

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Caracterização citogenética de espécies
de *Rhipidomys* (Cricetidae, Rodentia)
de Minas Gerais**

ORIENTADA: **Ana Heloisa de Carvalho**
ORIENTADORA: **Marta Svartman**

BELO HORIZONTE

Março – 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ana Heloisa de Carvalho

Caracterização citogenética de espécies de
Rhipidomys (Cricetidae, Rodentia)
de Minas Gerais

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título de Mestre em Genética, área de concentração: Genética Evolutiva e de Populações.

Orientadora: Marta Svartman

Belo Horizonte

2009

043

Carvalho, Ana Heloisa

Caracterização citogenética de espécies de *Rhipidomys* (Cricetidae, Rodentia) de Minas Gerais. [manuscrito] / Ana Heloisa Carvalho. – 2009.

56 f. : il. ; 29,5 cm

Orientadora: Marta Svartman

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral.

1. *Rhipidomys* – Filogenia – Teses. 2. Cricetidae – Teses. 3. Cromossomos – Teses. 4. Citogenética – Teses. 5. Hibridização in situ fluorescente – Teses. 6. Roedor – Filogenia – Minas Gerais – Teses. 7. Reposicionamento Centromérico. I. Svartman, Marta. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral. III. Título.

CDU: 591.15



Dedico aos animais sacrificados em prol da ciência.

Agradecimentos

- À pesquisadora Maria Olímpia Garcia Lopes pela coleta dos exemplares de *Rhipidomys* analisados nesse trabalho.
- Ao pesquisador Dr. Christopher James Tribe pela identificação dos espécimes de *Rhipidomys cariri* presentes em nossa amostra.
- Ao Laboratório de Genética Humana da Universidade de São Paulo, coordenado pela Dra. Angela Vianna Morgante por fornecer a infra-estrutura necessária à realização das técnicas de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) nas minhas amostras.
- Ao Laboratório Citogenética do Hospital das Clínicas de Belo Horizonte por colocar ao meu dispor o fotomicroscópio equipado com a câmara e o programa de captura necessário às microfotografias apresentadas nessa dissertação.
- À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de mestrado nesse último ano.
- À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo financiamento do projeto (processo APQ-1495-3.12/07).
- Aos meus familiares e amigos por me abrigarem, ouvirem minhas angústias e decepções, me darem suporte emocional e financeiro, e também por compartilharem comigo momentos felizes e gratificantes.
- À minha orientadora, Marta Svartman, que aceitou me orientar “no susto”, com o laboratório pouco equipado e sem condições para o projeto que ela realmente gostaria de ter realizado, mas que no fim, apesar dos percalços, foi muito gratificante.

Sumário

Lista Figuras	vi
Lista Tabelas	viii
Lista de abreviaturas	ix
Resumo	x
Abstract	xi
I. Introdução	1
Gênero <i>Rhipidomys</i>	1
<i>Rhipidomys</i> no Brasil	4
Citogenética de <i>Rhipidomys</i>	5
Híbridos Interespecíficos	7
II. Objetivos	10
III. Material e Métodos	11
Amostra	11
Métodos	12
Coloração e Bandeamento Cromossômico	12
Coloração Convencional	12
Bandeamento G	13
Bandeamento C	13
Coloração das Regiões Organizadoras de Nucléolos pelo Nitrato Prata	13
Hibridação in situ Fluorescente (FISH)	14
IV. Resultados e Discussão	17
<i>Rhipidomys macrurus</i>	17
Descrição do Cariótipo	17
Padrões de Bandeamento	17
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	23
Descrição do Cariótipo	23
Padrões de Bandeamento	23
<i>Rhipidomys cariri</i>	27
Descrição do Cariótipo	27
Padrões de Bandeamento	27
<i>Rhipidomys</i> Híbridos	32
Descrição do Cariótipo	32
Padrões de Bandeamento	32
Comparação dos Cariótipos de Espécies de <i>Rhipidomys</i>	37

Hibridação <i>in situ</i> com DNA Genômico (GISH)	41
Experimentos Controle	42
Controle I.	42
Controle II.	42
<i>Rhipidomys macrurus</i> (Experimentos I e II)	43
<i>Rhipidomys mastacalis</i> (Experimentos III e IV)	43
<i>Rhipidomys cariri</i> (Experimentos V, VI e VII)	45
<i>Rhipidomys</i> Híbrido (Experimentos VIII e IX)	46
V. Conclusões	52
VI. Referências Bibliográficas	53

Lista Figuras

Figura 1.	Ocorrência das espécies de <i>Rhipidomys</i> no Brasil (extraído de Bonvicino <i>et al.</i> , 2008).	4
Figura 2.	Localidades de coleta de <i>Rhipidomys</i> em Minas Gerais.	11
Figura 3.	Cariótipo de <i>Rhipidomys macrurus</i> fêmea (2n=44, NF=50).	19
Figura 4.	Cariótipo de <i>Rhipidomys macrurus</i> macho (2n=44, NF=49).	20
Figura 5.	Padrão de bandas G no cariótipo de <i>Rhipidomys macrurus</i> fêmea (2n=44, NF=50).	20
Figura 6.	Padrão de bandas C numa metáfase de <i>Rhipidomys macrurus</i> fêmea (2n=44, NF=50).	21
Figura 7.	Padrão de bandas C numa metáfase de <i>Rhipidomys macrurus</i> macho (2n=44, NF=49).	21
Figura 8.	Cariótipo de <i>Rhipidomys macrurus</i> fêmea após Ag-RON.	22
Figura 9.	Metáfase de <i>Rhipidomys macrurus</i> fêmea (2n=44, NF=50) após hibridação <i>in situ</i> com a sonda telomérica.	22
Figura 10.	Cariótipo de <i>Rhipidomys mastacalis</i> fêmea (2n=44, NF=74).	24
Figura 11.	Padrão de bandas G no cariótipo de <i>Rhipidomys mastacalis</i> macho (2n=44, NF=74).	25
Figura 12.	Padrão de bandas C numa metáfase de <i>Rhipidomys mastacalis</i> fêmea (2n=44, NF=74).	25
Figura 13.	<i>Rhipidomys mastacalis</i> fêmea (2n=44, NF=74) após Ag-RON.	26
Figura 14.	Metáfase de <i>Rhipidomys mastacalis</i> macho (2n=44, NF=74) após hibridação <i>in situ</i> com a sonda telomérica.	26
Figura 15.	Cariótipo de <i>Rhipidomys cariri</i> macho (2n=44, NF=48).	29
Figura 16.	Padrão de bandas G no cariótipo de <i>Rhipidomys cariri</i> macho (2n=44, NF=48).	29
Figura 17.	Padrão de bandas C numa metáfase de <i>Rhipidomys cariri</i> fêmea (2n=44, NF=74).	30
Figura 18.	Cariótipo de <i>Rhipidomys cariri</i> fêmea (2n=44, NF=48) após Ag-RON.	31
Figura 19.	Metáfase de <i>Rhipidomys cariri</i> fêmea (2n=44, NF=48) após hibridação <i>in situ</i> com a sonda telomérica.	31
Figura 20.	Cariótipo de um híbrido macho (2n=44, NF=61).	34
Figura 21.	Padrão de bandas G no cariótipo de uma fêmea híbrida de <i>Rhipidomys</i> (2n=44, NF=61).	35
Figura 22.	Padrão de bandas C numa metáfase de uma fêmea híbrida de <i>Rhipidomys</i> (2n=44, NF=61).	35
Figura 23.	Cariótipo de uma fêmea híbrida de <i>Rhipidomys</i> (2n=44, NF=61) após Ag-RON.	36

Figura 24. Metáfase de <i>Rhipidomys</i> híbrido macho (2n=44, NF=61) após hibridação <i>in situ</i> com a sonda telomérica.	36
Figura 25. Comparação entre os padrões de bandas G dos cromossomos de <i>Rhipidomys macrurus</i> , <i>R. mastacalis</i> e <i>R. cariri</i> .	40
Figura 26. Controles dos experimentos de hibridação com DNA genômico total: (a) metáfase de <i>Rhipidomys mastacalis</i> macho (2n=44, NF=74) após hibridação <i>in situ</i> com o DNA genômico total de <i>R. mastacalis</i> marcado com digoxigenina e (b) metáfase de <i>Rhipidomys</i> híbrido macho (2n=44, NF=61) após hibridação <i>in situ</i> com DNA genômico total do híbrido (<i>R. mastacalis</i> x <i>R. cariri</i>) marcado com digoxigenina.	42
Figura 27. Metáfases de <i>Rhipidomys macrurus</i> fêmea (2n=44, NF=50) após hibridação <i>in situ</i> com: (a) DNA genômico total de <i>R. mastacalis</i> e (b) DNA genômico total do híbrido (metáfase parcial, 2n=42).	43
Figura 28. Metáfase parcial (2n=39) de <i>Rhipidomys mastacalis</i> macho (2n=44, NF=74) após hibridação <i>in situ</i> com DNA genômico total do híbrido.	44
Figura 29. Metáfase de <i>Rhipidomys mastacalis</i> macho (2n=44, NF=74) após hibridação <i>in situ</i> com DNA genômico total de <i>R. mastacalis</i> (a) e do híbrido (b) . Em (c) a imagem resultante da sobreposição de (a) e (b) .	44
Figura 30. Metáfases de <i>Rhipidomys cariri</i> fêmea (2n=44, NF=48) após hibridação <i>in situ</i> com: (a) DNA genômico total de <i>R. mastacalis</i> (metáfase parcial, 2n=43) e (b) DNA genômico total do híbrido.	45
Figura 31. Metáfase de <i>Rhipidomys cariri</i> fêmea (2n=44, NF=48) após hibridação <i>in situ</i> com DNA genômico total de <i>R. mastacalis</i> (a) e do híbrido (b) . Em (c) a imagem resultante da sobreposição de (a) e (b) .	46
Figura 32. Metáfase parcial (2n=42) de <i>Rhipidomys</i> híbrido macho (2n=44, NF=61) após hibridação <i>in situ</i> com DNA genômico total de <i>R. mastacalis</i> .	47
Figura 33. Metáfase de <i>Rhipidomys</i> híbrido macho (2n=44, NF=61) após hibridação <i>in situ</i> com DNA genômico total de <i>R. mastacalis</i> (a) e do híbrido (b) . Em (c) a imagem resultante da sobreposição de (a) e (b) .	47

Lista Tabelas

Tabela 1.	Cariótipos de <i>Rhipidomys</i> descritos na literatura.	6
Tabela 2.	Exemplares de <i>Rhipidomys</i> analisados.	11
Tabela 3.	Número de RON por célula em <i>Rhipidomys macrurus</i> fêmea (2n=44, NF=50) e macho (2n=44, NF=49).	21
Tabela 4.	Número de RON por célula em <i>Rhipidomys mastacalis</i> (2n=44, NF=74).	26
Tabela 5.	Número de RON por célula em <i>Rhipidomys cariri</i> (2n=44, NF=48).	30
Tabela 6.	Número de RON por célula em <i>Rhipidomys</i> híbrido (2n=44, NF=61).	36
Tabela 7.	Correspondência entre os autossomos das espécies de <i>Rhipidomys</i> .	37
Tabela 8.	Experimentos de hibridação <i>in situ</i> com DNA genômico total.	41

Lista de Abreviaturas

2n - Número diplóide

Ag-RON - Coloração das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata

CCD - (Charge-Coupled Device) Dispositivo de carga acoplado

cf. - (confer) para espécie com identificação não confirmada

F1 - Primeira geração

FITC - (Fluorescein Isothiocyanate) Isotiocianato de fluoresceína

GISH - Hibridação *in situ* fluorescente com DNA genômico total

ma - Milhões de anos

NF - Número fundamental, número de braços autossômicos

RC - Reposicionamento centromérico

rDNA - DNA ribossômico

RON - Regiões organizadoras de Nucléolos

S - Sul

sp. - (species) para espécies que não puderam ser identificadas

W - Oeste

Resumo

Foram analisadas cariotipicamente três espécies do gênero *Rhipidomys* coletadas no estado de Minas Gerais. As espécies *R. macrurus*, *R. mastacalis* e *R. cariri* apresentaram, respectivamente, os seguintes números diplóides e fundamentais: $2n=44$, $NF=49$ e 50 ; $2n=44$, $NF=74$; e $2n=44$, $NF=48$. Além dessas espécies, também foram analisados indivíduos híbridos interespecíficos resultantes do cruzamento de uma fêmea de *R. mastacalis* e de um macho de *R. cariri*, que apresentaram $2n=44$, $NF=61$. As análises citogenéticas foram realizadas após bandeamentos G, C e Ag-RON. Experimentos com uma sonda telomérica $(T_2AG_3)_n$ em todas as espécies e em um híbrido marcaram apenas a região terminal de ambos os braços de todos os cromossomos. Dados preliminares utilizando a técnica de hibridação *in situ* com DNA genômico total (GISH) demonstraram conservação genômica e grande similaridade entre as regiões heterocromáticas das três espécies. A diferença encontrada entre a morfologia do cromossomo X das espécies foi devida à variação no conteúdo de heterocromatina constitutiva no braço curto. A diferença morfológica entre os autossomos, especialmente entre as espécies de NF baixo e a de NF alto, resultava principalmente de reposicionamento centromérico. Neste trabalho registramos pela primeira vez a ocorrência de *R. cariri* no estado de Minas Gerais e apresentamos, ineditamente, o cariótipo desta espécie ($2n=44$, $NF=48$).

Abstract

Three species of *Rhipidomys* collected in the state of Minas Gerais were cytogenetically analyzed. *Rhipidomys macrurus*, *R. mastacalis* and *R. cariri* showed, respectively, the following diploid and fundamental numbers: $2n=44$, $FN=49$ and 50 ; $2n=44$, $FN=74$; and $2n=44$, $FN=48$. Besides these species, interspecific hybrids between a *R. mastacalis* female and a *R. cariri* male were analyzed and showed a $2n=44$, $FN=61$. Comparative karyotypical analyses were performed after G- and C-banding and Ag-NOR staining. FISH experiments with a telomeric probe $(T_2AG_3)_n$ in all species and in a hybrid resulted in signals only in the terminal regions of both arms of all chromosomes. Preliminary data using genomic *in situ* hybridization (GISH) demonstrated genomic conservation and a high degree of similarity between the heterochromatic regions of the three species. The differences among the morphology of the X chromosomes in the three species were due to variations in the amount of constitutive heterochromatin in their short arms. The morphological differences between corresponding autosomes of the three species, especially among species with low and high FNs, seem to result from centromeric repositioning. This is the first record of *Rhipidomys cariri* in the state of Minas Gerais and the first description of this species karyotype ($2n=44$, $FN=48$).

I. Introdução

Gênero *Rhipidomys*

A ordem Rodentia possui 2.277 espécies agrupadas em 481 gêneros, sendo, assim, a ordem quantitativamente mais bem representada da classe Mammalia, com aproximadamente 42% das espécies e 39% dos gêneros de mamíferos atuais (Musser e Carleton, 2005). Os roedores são encontrados no mundo todo, excetuando a Antártica, a Nova Zelândia e algumas ilhas oceânicas, e possuem adaptações para os mais variados nichos ecológicos, podendo inclusive passar a vida em tocas subterrâneas ou possuir adaptações para ambientes aquáticos ou desérticos (Myers, 2000).

A superfamília Muroidea está inserida na infraordem Myodonta e subordem Myomorpha, junto com Dipodoidea. De acordo com dados paleontológicos, Muroidea estava presente desde o início do Eoceno, há 56 – 49 milhões de anos (ma) na América do Norte, meados do Eoceno (49 – 37 ma) na Ásia, início do Oligoceno (34 – 28 ma) na Europa, e do Mioceno (23 – 16 ma) na África e, só no início do Plioceno, há cerca de 5,3 – 3,6 ma, apareceram na América do Sul. Nessa superfamília, cuja monofilia foi confirmada por dados paleontológicos, morfológicos e moleculares, está inserida a família Cricetidae (Musser e Carleton, 2005).

Dentre as 30 famílias de roedores vivos, Cricetidae é a segunda maior família da classe Mammalia, com 681 espécies em 130 gêneros agrupados em seis subfamílias distribuídas na América do Norte, América do Sul, Europa e quase toda a Ásia: Arvicolinae, Cricetinae, Lophiomyinae, Neotominae, Tylomyinae e Sigmodontinae (Musser e Carleton, 2005; Nowak, 1999).

