S. G. NERGADZE, M. SANTAGOSTINO, E E. GIULOTTO. 2008. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenetic and Genome Research*: 122:219-228.
- SILVA, C.R., A. R. PERCEQUILO, G. E. JACK XIMENES, E M. DE VIVO. 2003. New distributional records of *Blarinomys breviceps* (Winge, 1888) (Sigmodontinae, Rodentia). *Mammalia*. 67(1): 147-152
- SILVA, M. J. J., E Y. YONENAGA-YASSUDA. 2004. B-chromosomes in Brazilian rodents. *Cytogenetics and Genome Research*. 106: 257-263.
- SLIJEPCEVIC, P. 1998. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107: 136-140.
- SMITH, M. F., E J. L. PATTON. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontini tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50: 149-177.

- SMITH, M. F., E J. L. PATTON. 1999. Phylogenetic Relationships and the Radiation of Sigmodontine Rodents in South America: Evidence from Cytochrome b. *Journal of Mammalian Evolution* 6(2): 89-128.
- SMITH, M. F., E J. L. PATTON. 2007 Molecular phylogenetics and diversification of South American grass mice, genus *Akodon*. Pp 827-858 in *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson* (D. A. Kelt, E. P. Lessa, J. Salazar-Bravo e J. Patton, eds.). University of California Publications in Zoology, University of California Press, California.
- SORENSEN, M. D. 1999. TreeRot, ver. 2 Boston: Boston University.
- SWOFFORD, D. L. 2003. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.02b. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- SUGUIO, K., M. L. ABSY, M. FLEXOR, M. P. LEDRU, L. MARTIN, A. SIFEDDINE, F. SOUBIES, B. TURCQ, E J. P. YEBERT. 1993. The evolution of the continental and coastal environments during the last climatic cycle in Brazil (120Ky BP to present). *Boletim IG-USP, Série Científica*. 24: 27-41.
- VANZOLINI, P. E. 1988. Distributional patterns of South American lizards in *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns*. Pp 317–342. (P.E. Vanzolini e W.R. Heyer, eds). Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- WEKSLER M., A. R. PERCEQUILLO, R. S. VOSS. 2006. Ten new genera of oryzomyine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae). *American Museum Novitates*. 3537:1-29.
- WINGE, H. 1887. Jordfundne og nulevende Gnavere (Rodentia) fra Lagoa Santa, Minas Geraes, Brasilien: Med udsigt over gnavernes indbyrdes slægtskab. *E Museo Lundii*. 1:1–178.
- YANG, F., N. P. CARTER, L. SHI, E M. A. FERGUSON-SMITH. 1995. A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma* 103:642-652.

VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foram apresentadas abordagens envolvendo estudos de citogenética comparativa clássica, por meio da comparação do padrões de bandas CBG, GTG, RGB, e molecular, por meio de FISH com uso de sondas teloméricas e cromosomo-específicas em pintura cromossômica recíproca, associados a estudos de filogenia molecular com base em sequências do gene mitocondrial citocromo *b* e à distribuição geográfica de quatro gêneros de roedores: *Akodon*, *Deltamys*, *Thaptomys* e *Blarinomys*, todos da tribo Akodontini (Rodentia; Sigmodontinae).

Esse estudo possibilitou o estabelecimento de inferências sobre mecanismos de diferenciação cromossômica entre quatro espécies do gênero *Akodon* empregando a técnica de pintura cromossômica, o que representou um salto qualitativo na área de Citogenética de Roedores, possibilitando estabelecer homologia completa dos cromossomos das espécies *Akodon paranaensis* $2n=44$, *A. montensis* $2n=24$, *A. cursor* $2n=14-16$ e *Akodon* sp. n. $2n=10$ com um refinamento tecnológico que não era possível com os padrões de colorações cromossômicas longitudinais. Além disso, cinco novos cariótipos com $2n=52$ (48A+2Bs, XY), $2n=43$ (37A+4Bs, XX), $2n=37$ (34A+1B, XY), $2n=34$ (32A, XX) e $2n=31$ (27A+2Bs, XX) foram caracterizados para o gênero *Blarinomys* e foi possível estabelecer a filogenia entre 12 exemplares do gênero provenientes de diferentes localidades da Mata Atlântica.

As abordagens de filogenia molecular também possibilitaram relacionar um novo cariótipo com $2n=40$ e NF=40, XX: XY, como pertencente a uma linhagem do gênero *Deltamys*, e em outro trabalho, confirmaram o monofiletismo de *Thaptomys* além de evidenciar a relação de grupos-irmãos entre os cariótipos de $2n=52$ e NF=52 e o novo cariótipo com $2n=50$ e NF=48.

A pintura cromossômica recíproca nas espécies citadas de *Akodon* permitiu concluir que *Akodon* sp. n., $2n=10$ é a espécie que apresenta cariótipo mais rearranjo, e que deve ter se diferenciado de um cariótipo similar ao de $2n=16$ de *A. cursor* por meio de rearranjos extremamente complexos envolvendo tanto os autossomos quanto o cromossomo X. Foi evidenciado que rearranjos Robertsonianos e em tandem, inversões pericêntricas e/ou reposicionamento de centrômero, inversão paracêntrica, translocações e inserções, e a existência de sítios frágeis nos complementos são fatores envolvidos na evolução cariotípica nesse grupo de espécies.