Sigmodontinae, uma das mais diversas e complexas subfamílias de mamíferos do Novo Mundo, possui uma distribuição geográfica muito ampla, ocorrendo desde os estados de Nebraska e Nova Jérsei nos Estados Unidos até a Terra do Fogo na Patagônia, mas se distribui principalmente na América do Sul, onde representa 21,9% dos mamíferos vivos (Musser e Carleton, 2005; Nowak, 1999; Smith e Patton, 1999). A grande diversidade encontrada nessa subfamília dificulta o esclarecimento das relações filogenéticas entre seus membros. Por esse motivo, a taxonomia dos sigmodontíneos é incerta em todos os níveis, desde os limites entre espécies até os agrupamentos em tribos. Ao longo dos anos, pesquisadores tentaram determinar as relações entre os membros deste grupo usando caracteres morfológicos externos e crânio-dentais, morfologia estomacal, e características do pênis e sistema reprodutor (Smith e Patton, 1999). A dificuldade em determinar caracteres ideais para a identificação taxonômica tem sido um empecilho para os trabalhos na área. Segundo Voss e Linzey (1981), os táxons costumavam ser agrupados por compartilharem caracteres plesiomórficos e não apomórficos.

Os 74 gêneros e 380 espécies de sigmodontíneos estão divididos atualmente em oito tribos: Akodontini, Ichthyomyini, Oryzomyini, Phyllotini, Reithrodontini, Sigmodontini, Thomasomyini, Wiedomyini e alguns gêneros *incertae sedis*. Cinco dos 74 gêneros, compreendendo 58 espécies, são encontrados na tribo Thomasomyini: *Aepeomys*, *Chilomys*, *Rhagomys*, *Rhipidomys* e *Thomasomys* (D'Elia *et al.*, 2006; Musser e Carleton, 2005).

O gênero *Aepeomys* possui apenas duas espécies, *A. lugens* e *A. reigi*, que se distribuem, respectivamente, pela região andina da Venezuela ao Equador e nos Andes venezuelanos (Musser e Carleton, 2005). Dois cariótipos foram descritos para o gênero: $2n=28$, $NF=48$ para *A. lugens* (Aguilera *et al.*, 2000) e $2n=44$, $NF=46$ para *A. reigi* (Aguilera *et al.*, 1994). *Chilomys instans* é a única espécie descrita do gênero. Ocorre da região central do Equador até o oeste da Venezuela e ainda não teve seu cariótipo descrito (Musser e Carleton, 2005). São conhecidas apenas duas espécies de *Rhagomys*: *R. longilingua* ocorre nas florestas densas do leste dos alpes andinos e sudeste do Peru e *R. rufescens* só foi encontrado na localidade tipo, Rio de Janeiro, RJ. Nenhum cariótipo foi descrito para o gênero (Musser e Carleton, 2005).

Thomasomys é o gênero mais especioso da tribo, com 37 espécies. A distribuição desse gênero também se restringe às cadeias andinas, indo da Venezuela à Bolívia (Musser e Carleton, 2005). Onze cariótipos já foram descritos para dez espécies. As fórmulas cariotípicas encontradas foram: $2n=24$, $NF=42$ para *T. niveipes*; $2n=40$, $NF=40$ e $2n=42$, $NF=40$ para *T. laniger*; $2n=42$, $NF=42$ para *T. monochromos*; $2n=44$, $NF=42$ para *T. andersoni*, *T. aureus*, *T. sp.* e *T. vestitus*; e $2n=44$, $NF=44$ para *T. kalinoswskii*, *T. notatus* e *T. taczanowski* (Aguilera *et al.*, 2000; Gardner e Patton, 1976; Gómez-Laverde *et al.*, 1997; Salazar-Bravo e Yates, 2007).

De todos os gêneros de Sigmodontinae, *Rhipidomys*, com 18 espécies, possui a distribuição mais ampla, que vai do Panamá, passando pela floresta tropical sul-americana até o sudeste do Brasil e norte da Argentina. Com hábitos arborícolas, esse roedor ocorre em formações florestais na Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado e áreas úmidas da Caatinga (Tribe, 1996).

As espécies de roedores neotropicais do gênero *Rhipidomys* apresentam tamanho corpóreo médio, variando de 95 a 380 mm, e características externas e crânio-dentais diversas. O gênero apresenta coloração dorsal castanho-avermelhada, castanho-alaranjada ou castanho-acinzentada, pêlos laterais mais claros, coloração ventral branca ou branco-amarelada; cauda longa entre uma vez e uma vez e meia o tamanho do corpo, recoberta por pêlos curtos, com escamas aparentes, e geralmente com longos pêlos na extremidade; olhos grandes; orelhas com poucos pêlos; patas pequenas e muito largas, geralmente brancas, com uma mancha central mais escura, dedos proporcionalmente longos com cores

claras nas laterais e mancha dorsal mais escura sobre os metatarsos; vibrissas longas; três pares de mamas (pós-axial, abdominal e inguinal). O crânio possui um pequeno entalhe zigomático, bordas supra-orbitais quadradas ou rígidas, caixa craniana grande e oval e palato pequeno (Reis *et al.*, 2006; Tribe, 1996).

Rhipidomys é relativamente pouco estudado, principalmente devido à dificuldade de coleta em decorrência de seu hábito arborícola. Também exibe uma considerável diversidade morfológica, o que dificulta a definição de caracteres morfológicos diagnósticos para a separação de espécies, gerando confusão taxonômica. A pequena quantidade de espécimes amostrados, provenientes de apenas algumas áreas, e a escassez de caracteres com estados discretos para diferenciar as populações, fazem dos caracteres contínuos uma opção para a identificação de espécies. Caracteres como cor, forma e tamanho são geralmente utilizados para subdividir o gênero, porém a variação encontrada pode ser uma mera variação geográfica ocultada pela amostragem restrita. O registro de apenas poucas áreas de simpatria para espécies do gênero facilita a identificação taxonômica. Um esforço amostral maior, com ampliação das áreas de coleta, poderia facilitar a escolha dos caracteres diagnósticos, a caracterização individual ou populacional da variação encontrada e, ainda, auxiliar na taxonomia do gênero (Tribe, 1996).

A ausência de caracteres diagnósticos discretos espécie-específicos ocasionou uma grande variação no número de espécies atribuídas ao gênero por diferentes autores, que vão de cinco a 18 espécies (Cabrera, 1961; Honacki *et al.*, 1982; Musser e Carleton, 1993, 2005; Nowak, 1991; Reig, 1986; Tribe, 1996). Na tentativa de facilitar o estudo do gênero, Tribe (1996) propôs um agrupamento de espécies baseado em caracteres morfológicos do crânio, dentição e pele, que resultou na divisão de *Rhipidomys* em três grupos. O grupo *fulviventris* (*Rhipidomys caucensis*, *R. fulviventris*, *R. venustus* e *R. wetzeli*) é caracterizado por um padrão primitivo da circulação da carótida e é restrito às florestas das montanhas dos Andes, região costeira da Venezuela e terras altas da Guiana. O grupo *leucodactylus* (*Rhipidomys austrinus*, *R. couesi*, *R. emiliae*, *R. gardneri*, *R. latimanus*, *R. leucodactylus*, *R. macrurus*, *R. mastacalis*, *R. modicus*, *R. nitela*, *R. ochrogaster*, *R. venezuelae*, e *R. cariri* acrescido por Tribe em 2005) é o maior e mais diverso e possui um padrão derivado de circulação da carótida. Diferencia-se dos outros grupos pela coloração e textura de sua pelagem e ocorre em baixas altitudes de Trinidad e Tobago e leste do Panamá ao norte da Argentina, sudeste e centro-oeste do Brasil. Já o grupo *macconnelli* (*Rhipidomys macconnelli*) possui uma cauda bicolorida e assemelha-se a espécies de *Thomasomys*, com hábitos terrestres predominantes aos arborícolas, possuindo distribuição restrita às regiões altas do sul da Venezuela (Bolívar e Amazonas), próximas ao norte do Brasil e oeste da Guiana.

Tribe (1996) sugeriu que a utilização de conjuntos de caracteres diferentes dos morfológicos, como, por exemplo, cariótipos, alozimas e seqüências de DNA, pode fornecer maiores informações sobre o gênero e facilitar os estudos taxonômicos. O autor também enfatizou a importância das informações citogenéticas no reconhecimento de espécies aparentadas.

***Rhipidomys* no Brasil**

Rhipidomys é amplamente distribuído na América do Sul e, no Brasil, é encontrado de Roraima ao Paraná e de Pernambuco ao Acre (Bonvicino *et al.*, 2008). Das 18 espécies descritas para o gênero, oito são encontradas no Brasil (Bonvicino *et al.*, 2008; Musser e Carleton, 2005). *Rhipidomys cariri* ocorre no estado do Ceará, na região do Crato (*R. cariri cariri*) e na Serra de Baturité (*R. cariri baturiteensis*), e no estado da Bahia; *R. emiliae* foi descrito no nordeste do estado de Mato Grosso (Serra do Roncador), leste do Pará e oeste do Maranhão; *R. gardneri*, no noroeste do estado do Acre; *R. leucodactylus* foi encontrado nos estados do Acre, Amazonas, Rondônia, norte do Mato Grosso, Roraima, oeste do Pará e Amapá. *Rhipidomys macconnelli* foi coletado em altitudes superiores a 1.000 m no norte do estado do Amazonas (Serra da Neblina) e oeste de Roraima; *R. macrurus* ocorre no estado do Maranhão, oeste do Piauí, norte do Ceará, leste da Bahia, leste de Minas Gerais, Tocantins, Goiás, Distrito Federal, e sudeste do Mato Grosso (Chapada dos Guimarães); *R. mastacalis* vive na região costeira do leste do estado de Pernambuco ao norte do Paraná e no interior, no centro-leste de Minas Gerais e todo o estado de São Paulo. *Rhipidomys nitela* foi encontrado nos estados do Amapá, Roraima, Pará, nordeste do Amazonas, norte do Mato Grosso, oeste de Tocantins e extremo norte de Goiás (Figura 1).

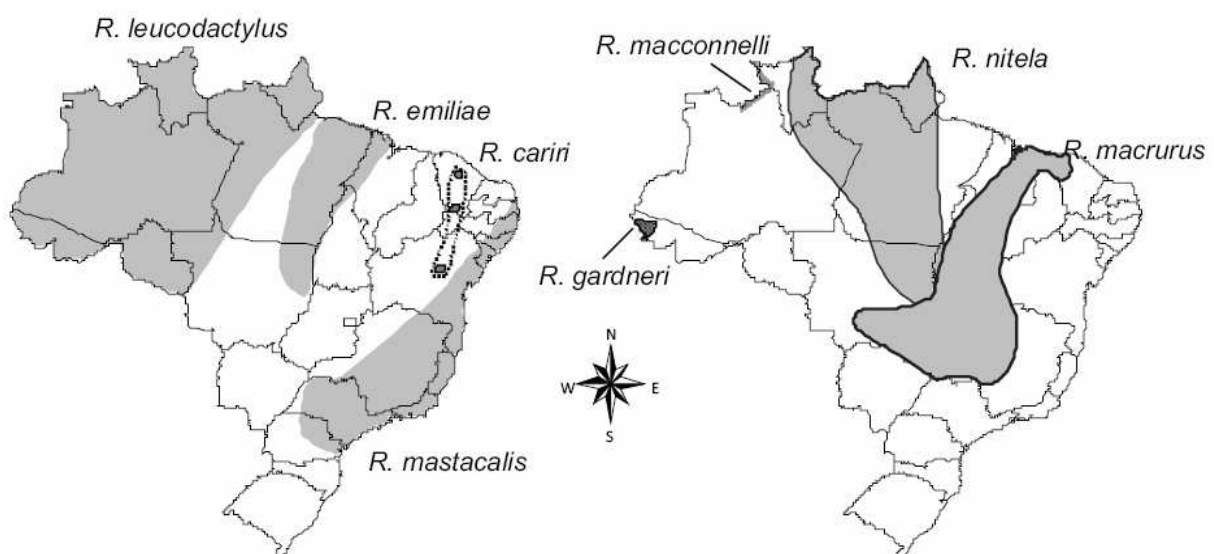


Figura 1. Ocorrência das espécies de *Rhipidomys* no Brasil (extraído de Bonvicino *et al.*, 2008).

As espécies de *Rhipidomys* com ocorrência já registrada para o estado de Minas Gerais são *R. macrurus*, que provavelmente acompanha a distribuição dos remanescentes de Cerrado no estado; *R. mastacalis*, que ocorre na Mata Atlântica presente no leste e sul do estado; e uma espécie *incertae sedis* coletada no Parque Estadual Ibitipoca no município de Lima Duarte, sul do estado (Tribe, 1996).

Citogenética de *Rhipidomys*

Nos estudos citogenéticos realizados até o momento em *Rhipidomys*, já foram descritos ou citados 29 cariótipos para o gênero. A maioria dos exemplares de *Rhipidomys* apresentou um número diplóide ($2n$) igual a 44. Duas variantes de número diplóide foram descritas: uma com $2n=48$ em *Rhipidomys nitela* da Guiana Francesa e de Roraima (Andrades-Miranda *et al.*, 2002; Tribe, 1996; Voloubouev e Catzefflis, 2000;), e outra com $2n=50$ em *Rhipidomys* cf. *nitela* de Manaus (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999). Apesar da conservação do número diplóide, foi detectada grande variação no número fundamental (NF), que oscila de 46 a 80 (Aguilera *et al.*, 1994; Andrades-Miranda *et al.*, 2002; Côrrea e Pessôa, 1996; Gardner e Patton, 1976; Geise, 1995; Patton *et al.*, 2000; Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999; Svartman e Almeida, 1993; Volobouev e Catzefflis, 2000; Zanchin *et al.*, 1992) (Tabela 1).

Andrades-Miranda *et al.* (2002) subdividiram o gênero em três grupos, com base nas variações do $2n$ e NF: grupo *Rhipidomys leucodactylus*, com $2n=44$ e NF baixo, variando de 46 a 52; e *R. mastacalis*, com $2n=44$ e NF alto, variando de 74 a 80; grupo *R. nitela*, composto por espécies com $2n=48$, NF=67/68 e $2n=50$, NF=71/72. Tribe (1996) citou a ocorrência de um cariótipo com $2n=44$ e NF=71 em *R. nitela*.

A maioria dos trabalhos de citogenética de *Rhipidomys* apresentou apenas cariótipos após coloração convencional e, em menos da metade, foram também descritos os cariótipos após a obtenção dos padrões de bandeamento G e C ou da marcação das regiões organizadoras de nucléolos (RON) pelo nitrato de prata (Ag-RON). A grande variação do número fundamental em contraste com a pouca variação no número diplóide gerou algumas hipóteses sobre a evolução cariotípica no gênero. Estudos comparativos utilizando as técnicas de bandeamento G e C e Ag-RON em *Rhipidomys* cf. *macrurus*, *R. mastacalis* e em outras espécies não identificadas de *Rhipidomys* brasileiros apontaram as inversões pericêntricas como o principal, senão o único, rearranjo cromossômico observado no gênero (Svartman e Almeida, 1993; Zanchin *et al.* 1992). Entretanto, estudos posteriores destacaram também a ocorrência de polimorfismos em regiões heterocromáticas e rearranjos robertsonianos (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999; Volobouev e Catzefflis, 2000).

Tabela 1. Cariótipos de *Rhipidomys* descritos na literatura.

Grupo	Espécie	2n/ NF	Localidade	Referência
<i>Rhipidomys leucodactylus</i>	<i>R. leucodactylus</i>	44/ 46	Rio Juruá (AM)	Patton <i>et al.</i> , 2000
		44/ 48	Rio Jamari (RO), Caldas Novas, Serra da Mesa (GO)	Andrades-Miranda <i>et al.</i> , 2002; Zanchin <i>et al.</i> , 1992
		44/ 48	Cueva del Agua (Venezuela)	Aguilera <i>et al.</i> , 1994 ¹
		44/ 52	Serra da Mesa (GO), Caxiuanã (PA)	Andrades-Miranda <i>et al.</i> , 2002
	<i>R. cariri</i>	44/ 48	Berilo (MG)	Neste trabalho
	<i>R. latimanus</i>	44/ 48	Peñas Blancas (Colômbia)	Gardner e Patton, 1976
	<i>R. macrurus</i>	44/ 48	Águas Emendadas (DF), Chapada Diamantina (BA)	Pereira e Geise, 2007; Svartman e Almeida, 1993 ²
		44/ 49	Granja do Ipê (DF), Vargem Bonita (MG)	Svartman e Almeida, 1993 ² ; Neste trabalho
		44/ 50	Santa Bárbara (MG)	Neste trabalho
	<i>R. cf. macrurus</i>	44/ 49	Casa Grande (SP)	Svartman e Almeida, 1993 ²
		44/ 50	Monte Verde (ES)	Zanchin <i>et al.</i> , 1992 ²
		44/ 50	Garrafão (RJ)	Tribe, 1996
		44/ 51	Mocambinho (MG)	Tribe, 1996
	<i>R. gardneri</i>	44/ 50	Rio Juruá (AC)	Patton <i>et al.</i> , 2000
<i>R. macconnelli</i>	44/ 50	La Escalera (Venezuela)	Aguilera <i>et al.</i> , 1994	
<i>R. cf. mastacalis</i>	44/ 52	Vila Rica (MT), Aripuanã (MT)	Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999	
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	<i>R. mastacalis</i>	44/ 74	Lagoa Santa, Rio Doce e Morro do Pilar (MG), Unacau (BA), Casimiro de Abreu (RJ), Reserva Biológica Duas Bocas (ES)	Paresque <i>et al.</i> , 1994; Tribe, 1996; Zanchin <i>et al.</i> , 1992; Neste trabalho
		44/ 76	Serra da Mesa (GO)	Andrades-Miranda <i>et al.</i> , 2002
		44/ 80	Serra da Mesa (GO)	Andrades-Miranda <i>et al.</i> , 2002
		44/ alto	Serra dos Cavalos (PE)	Zanchin <i>et al.</i> , 1992 ³
		Híbrido	<i>Rhipidomys</i> com NF alto x <i>Rhipidomys</i> NF baixo	44/ 61
<i>Rhipidomys nitela</i>	<i>R. nitela</i>	44/ 71	San Ignacio, (Venezuela)	Tribe, 1996
		48/ 67	La Trinité (Guiana Francesa)	Volobouev e Catzefflis, 2000
		48/ 68	Surumurú (RR)	Andrades-Miranda <i>et al.</i> , 2002
	<i>R. cf. nitela</i>	50/ 71,72	Manaus (AM)	Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999

¹ Classificado como *R. sclateri*, porém com a compilação de Musser & Carleton (2005) esta espécie se tornou sinônimo de *R. leucodactylus*.

² Identificado no artigo original como *Rhipidomys* sp. e posteriormente como *Rhipidomys cf. macrurus* ou *R. macrurus* (Tribe, 1996).

³ Classificado como *R. cearanus* por Zanchin *et al.* (1992), mas Musser & Carleton (2005) consideraram *R. cearanus* como sinônimo de *R. mastacalis*.

Mais recentemente, foram descritos resultados de experimentos de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de seqüências teloméricas $(T_2AG_3)_n$ em citótipos de *Rhipidomys nitela*, *R. mastacalis*, *R. leucodactylus* e *Rhipidomys cf. macrurus*. Em todos os cariótipos analisados, as sondas hibridaram apenas nas regiões teloméricas de ambos os braços de todos os cromossomos, não ocorrendo marcações intersticiais (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999; Andrades-Miranda *et al.*, 2002). Embora a presença de seqüências teloméricas intersticiais possa indicar a ocorrência de rearranjos cromossômicos, sua ausência não os descarta (Garagna *et al.*, 1995; Nanda *et al.* 1995; Silva e Yonenaga-Yassuda, 1997,1998).

Entre as espécies de *Rhipidomys* encontradas em Minas Gerais, já foram cariotipadas *Rhipidomys macrurus* e *R. mastacalis*. Exemplares de *Rhipidomys cf. macrurus* do município de Mocambinho, norte de Minas Gerais, apresentaram cariótipos com $2n=44$, $NF=51$ (Tribe, 1996). *Rhipidomys macrurus* de Brasília (Distrito Federal) e da Chapada Diamantina (Bahia) apresentaram cariótipos com $2n=44$, $NF=48$; *R. macrurus* da Reserva Biológica de Águas Emendadas (Goiás) e *R. cf. macrurus* de Casa Grande (São Paulo) possuíam cariótipos com $2n=44$ e $NF=49$; *Rhipidomys cf. macrurus* das localidades de Monte Verde (Espírito Santo) e de Garrafão (Rio de Janeiro) apresentaram $2n=44$ e $NF=50$, e exemplares das localidades de Vila Rica e Arapuanã (Mato Grosso) tinham $2n=44$ e $NF=52$ (Zanchin *et al.*, 1992; Svartman e Almeida,1993; Tribe,1996; Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999; Pereira e Geise, 2007). Um cariótipo com $2n=44$ e $NF=74$ foi descrito em *R. mastacalis* coletados no município de Lagoa Santa, centro de Minas Gerais, localidade tipo da espécie. O mesmo cariótipo foi descrito para animais provenientes da Fazenda Unacau, a oito quilômetros a sudeste de São José (Bahia), Casimiro de Abreu (Rio de Janeiro) e Reserva Biológica Duas Bocas (Espírito Santo) (Zanchin *et al.*, 1992; Tribe, 1996; Paresque *et al.*, 2004). *Rhipidomys mastacalis* com $2n=44$, $NF=76$ e $NF=80$, foram encontrados na Serra da Mesa (Goiás) (Andrades-Miranda *et al.*, 2002). Um outro cariótipo, de um indivíduo coletado na Serra dos Cavalos (Pernambuco), apresentou $2n=44$ e NF alto, e provavelmente também pertence a essa espécie (Tribe, 1996; Zanchin *et al.*, 1992).

Híbridos Interespecíficos

Tradicionalmente, a identificação de indivíduos híbridos interespecíficos é realizada através de caracteres morfológicos e geralmente se assume que o híbrido é fenotipicamente intermediário entre os indivíduos parentais (Smith, 1992), o que nem sempre é o caso, já que os híbridos podem expressar um mosaico dos fenótipos parentais (Campton, 1987). Porém, nem toda a variação morfológica tem base genética e nem toda variação inter- e intrapopulacional é conhecida (Campton, 1987). Além disso, a análise de caracteres

morfológicos não permite determinar se um indivíduo híbrido é da primeira geração (F1), resulta de um retrocruzamento, ou ainda, de gerações posteriores (Allendorf *et al.*, 2001).

Dois tipos de análises citogenéticas têm sido usadas para determinar o impacto de uma hibridação na viabilidade ou fertilidade do organismo. Uma delas é a análise da meiose nos híbridos, visando observar o comportamento cromossômico na formação dos gametas, principalmente o pareamento e o padrão de segregação. A análise de meioses pode ser usada para estimar os efeitos dos rearranjos cromossômicos na gametogênese e, conseqüentemente, na fertilidade dos híbridos. A outra maneira de estimar os efeitos da hibridação na fertilidade é analisar o número, condição e tipos da progênie híbrida produzida. Em alguns casos, a total inviabilidade dos zigotos, ou redução no tamanho da ninhada, é uma evidência direta da incidência de aneuploidias e produção de gametas desbalanceados (King, 1993).

Além das alterações na meiose, a hibridação interespecífica pode acarretar um desequilíbrio do funcionamento do genoma, fenômeno ainda pouco estudado. Em híbridos entre duas espécies de marsupiais australianos, *Macropus eugenii* e *Wallabia bicolor*, O'Neill *et al.* (1998) demonstraram a ocorrência de submetilação cromossômica associada à amplificação de elementos retrovirais capazes de gerar rearranjos cromossômicos. A análise de híbridos entre *Equus caballus* e *E. asinus*, *Lama glama* e *Camelus dromedarius* e entre três espécies de roedores (*Mus musculus*, *M. spretus* e *M. macedonicus*), no entanto, não revelou nenhuma alteração no padrão de metilação nos híbridos de primeira geração (Roemer *et al.*, 1999).

Casos de híbridos entre indivíduos com cariótipos distintos já foram relatados em alguns roedores. Hibridações entre diferentes citótipos de roedores do gênero *Ctenomys* são um exemplo em que hibridações ocorrem na natureza com considerável freqüência. Zonas de hibridação foram hipotetizadas para *C. lami* entre citótipos com $2n=54, 55, 56$ e 58 e registradas entre citótipos de *C. minutus* com $2n=42, 46, 48$ e 50 . Uma zona de hibridação interespecífica resultante do cruzamento entre indivíduos de *C. lami* com $2n=56$ e de *C. minutus* com $2n=48$ também foi encontrada (Fernandes *et al.*, 2007; Freitas, 2006). Um provável híbrido interespecífico já foi registrado para o gênero *Rhipidomys*. Uma fêmea coletada na Bahia apresentou um cariótipo com $2n=44$ e $NF=61$, com nove pares de autossomos e cromossomos X heteromórficos (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999). As autoras sugeriram duas hipóteses para explicar esse cariótipo: os heteromorfismos encontrados estariam fixados na população ou, alternativamente, a fêmea estudada seria resultante do cruzamento entre uma espécie em que a maioria dos autossomos apresentava dois braços (por exemplo, *R. mastacalis*) e uma espécie com cromossomos predominantemente acrocêntricos (por exemplo, *R. macrurus*).

Apesar de sua ampla distribuição geográfica na América Central e do Sul, o gênero *Rhipidomys* ainda é pouco amostrado, em parte devido à dificuldade de coleta destes animais arborícolas. A taxonomia do gênero ainda é bastante confusa e, apesar da pequena amostra, já foram registrados 29 citótipos. As dificuldades taxonômicas, aliadas à ausência de maiores informações sobre a distribuição geográfica das espécies, fazem com que o gênero seja geralmente subdividido com base em caracteres morfológicos contínuos. A utilização desses caracteres não é aconselhável, já que podem decorrer apenas de uma variação geográfica gradual. A possível ocorrência de híbridos interespecíficos na natureza, já aventada para *Rhipidomys* da Bahia, pode significar que ocorrem áreas de simpatria ainda não identificadas, com importantes conseqüências exemplos para as espécies envolvidas.

A citogenética é uma ferramenta capaz de fornecer subsídios para os estudos taxonômicos de *Rhipidomys*. Neste trabalho buscamos identificar as variações cariotípicas nas espécies do gênero coletadas em Minas Gerais. Para identificar os mecanismos envolvidos na origem das variações, utilizamos técnicas de citogenética clássica (padrões de bandeamento G- e C- e marcação das regiões organizadoras de nucléolos) e molecular (hibridação *in situ* fluorescente com sondas de seqüências teloméricas e de DNA genômico total).

II. Objetivos

Esse trabalho foi realizado com o objetivo geral de caracterizar e comparar os cariótipos das espécies do gênero *Rhipidomys* (Cricetidae, Rodentia) que ocorrem no estado de Minas Gerais, procurando estabelecer as relações evolutivas entre os cariótipos das espécies estudadas. Para isso estabelecemos como objetivos específicos:

- Estudar cariotipicamente exemplares do gênero *Rhipidomys* capturados em Minas Gerais;
- Comparar os cariótipos das espécies de *Rhipidomys* após a aplicação das técnicas de bandeamento G e C;
- Verificar a atividade das regiões organizadoras de nucléolos (RON) através da marcação pelo nitrato de prata (Ag-RON);
- Utilizar a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para comparar cariótipos de diferentes espécies de *Rhipidomys*, bem como de híbridos interespecíficos;
- Comparar os resultados obtidos com dados na literatura para o gênero *Rhipidomys* e gêneros relacionados;
- Inferir os mecanismos de evolução cariotípica no gênero.

III. Material e Métodos

Amostra

Nossa amostra consistiu de 15 exemplares de *Rhipidomys* coletados em áreas de Minas Gerais pela pesquisadora Maria Olímpia Garcia Lopes durante o período de janeiro a dezembro de 2004 (licença do IBAMA 129/04-NUFAS/MG). Dispusemos de um espécime de *Rhipidomys macrurus* coletado em Santa Bárbara e com outro de Vargem Bonita, espécimes de *Rhipidomys mastacalis* provenientes de Rio Doce e do Morro do Pilar. Contamos ainda de exemplares de *Rhipidomys cariri* provenientes de Berilo (Tabela 2, Figura 2). Também foram analisados três indivíduos híbridos interespecíficos nascidos em cativeiro e resultantes do cruzamento entre *Rhipidomys mastacalis* fêmea com *R. cariri* macho.

Tabela 2. Exemplares de *Rhipidomys* analisados.

Espécie	Número de exemplares		Procedência (Coordenadas)
	Macho	Fêmea	
<i>Rhipidomys macrurus</i>	-	1 (MOL 252)	Santa Bárbara (19°57'34"S, 43°24'55"W)
	1 (MO 62)	-	Vargem Bonita (20°19'36"S, 46°21'58"W)
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	1 (MOL 268)	3 (MOL 258, 437, 438)	Rio Doce (20°14'41"S, 42°53'45"W)
	-	1 (Nº 212)	Morro do Pilar (19°13'S, 43°22'W)
<i>Rhipidomys cariri</i>	2 (MOL218, 272)	3 (MOL 271, 273, 304)	Berilo (16°57'06"S, 42°27'56"W)
<i>Rhipidomys</i> híbrido (<i>R. mastacalis</i> x <i>R. cariri</i>)	1 (MOL435)	2 (MOL 259, 436)	cativeiro



Figura 2. Localidades de coleta de *Rhipidomys* em Minas Gerais.

Métodos

As preparações cromossômicas foram obtidas em campo pela pesquisadora Maria Olímpia Garcia Lopes através da preparação direta de células de medula óssea de acordo com a técnica de Ford e Hamerton (1956), com modificações:

1. Injetar uma solução de colchicina a 0,1% na razão de 1ml/100g de peso (não injetar mais que 3ml);
2. Sacrificar o animal decorridos 30 a 60 minutos da injeção;
3. Isolar os fêmures e, eventualmente, também as tíbias, limpá-los e retirar as epífises;
4. Lavar o canal ósseo repetidas vezes com uma seringa contendo 5ml de solução hipotônica (KCl 0,075M);
5. Deixar a suspensão por 15 a 40 minutos a 37°C;
6. Centrifugar a 1000-1200 rpm durante 7 minutos, desprezar o sobrenadante;
7. Ressuspender o sedimento em 5ml de fixador metanol-ácido acético (3:1) fresco, pipetar várias vezes;
8. Após, no mínimo 15 minutos, centrifugar a suspensão a 1000 a 1200 rpm durante 7 minutos e desprezar o sobrenadante;
9. Ressuspender o material em fixador, centrifugar e desprezar o sobrenadante pelo menos mais duas vezes;
10. Após a última centrifugação, adicionar fixador na proporção 2:1 em relação à quantidade de sedimento e homogeneizar bem a suspensão;
11. Gotejar a suspensão em lâminas previamente lavadas com detergente, mantidas em álcool e secas, num suporte dentro de um banho-maria a 60°C.

As preparações cromossômicas foram estocadas a -20°C para uso posterior, quando, então, eram pingadas em lâminas limpas e submetidas à temperatura ambiente durante uma semana antes de serem coradas e analisadas por nós.

Coloração e Bandeamento Cromossômico

Coloração Convencional

1. Hidrolisar as lâminas em HCl 1N em banho-maria a 60°C por 7 minutos. Lavar com água destilada;
2. Corar as lâminas com uma solução de corante Giemsa diluído a 2% em tampão fosfato pH 6,8 à temperatura ambiente por 5 a 10 minutos;
3. Lavar bem as lâminas com água destilada e deixar secar.

Bandeamento G

Técnica de Seabright (1971), com modificações:

1. Incubar as lâminas em uma solução de 2xSSC pH 7,0 em banho-maria a 60°C por 15 minutos. Lavar com água destilada;
2. Mergulhar as lâminas em solução de tripsina (2,5g de tripsina, 3g de Na₂HPO₄, 0,2g de KH₂PO₄ /1l de H₂O) diluída a 20% em tampão fosfato à temperatura ambiente por 30 segundos a 2 minutos. Lavar com água destilada;
3. Corar as lâminas com uma solução de Giemsa a 2% por 20 minutos;
4. Lavar bem as lâminas com água destilada e deixar secar;
5. Ajustar o tempo de imersão da lâmina na tripsina em função da qualidade do bandeamento obtido.

Bandeamento C

Técnica de Sumner (1972), com modificações:

1. Hidrolisar as preparações cromossômicas em uma solução de HCl 0,2N à temperatura ambiente por 30 minutos. Lavar com água destilada;
2. Mergulhar as lâminas em uma solução de hidróxido de bário [Ba(OH)₂] octahidratado a 5% em banho-maria a 60°C por 2 a 6 minutos. Lavar com água destilada;
3. Passar as lâminas em uma solução de HCl 1N em banho-maria a 60°C. Lavar com água destilada;
4. Incubar as lâminas em uma solução de 2xSSC pH 7,0 em banho-maria a 60°C de 15 a 60 minutos. Lavar com água destilada;
5. Corar as lâminas com Giemsa diluído a 5% em tampão fosfato pH 6,8 à temperatura ambiente por 30 a 60 minutos;
6. Lavar bem as lâminas com água destilada e deixar secar;
7. Ajustar o tempo de imersão das preparações na solução de bário conforme os resultados obtidos.