Os estudos de filogenia molecular realizados com os exemplares de *Deltamys* sp., $2n=40$ e $NF=40$ XX: XY, e outros integrantes de Akodontini, bem como, a comparação feita entre esse cariótipo e o de *Deltamys kemp*i com $2n=37$ e 38 , $NF=38$ $X_1X_1X_2X_2$: X_1X_2Y , mostraram que o gênero em questão possui número diplóide e mecanismo cromossômico de determinação de sexo diferentes daqueles já apresentados na literatura, e é monofilético de modo que as duas linhagens apresentam uma relação de grupos-irmãos bem sustentada pelas análises das sequências do gene mitocondrial do citocromo *b*.

O gênero *Blarinomys* apresentou uma incrível diversidade cariotípica devido à existência de rearranjos Robertsonianos e de cromossomos supernumerário que variam de 0 a 4. A distribuição das sequências telôméricas após FISH mostrou que a existência de sinais na região centromérica não é obrigatória para os processos de rearranjos Robertsonianos nesse gênero, uma vez que alguns cromossomos envolvidos em tais rearranjos apresentaram ITS nessas regiões e outros não; mostrou também que os supernumerários apresentam marcação diferenciada na região telomérica, com sinal mais intenso do que o observado nos autossomos. As análises filogenéticas agruparam os exemplares *Blarinomys* portadores de cariótipos tão rearranjados em um grupo monofilético, que apresenta duas linhagens bem definidas: uma a Nordeste e outra a Sudeste.

Por fim, consideramos que os estudos abrangendo a utilização em conjunto das técnicas de citogenética e de filogenia molecular, no caso, baseada nas sequências de citocromo *b*, constituem uma ferramenta bastante eficaz para acessar a diversidade desse grupo de roedores. Essas abordagens permitiram o reconhecimento de uma diversidade maior do que a admitida por estudos morfológicos para os gêneros considerados monotípicos *Deltamys*, *Thaptomys* e *Blarinomys* que apresentaram, cada um, no mínimo duas linhagens cariotípicas que se relacionam como grupos-irmãos.

BIOGRAFIA

KAREEN VENTURA

Formação Acadêmica

Graduação

1998 – 2001

Bacharelado em Ciências Biológicas

Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, IBUSP, São Paulo, Brasil.

Iniciação Científica

2000 – 2001

Projeto: “Citogenética Comparativa entre roedores do Gênero *Akodon*”

Orientadora: Dra. Yatiyo Yonenaga-Yassuda

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.

Bolsista CNPq

Mestrado

2002 – 2004

Título: “Novos cariótipos, caracterização e diferenciação cromossômica para espécies brasileiras dos gêneros *Thaptomys* e *Akodon* (Sigmodontinae, Akodontini), com uso de citogenética clássica e FISH telomérica”

Orientadora: Dra. Yatiyo Yonenaga-Yassuda

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 2004.

Bolsista FAPESP Processo 02/04773-0

Publicações em revistas científicas

VILELA, ROBERTO V; MACHADO, TAÍS; VENTURA, KAREN; SILVA, MARIA JOSÉ DE JESUS; FAGUNDES, VALÉRIA; YONENAGA-YASSUDA, YATIYO. 2009 THE taxonomic status of the endangered thin-spined porcupine, *Chaetomys subspinosus* (Rodentia), based on molecular and karyologic data. *BMC Evolutionary Biology*. 9:29.

PEREIRA, NÚBIA PONTES; VENTURA, KAREN; SILVA JÚNIOR, MAGNO CANDIDO; SILVA, DANIELA DE MELO; YONENAGA-YASSUDA, YATIYO; PELLEGRINO, KÁTIA CRISTINA MACHADO 2008 Karyotype characterization and nucleolar organizer regions of marsupial species (Didelphidae) from areas of Cerrado and Atlantic rainforest in Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 31(4): 887-892.

VENTURA, KAREN; SILVA, MARIA JOSÉ DE JESUS; XIMENES, GILSON E YONENAGA-YASSUDA, YATIYO 2008. Karyotypic analyses and morphological comments on the endemic and endangered Brazilian painted tree rat *Callistomys pictus* (Rodentia, Echimyidae). *Genetics and Molecular Biology*, 31, 3, 697-703.

VENTURA, KAREN; SILVA, MARIA JOSÉ DE JESUS; FAGUNDES, VALÉRIA; CHRISTOFF, ALEXANDRE URTAH E YONENAGA-YASSUDA, YATIYO 2006. Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG)_n arrays in heterochromatic and aechromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). *Cytogenetic and Genome Research*. 115 (2): 169-175.

VENTURA, KAREN; SILVA, MARIA JOSÉ DE JESUS; FAGUNDES, VALÉRIA; YONENAGA-YASSUDA, YATIYO. 2004. An undescribed karyotype for *Thaptomys* (2n=50) and the mechanism of differentiation from *Thaptomys nigrita* (2n=52) evidenced by FISH and Ag-NORs. *Caryologia* 57(1): 89-97.