Coloração das Regiões Organizadoras de Nucléolos pelo Nitrato Prata

Técnica de Howell e Black (1980), com modificações:

1. Hidrolisar as preparações cromossômicas em HCl 1N em banho-maria a 60°C por 3 a 7 minutos. Lavar com água destilada;
2. Pingar uma gota de solução de gelatina e duas gotas de solução de nitrato de prata a 50% sobre o material;
3. Cobrir o material com lamínula e deixar em câmara úmida no banho-maria a 60°C por cerca de 4 minutos ou até que apresente cor marrom-dourada. Lavar com água destilada, retirando a lamínula;

4. Corar as lâminas com Giemsa a 2% diluído em tampão fosfato pH 6,8 por cerca de 30 segundos;

5. Lavar bem as lâminas com água destilada e deixar secar;

Analisar no mínimo 30 metáfases completas e com pelo menos um cromossomo marcado. Verificar o número de cromossomos marcados, a localização da marcação e a presença ou não de associações.

As preparações cromossômicas foram analisadas inicialmente nos microscópios Olympus BX41 do Departamento de Biologia Geral - ICB/UFMG. As imagens das melhores metáfases foram capturadas utilizando um microscópio Nikon Eclipse E-400 equipado com uma câmera de CCD (Applied Imaging modelo ER-3339) e com o programa de análise CytoVision (Applied Imaging) do Laboratório de Citogenética do Hospital das Clínicas da UFMG. As imagens obtidas foram processadas com o programa Photoshop 7.0.

Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

Para os experimentos de FISH foram utilizadas como sondas seqüências teloméricas e DNA genômico total.

Os experimentos com seqüências teloméricas foram realizados com o Telomere PNA Kit/FITC (código K5325, Dako Cytomation), de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações:

1. Desidratar as preparações cromossômicas passando-as por três banhos a -20°C de 2 minutos cada (50% etanol, 75% etanol e 100% etanol), secar ao ar;
2. Colocar 10µl da sonda na área a ser hibridada e cobrir com lamínula plástica;
3. Incubar a preparação com a sonda por 5 minutos numa câmara úmida pré-aquecida a 80°C;
4. Manter a lâmina em câmara escura à temperatura ambiente por 4 horas e meia;
5. Imergir a lâmina em solução de 2xSSC à temperatura ambiente até a remoção da lamínula;
6. Colocar a lâmina por 5 minutos numa solução de 1xSSC pré-aquecida a 60°C;
7. Imergir brevemente numa solução de PBS gelado;
8. Colocar 50µl de uma solução de iodeto de propídeo (PI) (6µl de PI 0,1 mg/ml em 900µl de PBS) sobre a área a ser hibridada e, após 30 segundos, lavar em PBS;
9. Aplicar 10µl da solução de montagem (Vectashield, Vector) com 0,1 µg/ml 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) sobre a área de hibridação e recobrir com uma lamínula;
10. Manter as lâminas por 15 minutos em câmara escura antes de observá-las ao microscópio de fluorescência.

Com a finalidade de comparar os genomas de espécies de *Rhipidomys*, foram utilizados como sondas os DNAs genômicos totais de *Rhipidomys mastacalis* e de um dos indivíduos híbridos resultante do cruzamento de *R. mastacalis* com *R. cariri*. O DNA foi extraído a partir de tecidos de coração e rins (Sambrook e Russell, 2001) e marcado com biotina ou digoxigenina utilizando os kits Biotin-Nick e Dig-Nick (ambos da Roche), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. Para os experimentos de hibridação *in situ* foi utilizado como base o protocolo descrito em Svartman e Vianna-Morgante (1999).

Em cada experimento, foram utilizados 300ng (6µl) de DNA genômico marcado e ressuspendido em meio de hibridação (50% de formamida deionizada/2xSSC) num volume final de 13 µl. As preparações foram tratadas com pepsina antes da hibridação.

1. Tratamento com pepsina:
 - a. Colocar a lâmina em um banho de pepsina por 10 minutos (1ml de pepsina 5mg/ml em 50 ml de HCl 0,01N a 37°C);
 - b. Imergir a lâmina em três banhos de H₂O milli-Q por 3 minutos cada;
 - c. Incubar a lâmina em um banho de 2xSSC a 60°C por 10 minutos;
 - d. Colocar a lâmina em três banhos de H₂O milli-Q por 3 minutos cada;
2. Desidratar a lâmina à temperatura ambiente em três banhos sucessivos de 3 minutos cada (50% etanol, 75% etanol e 100% etanol), secar ao ar;
3. Desnaturar os cromossomos mergulhando a lâmina em solução de desnaturação (70% formamida deionizada/2xSSC) a 75°C;
4. Mergulhar a lâmina em 2xSSC gelado;
5. Imergir a lâmina em banhos gelados de álcool 50%, 70% e 100% por 3 minutos cada, secar ao ar;
6. Desnaturar a sonda por 10 minutos a 90°C e manter em gelo até a hora de usá-la;
7. Aplicar a sonda sobre a área de hibridação e cobrir com uma lamínula plástica;
8. Incubar a lâmina com a sonda numa câmara úmida a 37°C por 96 horas;
9. Imergir a lâmina em dois banhos de formamida deionizada 50%/2xSSC e dois banhos de 2xSSC a 37°C por 2 minutos cada;
10. Deixar em um banho de PBT à temperatura ambiente por 10 minutos;
11. Incubar a área de hibridação com 50µl do anticorpo (antidigoxigenina+rodamina e/ou avidina+FITC, diluídos 1:100 em PBT) e cobrir com uma lamínula de vidro;
12. Incubar em câmara úmida a 37°C por 45 minutos evitando exposição à luz;
13. Passar por três banhos de PBT à temperatura ambiente por 5 minutos cada um;
14. Lavar com PBS e montar com 15µl de solução de montagem (Vectashield, Vector) com 0,1 µg/ml de DAPI.

No caso de experimentos de hibridação com duas sondas, uma era marcada com biotina e a outra com digoxigenina. As duas eram colocadas juntas (3 µl de cada sonda equivalente a aproximadamente 150 ng de DNA) em meio de hibridação e prosseguia-se à hibridação como descrito acima. A imunofluorescência era realizada como descrito acima, mas com os anticorpos avidina+FITC e anti-digoxigenina+rodamina ressuspendidos juntos em PBT.

Os experimentos de hibridação *in situ* fluorescente foram realizados no Laboratório de Genética Humana do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), coordenado pela Dra. Ângela Maria Vianna Morgante. Para a análise e captura das imagens, foi utilizado um microscópio epifluorescente Carl Zeiss Axiophot equipado com uma câmera de CCD e programa de captura ISIS (Metasystems).

IV. Resultados e Discussão

Rhipidomys macrurus

Foram estudados uma fêmea de *Rhipidomys macrurus* proveniente de Santa Bárbara (Minas Gerais) e um macho proveniente do município de Vargem Bonita, localizado na Serra da Canastra (Minas Gerais). Os indivíduos apresentaram um cariótipo com número diplóide de 44 cromossomos e número fundamental igual a 50, na fêmea, e igual a 49, no macho. Os cariótipos foram montados de acordo com os apresentados em Svartman e Almeida (1993) para *Rhipidomys* sp. que, posteriormente, foram considerados por Tribe (1996) como *Rhipidomys macrurus* e *Rhipidomys* cf. *macrurus*, dependendo do local de coleta.

Descrição do Cariótipo

- 17 pares de autossomos acrocêntricos de grandes a pequenos (pares 1 ao 9 e 11 ao 18);
- 1 par de autossomos médios subtelocêntricos, na fêmea, ou heteromórfico acrocêntrico/subtelocêntrico, no macho (par 10);
- 1 par de autossomos submetacêntricos pequenos (19);
- 2 pares de autossomos metacêntricos pequenos (pares 20 e 21);
- X- acrocêntrico médio;
- Y- acrocêntrico pequeno, o menor cromossomo do complemento.

Por coloração convencional foi possível a identificação dos pares 1, 19, 20, 21, do cromossomo 10 submetacêntrico e do cromossomo Y (Figuras 3 e 4).

Padrões de Bandeamento

O padrão de bandas G permitiu a identificação de todos os pares do complemento. O braço longo do cromossomo X apresentava duas bandas mais evidentes na região central (Figura 5). O padrão de bandas C em metáfases da fêmea revelou a presença de heterocromatina constitutiva apenas na região pericentromérica de um par acrocêntrico médio (Figura 6). Um padrão de marcação semelhante foi descrito para *Rhipidomys* cf. *macrurus* e *R. macrurus* por Svartman e Almeida (1993), que identificaram o par marcado como o cromossomo X. No macho, no entanto, o bandeamento C revelou a presença de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de cerca de metade dos cromossomos e o cromossomo Y era inteiramente heterocromático (Figura 7).

A coloração das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata (Ag-RON) na fêmea revelou marcação de um a seis cromossomos por metáfase. Das 30 metáfases

analisadas, 13 possuíam cinco marcações (Tabela 3). Os cinco pares de cromossomos que apresentaram essas marcações foram: um par acrocêntrico de tamanho aproximado aos pares 5-9, com marcação no braço curto; o par 10, com marcação na parte terminal do braço curto; um par acrocêntrico pequeno, provavelmente o par 18, com marcação na região terminal do braço longo; o par 19, com marcação também na região terminal do braço longo; e o par 21, o menor cromossomo metacêntrico, que apresentou marcações nas extremidades de ambos os braços (Figura 8).

No macho, a coloração das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata revelou de um a cinco cromossomos marcados por metáfase, todos acrocêntricos médios. Os cromossomos portadores de RON não pareciam ser os mesmos marcados na fêmea. Os números mais freqüentes de marcações por célula foram 3 e 4, observados dez vezes cada um (Tabela 4). Algumas associações entre as RON de dois cromossomos foram observadas.

O experimento com a sonda telomérica revelou marcações apenas nas regiões terminais de todos os braços cromossômicos (Figura 9).

Os cariótipos dos exemplares que analisamos se assemelham aos descritos por Svartman e Almeida (1993) para *Rhipidomys macrurus* do Distrito Federal. Entretanto, enquanto os exemplares do Distrito Federal apresentaram o par 10 heteromórfico (acrocêntrico/subtelocêntrico) ou ambos os homólogos acrocêntricos, em nossa amostra o mesmo par era heteromórfico no macho e homomórfico subtelocêntrico na fêmea, idêntico ao de *Rhipidomys* sp. descrito por Zanchin *et al.* (1992) para um indivíduo proveniente do município de Venda Nova (Espírito Santo), que posteriormente foi identificado como *Rhipidomys cf. macrurus* (Tribe, 1996). O heteromorfismo do par 10 foi atribuído à inversão pericêntrica após bandeamentos G e R em *Rhipidomys cf. macrurus* e *R. macrurus* do Distrito Federal e de São Paulo (Svartman e Almeida, 1993). O mesmo tipo de rearranjo pode explicar o heteromorfismo em nosso exemplar macho. Entretanto, o padrão de bandeamento G, que poderia auxiliar no esclarecimento dessa questão, não produziu bons resultados no material do macho.

As diferenças entre os padrões de bandeamento C encontrados entre a fêmea ($2n=44$, $NF=50$) e o macho ($2n=44$, $NF=49$) podem ser decorrentes de variações no conteúdo de heterocromatina constitutiva ou de artefatos da técnica. No entanto, marcações apenas no par sexual, semelhante à encontrada em *R. macrurus* fêmea, já foram registradas em *Rhipidomys cf. macrurus* de Monte Verde (Espírito Santo) por Zanchin *et al.* (1992) e marcações na região pericentromérica de vários pares, como ocorreu no macho, já foram descritas em *Rhipidomys leucodactylus* citótipo 1 da Serra da Mesa (Goiás) e de Caxiuanã (Pará) e *R. nitela* de Surumurú (Roraima) (Andrades-Miranda *et al.*, 2002). Não foi

observada heterocromatina constitutiva intersticial no maior par acrocêntrico, como registrado previamente em *R. macrurus* (Svartman e Almeida, 1993).

Os cromossomos marcados pelo nitrato de prata no macho analisado por nós se assemelhavam aos três pares de cromossomos acrocêntricos com braço curto marcado descritos por Svartman e Almeida (1993). Na fêmea, porém, nenhum cromossomo acrocêntrico de morfologia semelhante a esses pares foi encontrado entre os cromossomos marcados. Como as RON são muito variáveis, podemos supor que houve reorganização dos genes ribossômicos no genoma ou uma diferença na atividade desses genes, já que o nitrato de prata tem afinidade pelas proteínas envolvidas na transcrição de RNA ribossômico. A hibridação *in situ* fluorescente com sondas ribossômicas poderia ajudar a esclarecer quais são os pares portadores de rDNA em nossos exemplares.

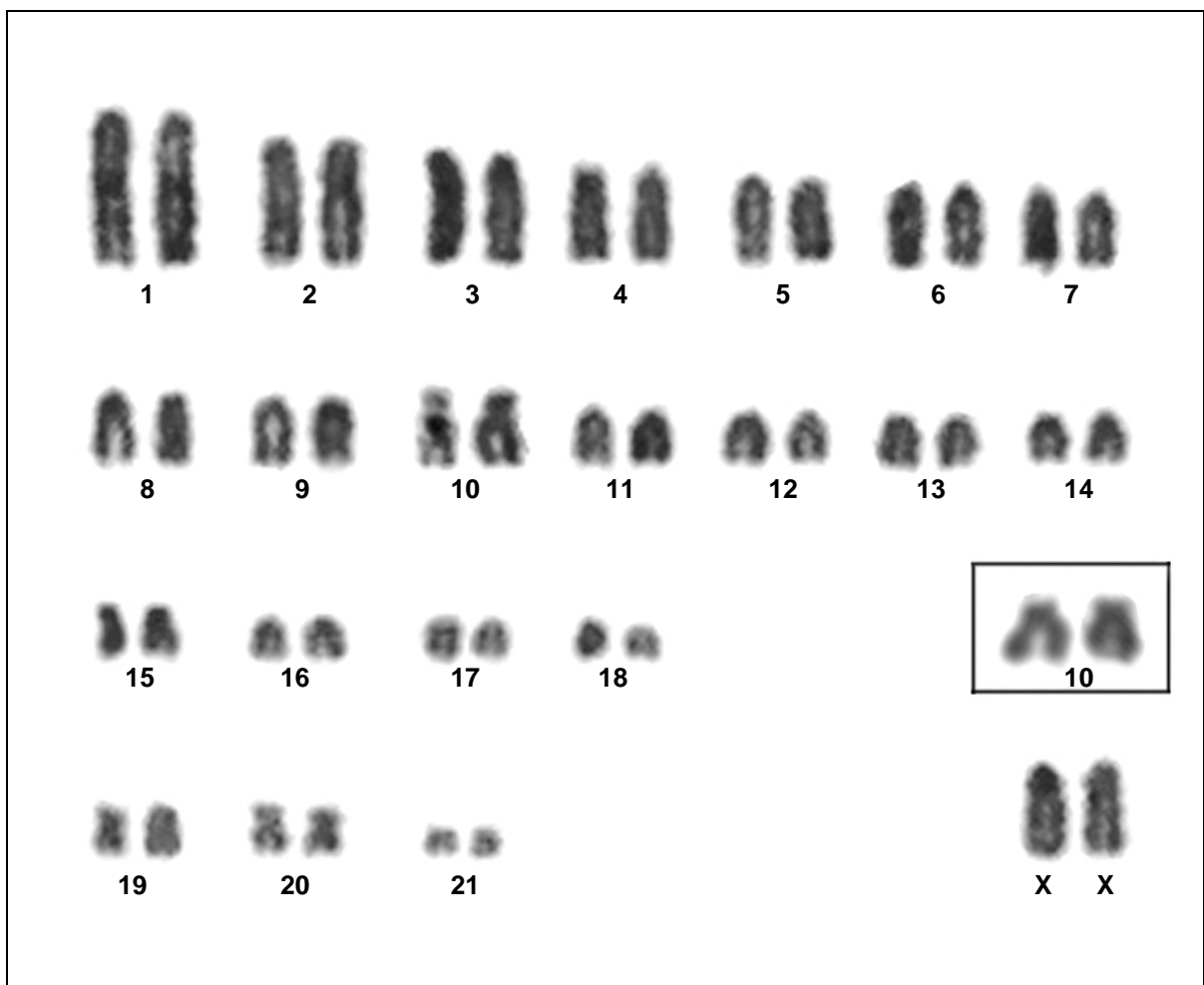


Figura 3. Cariótipo de *Rhipidomys macrurus* fêmea ($2n=44$, $NF=50$). No destaque, o par 10 de outra célula.

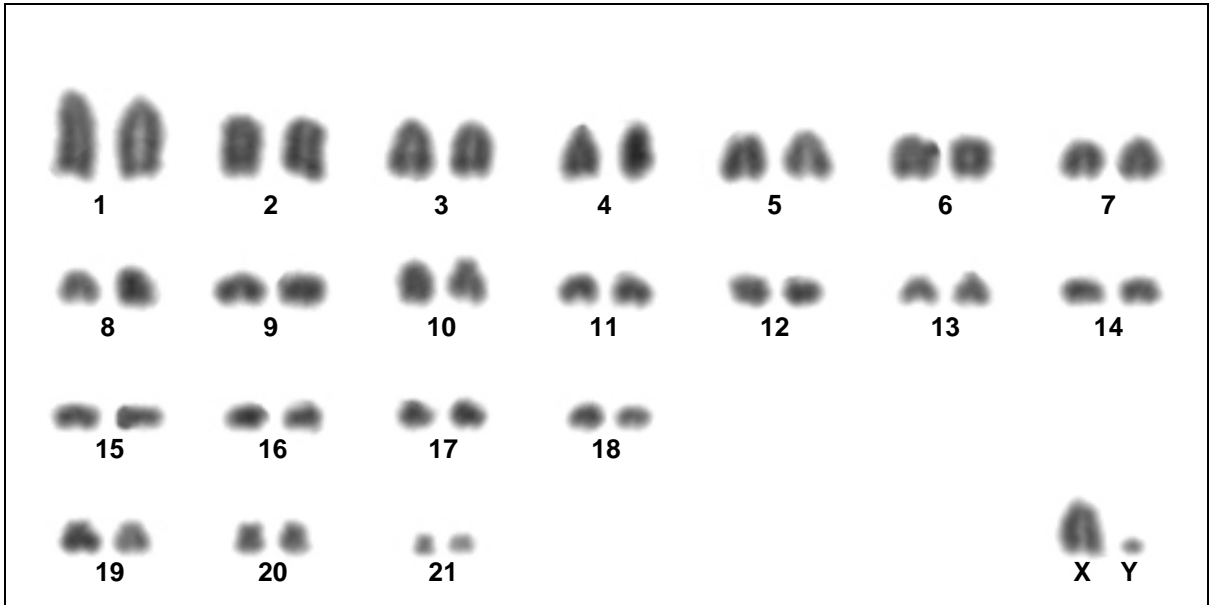


Figura 4. Cariótipo de *Rhipidomys macrurus* macho ($2n=44$, $NF=49$). Observe o par 10 heteromórfico.

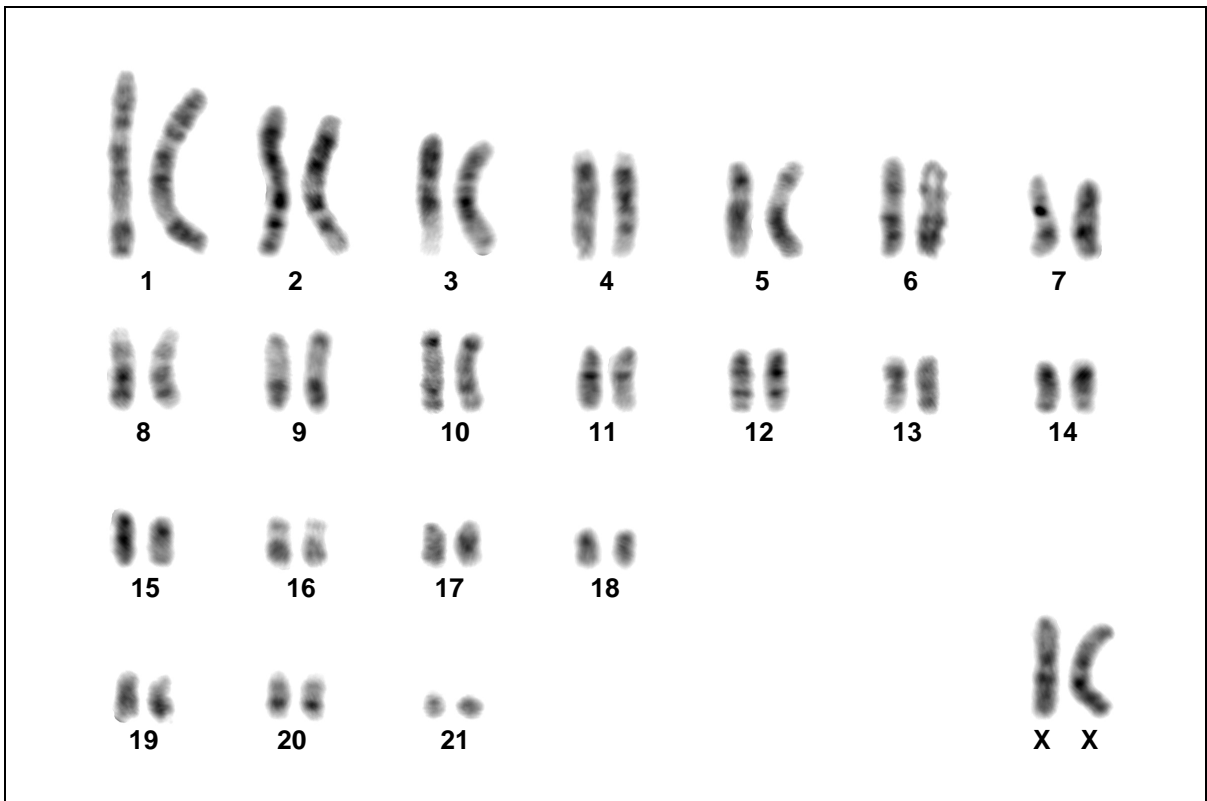


Figura 5. Padrão de bandas G no cariótipo de *Rhipidomys macrurus* fêmea ($2n=44$, $NF=50$).

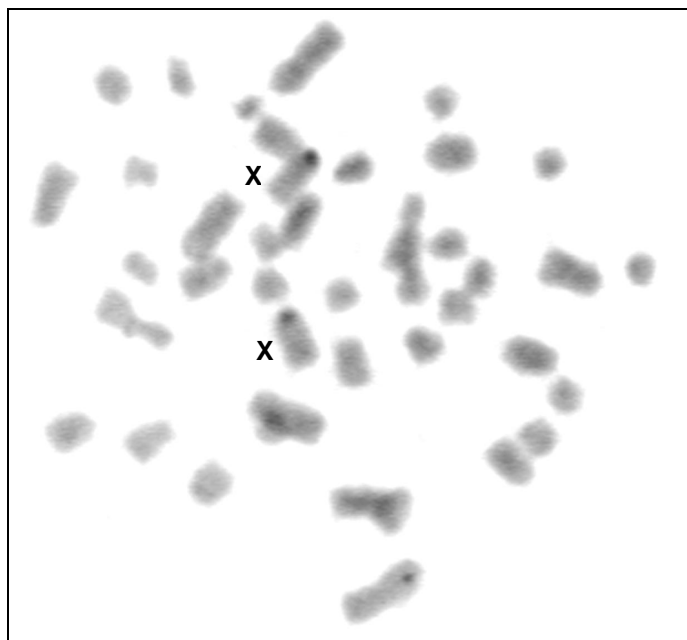


Figura 6. Padrão de bandas C numa metáfase de *Rhipidomys macrurus* fêmea (2n=44, NF=50).

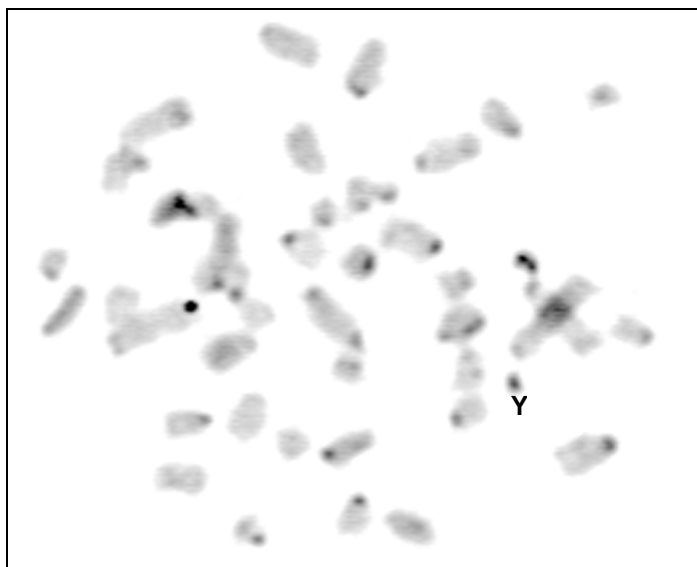


Figura 7. Padrão de bandas C numa metáfase de *Rhipidomys macrurus* macho (2n=44, NF=49).

Tabela 3. Número de RON por célula em *Rhipidomys macrurus* fêmea (2n=44, NF=50) e macho (2n=44, NF=49).

Número de Células		Número de Cromossomos Marcados						
		1	2	3	4	5	6	Total
Número de Células	MOL 252 ♀	1	0	4	9	13	3	30
	MO 62 ♂	1	5	10	10	4	0	30
	Total	2	5	14	19	17	3	60

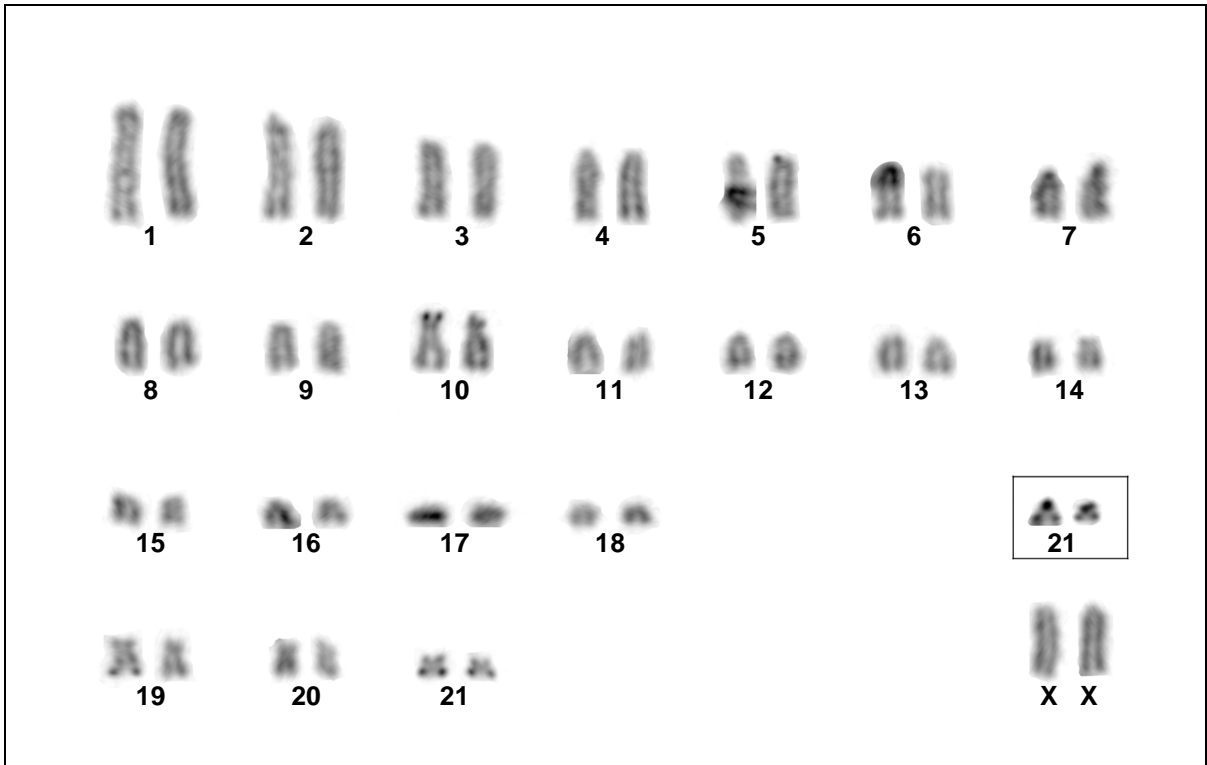


Figura 8. Cariótipo de *Rhipidomys macrurus* fêmea após Ag-RON. Observe as marcações nos cromossomos dos pares 7, 10, 19 e 21. No destaque, o par 21 com marcações terminais em ambos os braços.

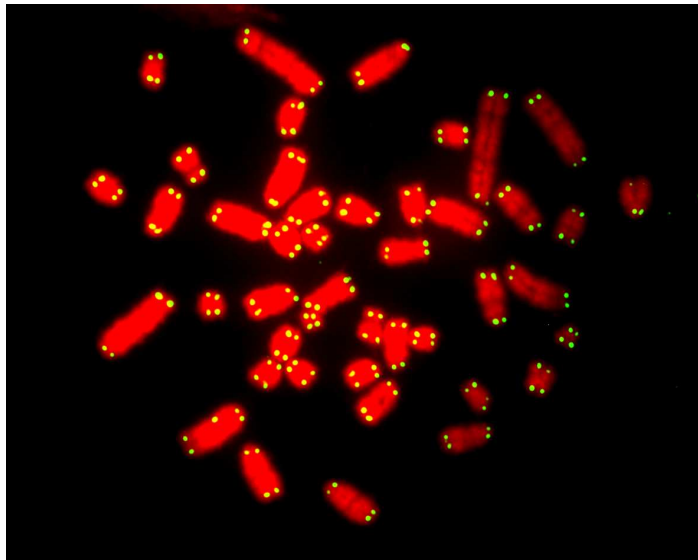


Figura 9. Metáfase de *Rhipidomys macrurus* fêmea ($2n=44$, $NF=50$) após hibridação *in situ* com a sonda telomérica.

Rhipidomys mastacalis

Foram analisados cinco espécimes de *Rhipidomys mastacalis*, três fêmeas e um macho provenientes do município de Rio Doce (Minas Gerais) e uma fêmea do Morro do Pilar (Minas Gerais). Os animais apresentaram cariótipos com número diplóide igual a 44, número fundamental igual a 74 e um cariótipo semelhante ao descrito por Zanchin (1992) para *R. mastacalis* de São José (Bahia), de acordo com o qual foram montados.

Descrição do Cariótipo

- 9 pares de autossomos submetacêntricos com variação gradual de tamanho de grandes a médios (pares 1 ao 9);
- 7 pares de autossomos metacêntricos com variação gradual de tamanho de médios a pequenos (pares 10 ao 16);
- 5 pares de autossomos acrocêntricos, incluindo o maior par do complemento cariotípico (par 17) e quatro pares relativamente pequenos (pares 18 ao 21);
- X- acrocêntrico grande com braço curto um pouco evidente;
- Y- acrocêntrico pequeno com tamanho intermediário aos dos pares 15 e 16.

Por coloração convencional foi possível distinguir os pares de autossomos 1, 16, 17 e os cromossomos sexuais X e Y (Figura 10).

Padrões de Bandeamento

A aplicação do bandeamento G permitiu a identificação de todos os pares do cariótipo. O cromossomo X apresentou duas bandas próximas entre si localizadas aproximadamente na metade do braço longo e o Y não apresentava um padrão distinto de bandeamento (Figura 11).

As bandas C revelaram a presença de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de aproximadamente metade dos cromossomos, inclusive no maior par acrocêntrico. O braço curto do cromossomo X e o cromossomo Y inteiro, mais intensamente na região pericentromérica, se apresentaram heterocromáticos (Figura 12).

A coloração com o nitrato de prata revelou marcação de um a dez cromossomos por metáfase. A maioria das 151 células analisadas dos nossos exemplares apresentou três cromossomos marcados (Tabela 5). No total, pelo menos seis pares autossômicos devem ser portadores de RON: um dos maiores pares submetacêntricos (provavelmente o par 3), com marcação terminal no braço curto; outro par submetacêntrico um pouco menor que o primeiro (provavelmente o par 7), com marcação terminal no braço longo; um par submetacêntrico médio (par 9), com marcação terminal no braço curto; um par metacêntrico médio (par 10), com marcação terminal em um dos braços; o menor par do complemento

(par 16), que apresentou marcação na região terminal de um dos braços; e o segundo maior par acrocêntrico (par 18), com marcação no braço curto (Figura 13).

Após a hibridação *in situ* com a sonda telomérica em *R. mastacalis* verificamos que todos os cromossomos foram marcados na região terminal de ambos os braços (Figura 14).

O cariótipo descrito aqui para *Rhipidomys mastacalis* do Rio Doce e do Morro do Pilar (Minas Gerais) é idêntico ao descrito por Zanchin *et al.* (1992) para *Rhipidomys mastacalis* de São José (Bahia), porém o padrão de bandas C difere entre as amostras dos dois estados. Zanchin *et al.* (1992) observaram a presença de heterocromatina constitutiva apenas na região pericentromérica de todos os autossomos do complemento (pares 17 ao 21) e do cromossomo X, enquanto os nossos exemplares de Minas Gerais apresentaram heterocromatina pericentromérica em alguns cromossomos com dois braços. As regiões de heterocromatina constitutiva pericentromérica nos indivíduos de Minas Gerais e da Bahia eram sempre pequenas, assim como na maioria das espécies de *Rhipidomys* em que as bandas C foram descritas.

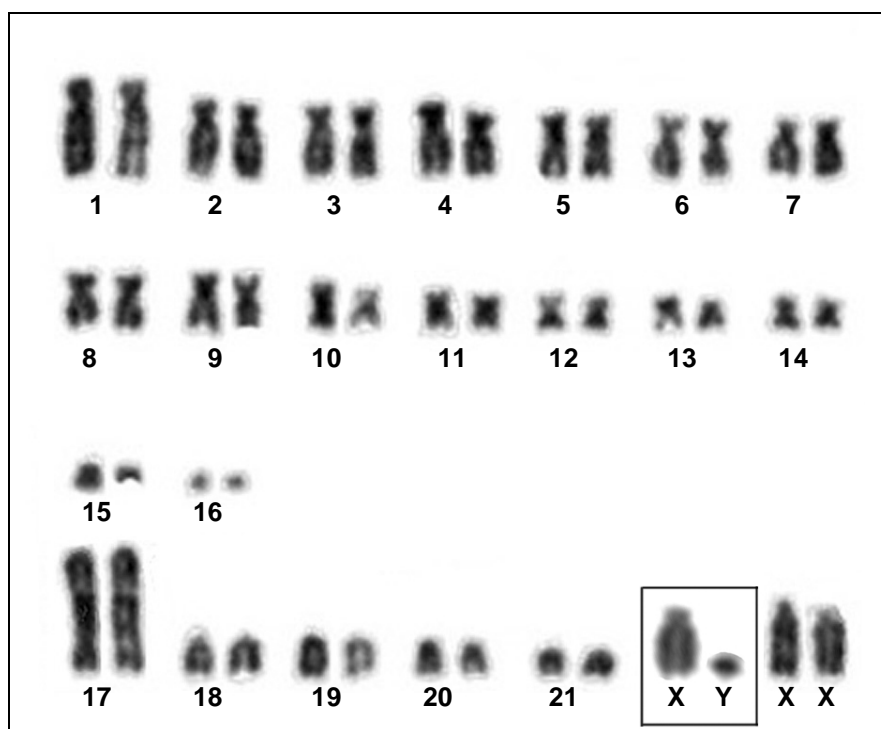


Figura 10. Cariótipo de *Rhipidomys mastacalis* fêmea ($2n=44$, $NF=74$). No destaque, o par sexual de um macho.

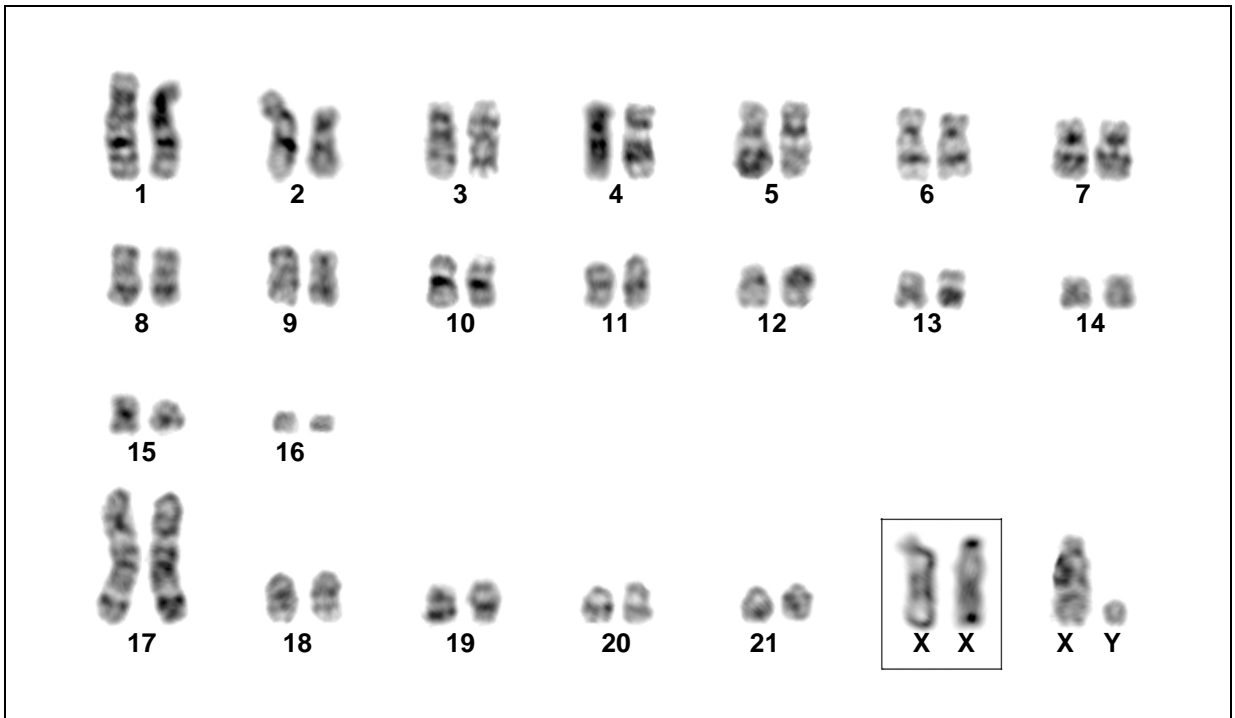


Figura 11. Padrão de bandas G no cariótipo de *Rhipidomys mastacalis* macho ($2n=44$, $NF=74$). No destaque, o par sexual de uma fêmea.

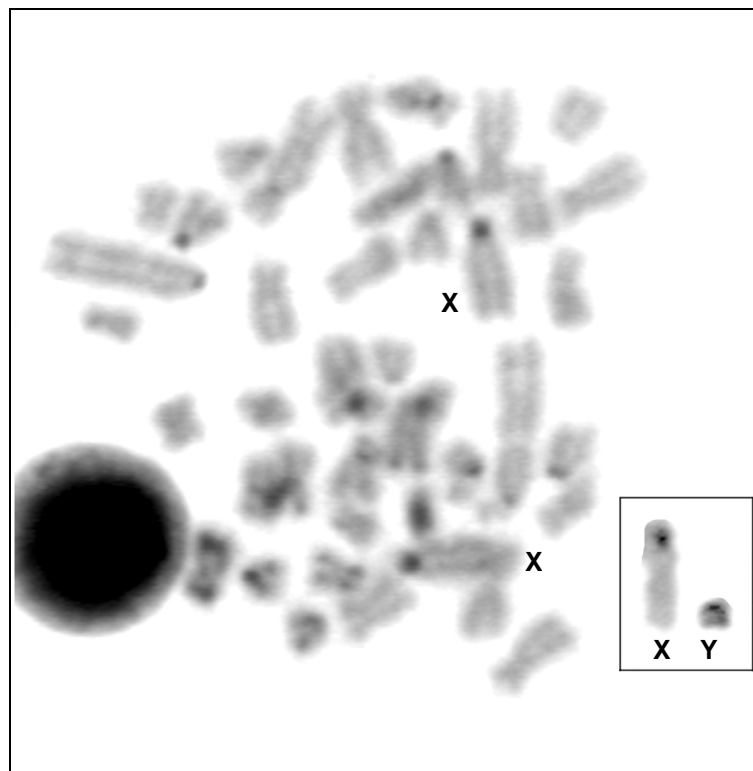


Figura 12. Padrão de bandas C numa metáfase de *Rhipidomys mastacalis* fêmea ($2n=44$, $NF=74$). No destaque, o par sexual de um macho.

Tabela 4. Número de RON por célula em *Rhipidomys mastacalis* (2n=44, NF=74).

Número de Cromossomos Marcados		1	2	3	4	5	6	8	10	Total
Número de Células	Nº 212 ♀	3	3	7	8	8	1	1	0	31
	MOL 258 ♀	3	6	14	5	2	0	0	0	30
	MOL 268 ♂	2	2	10	10	3	3	0	0	30
	MOL 437 ♀	5	7	9	5	3	1	0	0	30
	MOL 438 ♀	4	5	11	8	1	0	0	1	30
	Total	17	23	51	36	17	5	1	1	151

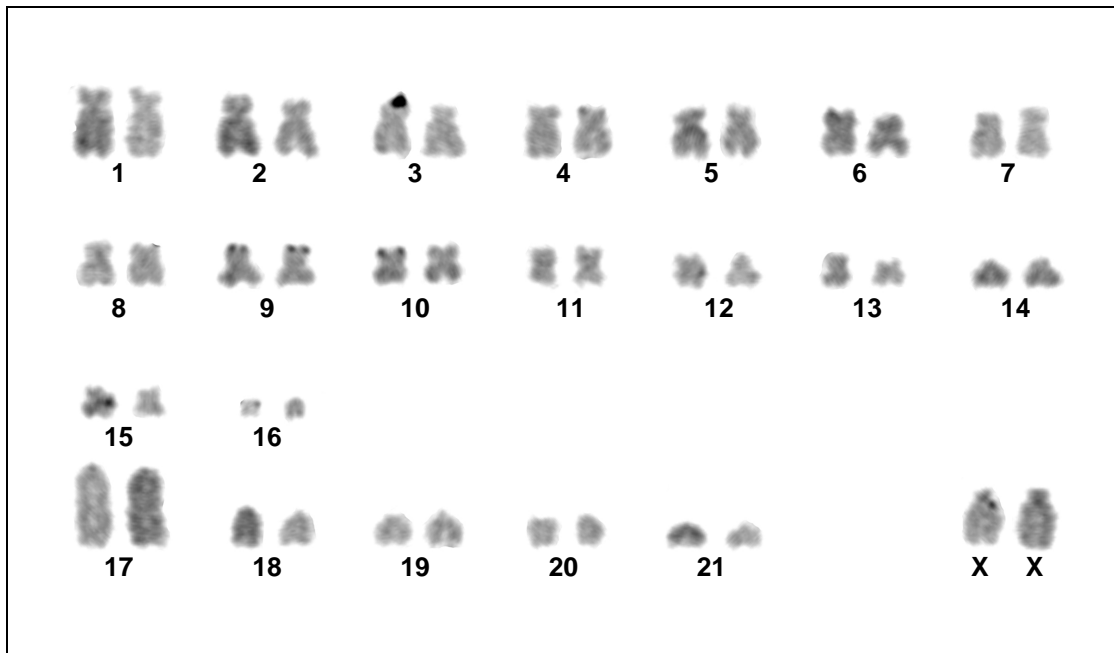


Figura 13. *Rhipidomys mastacalis* fêmea (2n=44, NF=74) após Ag-RON. Observe a presença de marcação nos pares 3, 9, 10 e 16.

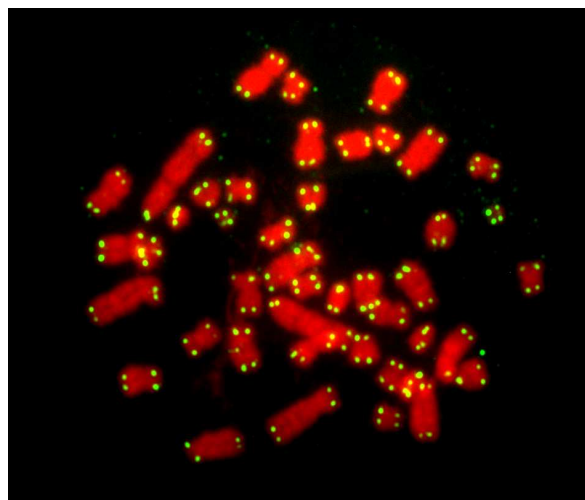


Figura 14. Metáfase de *Rhipidomys mastacalis* macho (2n=44, NF=74) após hibridação *in situ* com a sonda telomérica.

Rhipidomys cariri

Foram analisados dois machos e três fêmeas de *Rhipidomys cariri* provenientes de Berilo (Minas Gerais). O cariótipo desses exemplares apresentou um número diplóide igual a 44 e um número fundamental igual a 48. O cariótipo foi montado tomando como referência o descrito para *R. macrurus* (Svartman e Almeida, 1993). Esta é a primeira descrição do cariótipo dessa espécie.

Descrição do Cariótipo

- 18 pares de autossomos acrocêntricos variando gradativamente de tamanho de grandes a pequenos (par 1 ao 9 e 11 ao 19);
- 1 par de autossomos subteloicêntricos médios (par 10);
- 2 pares de autossomos metacêntricos pequenos (pares 20 e 21);
- X- submetacêntrico grande com variação de tamanho no braço curto;
- Y- acrocêntrico pequeno.

Após a coloração comum era possível identificar os pares 1, 10, 19, os cromossomos X e Y (Figura 15).

Padrões de Bandeamento

O padrão de bandeamento G permitiu a identificação de todos os pares do cariótipo. Em todas as células analisadas, o braço longo do cromossomo X apresentou duas bandas mais coradas em região central e o braço curto não apresentou bandas. O cromossomo Y apresentou uma pequena banda na região próxima ao centrômero (Figura 16).

Após o bandeamento C, foi possível observar a presença de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de quase todos os autossomos e em toda a extensão do braço curto do cromossomo X, mais evidente na região pericentromérica. O cromossomo Y apresentou uma grande banda heterocromática na região próxima ao centrômero (Figura 17).

A coloração das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata revelou de um a cinco cromossomos marcados por metáfase. As marcações foram observadas nos braços curtos de cromossomos acrocêntricos médios a pequenos. Das 151 metáfases analisadas, a maioria (57) possuía quatro marcações. Associações foram encontradas com frequência e em nenhum momento apareceram seis cromossomos marcados por metáfase, o que pode indicar que um dos cromossomos desses pares pode não portar genes ribossômicos (Tabela 6, Figura 18).

Sinais de hibridação com sonda telomérica foram observados apenas nas regiões terminais de todos os braços cromossômicos (Figura 19).

A espécie *Rhipidomys cariri* foi descrita recentemente por Tribe (2005) a partir de um estudo sobre o gênero *Rhipidomys* realizado com base em coleções mastozoológicas do Museu Nacional, Rio de Janeiro (MN); University of Kansas Natural History Museum (KU); e National Museum of Natural History, Washington, DC (USNM). *Rhipidomys cariri cariri* foi encontrado no sul do Ceará, nas proximidades do município do Crato e *Rhipidomys cariri baturiteensis* foi coletado no norte do Ceará, nas proximidades do município de Pacoti. *R. cariri* também foi registrado no estado da Bahia (Bonvicino *et al.*, 2008). Espécimes provenientes do município de Berilo, norte de Minas Gerais foram classificados pelo próprio Tribe como *Rhipidomys cariri*. A espécie se distingue de *R. mastacalis* e de *R. macrurus* por seu maior tamanho corporal, pelagem mais áspera e mais acinzentada, vibrissas mais compridas e série molar maior (Tribe, 1996).

Rhipidomys cariri apresentou um cariótipo semelhante aos de algumas outras espécies de *Rhipidomys*. O cariótipo que mais se assemelha ao encontrado em *R. cariri* foi o de *R. leucodactylus* proveniente do Seringal Condor (Amazonas), descrito por Patton *et al.* (2000). Os cariótipos das duas espécies diferem quanto à morfologia do par 10 (subtelocêntrico em *R. cariri* e acrocêntrico em *R. leucodactylus*) e dos cromossomos X (dois braços em *R. cariri* e acrocêntrico em *R. leucodactylus*). Comparações mais detalhadas não foram possíveis já que não foram descritos padrões de bandas de *R. leucodactylus*. O cariótipo de *R. macrurus* ($2n=44$, $NF=50$; Figura 3) também se assemelha bastante ao de *R. cariri*, do qual difere basicamente quanto à morfologia do menor par autossômico, metacêntrico em *R. macrurus* e acrocêntrico em *R. cariri*, e do cromossomo X, acrocêntrico em *R. macrurus*. Cromossomos X com morfologia semelhante ao de *R. cariri* foram encontrados em *R. cf. macrurus* de Casa Grande (São Paulo) (Svartman e Almeida, 1993).

Um padrão de bandeamento C semelhante ao de *Rhipidomys cariri*, com vários cromossomos marcados na região pericentromérica, foi encontrado em *R. macrurus* ($2n=44$, $NF=49$) de Vargem Bonita (Minas Gerais) (Figura 7), *R. leucodactylus* citótipo 1 ($2n=44$, $NF=52$) da Serra da Mesa (Goiás) e de Caxiuanã (Pará) (Andrades-Miranda *et al.*, 2002).

A coloração das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata revelou de um a cinco cromossomos marcados por metáfase, todos acrocêntricos médios que se assemelhavam morfológicamente aos três pares descritos como portadores de RON em *R. macrurus* e *R. cf. macrurus* (Svartman e Almeida, 1993) e descritos em *R. macrurus* macho ($2n=44$, $NF=49$) deste trabalho.

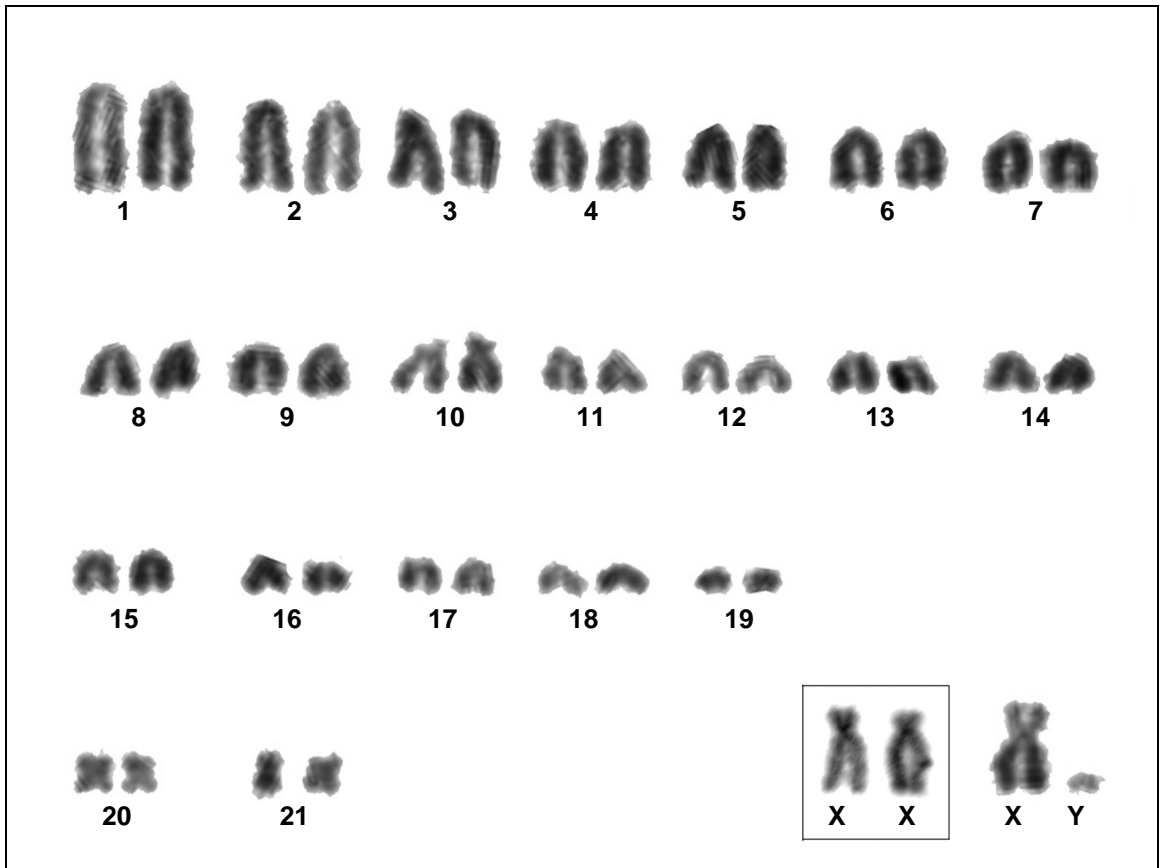


Figura 15. Cariótipo de *Rhipidomys cariri* macho ($2n=44$, $NF=48$). No destaque, o par sexual de uma fêmea. Observe a variação no tamanho do braço curto do cromossomo X.

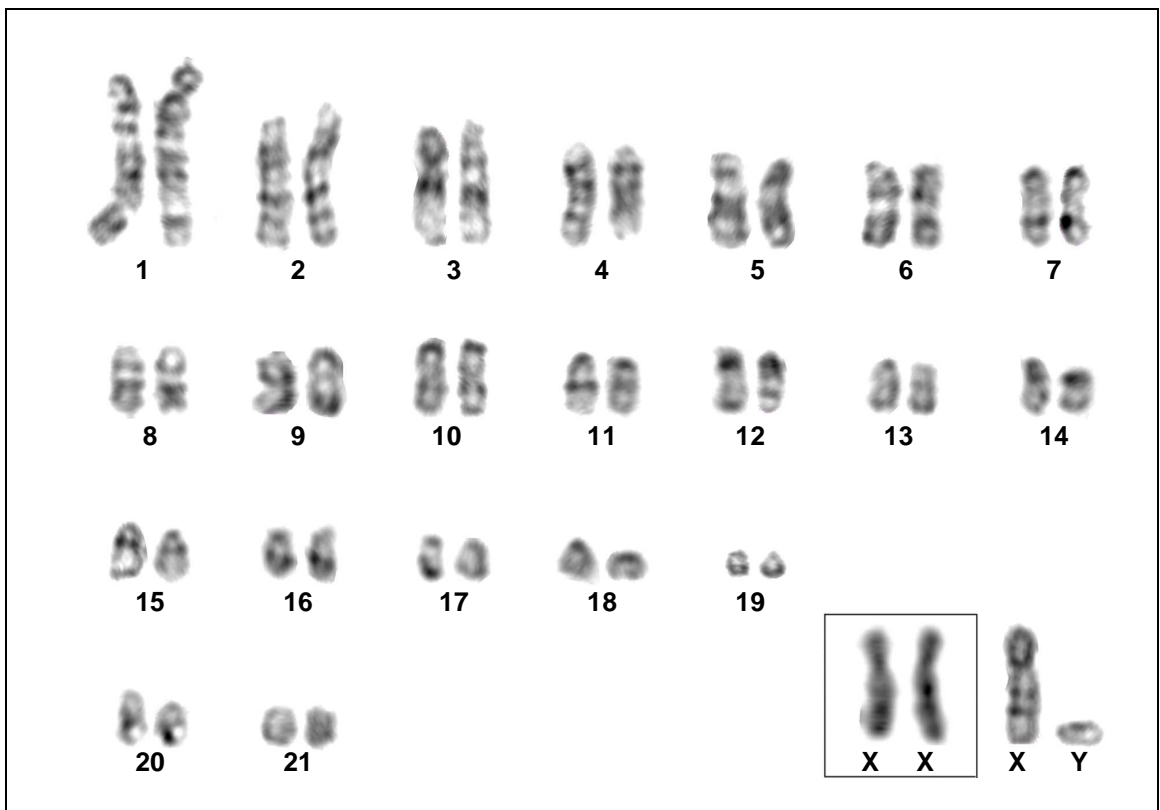


Figura 16. Padrão de bandas G no cariótipo de *Rhipidomys cariri* macho ($2n=44$, $NF=48$). No destaque, o par sexual de uma fêmea.

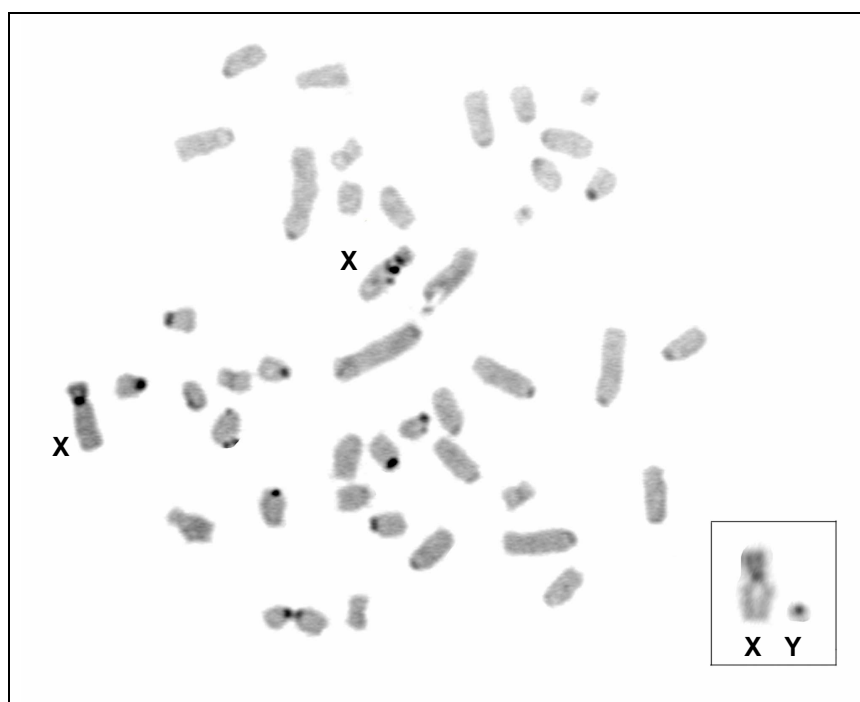


Figura 17. Padrão de bandas C numa metáfase de *Rhipidomys cariri* fêmea ($2n=44$, $NF=74$). No destaque, o par sexual de um macho.

Tabela 5. Número de RON por célula em *Rhipidomys cariri* ($2n=44$, $NF=48$).

Número de Cromossomos Marcados		1	2	3	4	5	Total
Número de Células	MOL 218 ♂	2	6	6	13	3	30
	MOL 271 ♀	5	4	10	7	4	30
	MOL 272 ♂	4	5	10	10	1	30
	MOL 273 ♀	1	3	16	11	0	31
	MOL 304 ♀	1	0	12	16	1	29
	Total	13	18	54	57	9	151

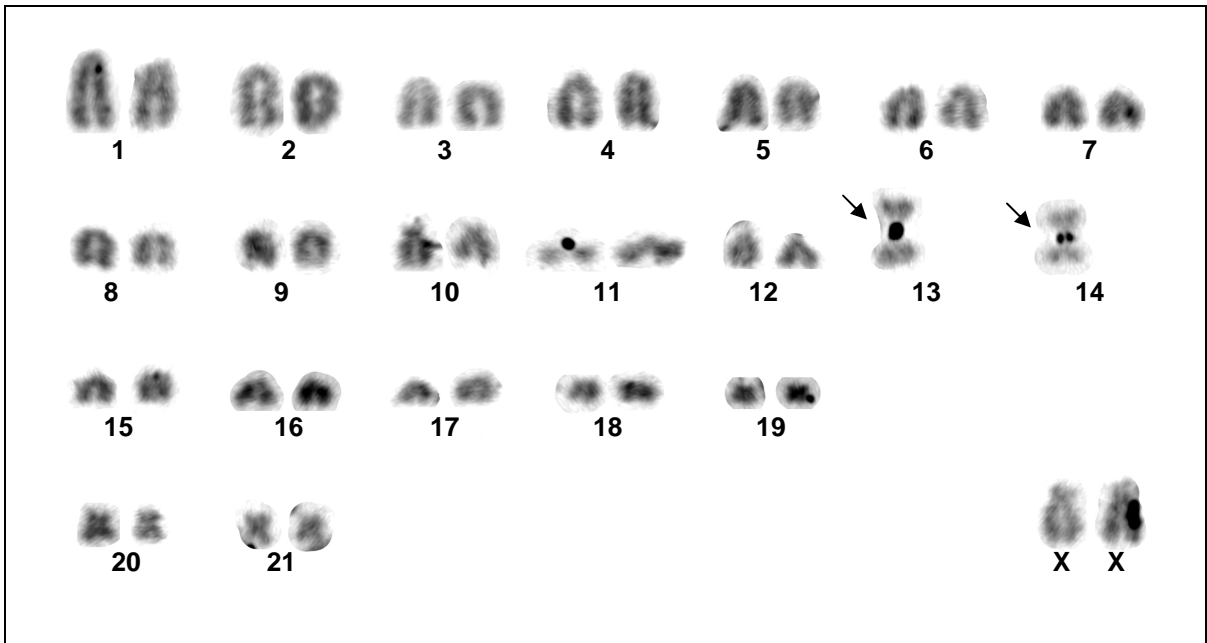


Figura 18. Cariótipo de *Rhipidomys cariri* fêmea ($2n=44$, $NF=48$) após Ag-RON. As setas indicam associações entre dois cromossomos portadores de RON.

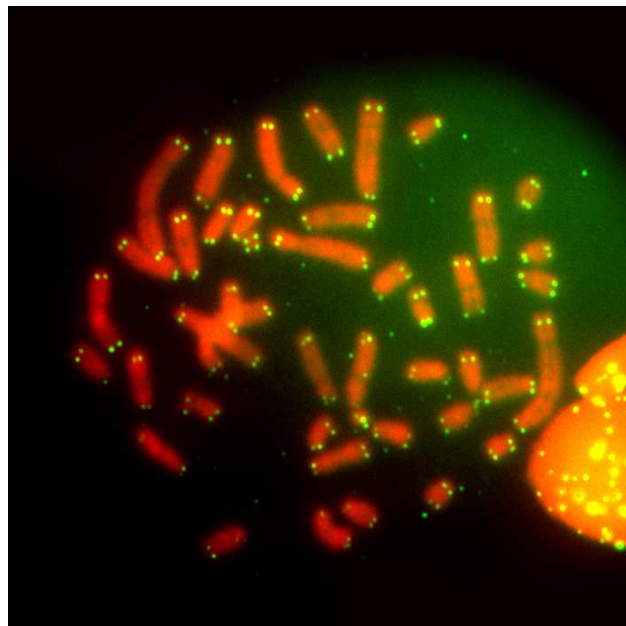


Figura 19. Metáfase de *Rhipidomys cariri* fêmea ($2n=44$, $NF=48$) após hibridação *in situ* com a sonda telomérica.

***Rhipidomys* Híbridos**

Foram analisados três indivíduos híbridos interespecíficos resultantes do cruzamento entre uma fêmea de *Rhipidomys mastacalis* e um macho de *R. cariri* (MOL 218), nascidos em cativeiro. Os híbridos apresentaram cariótipos com $2n=44$ e $NF=61$, valor intermediário entre os das espécies parentais ($NF=74$ em *R. mastacalis* e $NF=48$ em *R. cariri*).

Os cariótipos foram montados de acordo com o cariótipo de *R. macrurus* para facilitar a comparação posterior dos três cariótipos, sendo o homólogo da esquerda proveniente de *R. mastacalis* e o da direita de *R. cariri*.

Descrição do Cariótipo

- 23 autossomos acrocêntricos com tamanho variando gradualmente de grandes a pequenos;
- 1 autossomo subtelocêntrico médio (homólogo do par 10 de *R. cariri*);
- 18 autossomos metacêntricos/submetacêntricos com tamanho variando gradualmente de grande a pequeno;
- X- acrocêntrico grande com um braço curto pouco evidente, originário da fêmea de *R. mastacalis* e, portanto, presente nos três indivíduos.
- X- submetacêntrico grande de *R. cariri* macho e presente apenas nas duas fêmeas;
- Y- acrocêntrico pequeno.

Após coloração convencional foi possível identificar os cromossomos 1, 2 e 16 provenientes de *R. mastacalis* e os cromossomos 10 e 19 de provenientes *R. cariri* e o maior par acrocêntrico similar em ambas as espécies (par 17 de *R. mastacalis* e 1 de *R. cariri*) (Figura 20).

Padrões de Bandeamento

O padrão de bandas G permitiu a identificação de todos os pares do complemento, bem como do par sexual (Figura 21).

Após a aplicação do bandeamento C, foi observada a presença de heterocromatina constitutiva pericentromérica em aproximadamente metade dos autossomos, na maioria acrocêntricos. O braço curto dos cromossomos X era inteiramente heterocromático. Não foi possível obter o padrão de bandas C do macho (Figura 22).

A coloração das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata revelou de um a cinco cromossomos marcados por metáfase. A maioria das 90 metáfases dos três indivíduos analisados possuía duas marcações. É interessante ressaltar que um único espécime, que apresentou 23 de 30 metáfases com dois cromossomos marcados pela

prata, é responsável por essa moda. Se considerarmos apenas os outros dois espécimes, a moda seria igual a três (Tabela 7, Figura 23).

Os cromossomos portadores de RON nos híbridos equivalem aos portadores de RON nas espécies parentais. O macho (MOL 435) e uma fêmea (MOL 259) apresentaram Ag-RON tanto em cromossomos originários de *R. mastacalis* como de *R. cariri*. A outra fêmea (MOL 436), apresentou Ag-RON no cromossomo metacêntrico médio e no menor par do complemento, ambos oriundos de *R. mastacalis*, em cerca de 60% das células analisadas. O cromossomo 3 oriundo de *R. mastacalis* apareceu marcado em cinco metáfases dessa fêmea e um cromossomo acrocêntrico médio marcado, provavelmente oriundo de *R. cariri*, apareceu marcado em apenas três células (Tabela 7, Figura 23).

Nos híbridos, os homólogos marcados dos pares 4, 8, 10, 11 e 21 correspondem aos pares 3, 7, 9, 10 e 16 de *R. macrurus*, respectivamente. Dois cromossomos acrocêntricos médios a pequenos marcados simultaneamente em algumas metáfases de dois indivíduos (MOL 259 e MOL 435) podem corresponder aos pares 11, 13 e 14 de *R. cariri* e/ou ao par 18 de *R. mastacalis*.

Talvez a diferença na moda dependa da procedência materna ou paterna dos cromossomos envolvidos, uma vez que alguns homólogos dos pares que apresentaram marcação por Ag-RON de *R. mastacalis* e *R. cariri* não apareceram marcados em dose dupla (por exemplo, o par 3 de *R. mastacalis* e talvez um dos cromossomos dos três pares acrocêntricos médios a pequenos com marcação de *R. cariri*). Em *R. cariri*, nenhuma das células analisadas apresentou todos os seis cromossomos marcados, o que pode indicar que apenas um homólogo de um destes pares seja portador de RON.

Após a hibridação *in situ* com a sonda telomérica, só foram observados sinais na região terminal de todos os braços cromossômicos, sem evidência de marcação intersticial (Figura 24).

Silva e Yonenaga-Yassuda (1999) descreveram uma fêmea coletada em Morro do Chapéu (Bahia) e identificada como *Rhipidomys* sp. A ($2n=44$, $NF=61$) que apresentava 10 pares heteromórficos, inclusive o par de cromossomos X. As autoras sugeriram que esse espécime poderia pertencer a uma população na qual variantes morfológicas de vários cromossomos estariam fixados ou que seria um híbrido resultante do cruzamento de uma espécie de *Rhipidomys* com NF alto com uma espécie de NF baixo.

O cariótipo dos híbridos entre *Rhipidomys mastacalis* e *R. cariri* que analisamos se assemelha muito ao encontrado por Silva e Yonenaga-Yassuda (1999), o que favorece a segunda hipótese levantada pelas autoras. Uma vez que a quantidade de espécimes de *Rhipidomys* já cariotipados é pequena e um provável híbrido já foi coletado na natureza, pode-se especular que essas hibridações sejam relativamente freqüentes, e que indivíduos dessas duas espécies ainda não se reconheçam como espécies distintas.

Silva e Yonenaga-Yassuda (1999) não apresentaram o padrão de bandas G do cariótipo completo do suposto híbrido coletado na Bahia, o que não permitiu que realizássemos uma comparação mais detalhada.

A comparação do padrão de bandas C de *Rhipidomys* híbrido com o de *Rhipidomys* sp. A (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999) permitiu observar semelhanças principalmente na marcação pericentromérica de alguns autossomos pequenos. Entretanto, nos híbridos analisados por nós, foi possível visualizar marcações mais fracas em alguns autossomos grandes e médios. Os cromossomos X nas duas amostras apresentaram padrões idênticos de marcação: o X acrocêntrico apresentou marcação pericentromérica e o X submetacêntrico apresentou marcação em todo o braço curto, mais forte na região pericentromérica (Figura 22).

Em *Rhipidomys* sp. A, Silva e Yonenaga-Yassuda (1999) descreveram Ag-RON no homólogo metacêntrico médio do par 9, provavelmente equivalente ao cromossomo 11 de nossos *Rhipidomys* híbridos e oriundos de *R. mastacalis* (par 10); no braço longo do homólogo acrocêntrico do par 13, marcação similar apenas à encontrada no cromossomo 18 de *R. macrurus* fêmea; e no braço curto de dois pares acrocêntricos médios (pares 16 e 18), que podem equivaler aos pares 11,13 ou 14 de *R. cariri* ou ao par 18 de *R. mastacalis*.

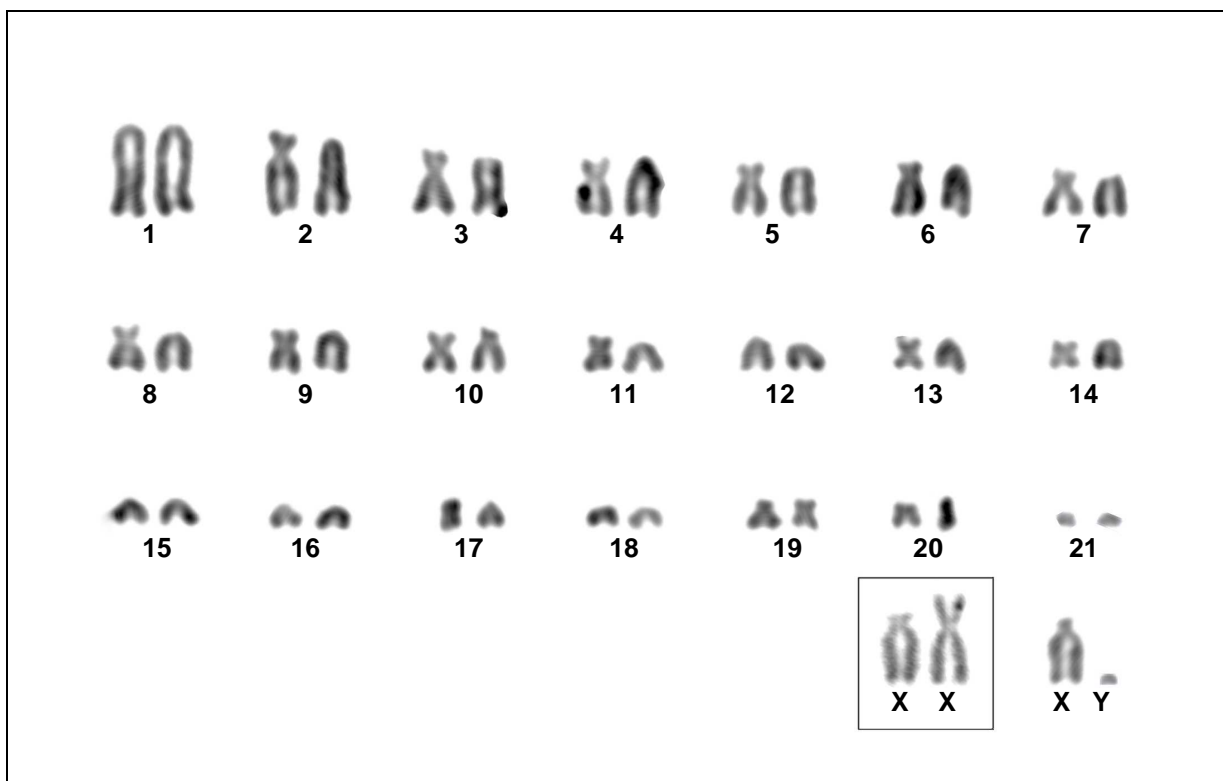


Figura 20. Cariótipo de um híbrido macho ($2n=44$, $NF=61$). Em cada par, o cromossomo da esquerda é proveniente da fêmea de *R. mastacalis* e o da direita é oriundo do macho de *R. cariri*. No destaque, o par sexual de uma fêmea híbrida.

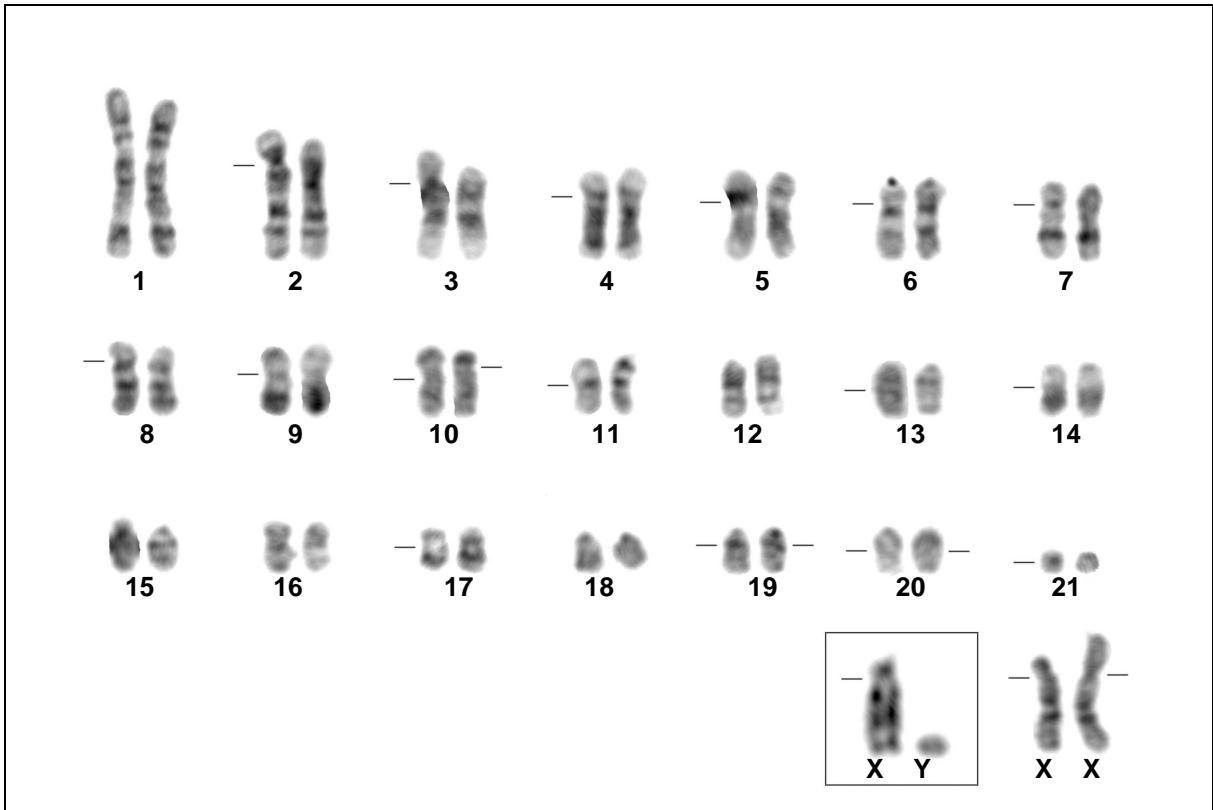


Figura 21. Padrão de bandas G no cariótipo de uma fêmea híbrida de *Rhipidomys* ($2n=44$, $NF=61$). Em cada par, o homólogo da esquerda é o proveniente de *R. mastacalis* (fêmea) e o da direita, o de *R. cariri* (macho). As barras indicam a posição do centrômero nos cromossomos com dois braços. No destaque, o par sexual de um macho híbrido.

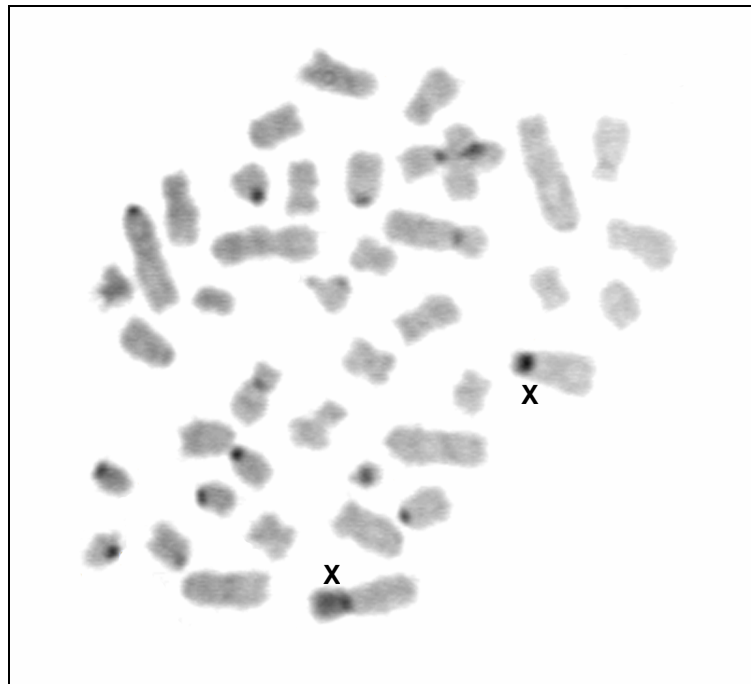


Figura 22. Padrão de bandas C numa metáfase de uma fêmea híbrida de *Rhipidomys* ($2n=44$, $NF=61$).

Tabela 6. Número de RON por célula em *Rhipidomys* híbrido (2n=44, NF=61).

Número de Cromossomos Marcados		1	2	3	4	5	Total
Número de Células	MOL 259 ♀	0	2	16	11	1	30
	MOL 435 ♂	5	7	9	9	0	30
	MOL 436 ♀	3	23	2	1	1	30
	Total	8	32	27	21	2	90

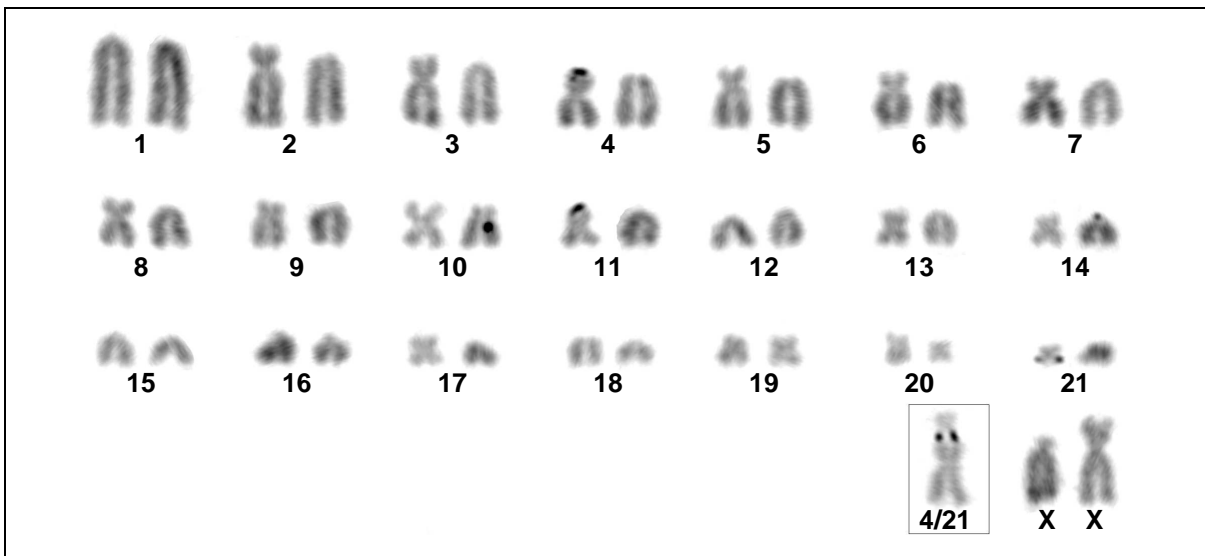


Figura 23. Cariótipo de uma fêmea híbrida de *Rhipidomys* (2n=44, NF=61) após Ag-RON. No destaque, uma associação entre os cromossomos dos pares 4 e 21, equivalentes ao 3 e 16 de *R. mastacalis*.

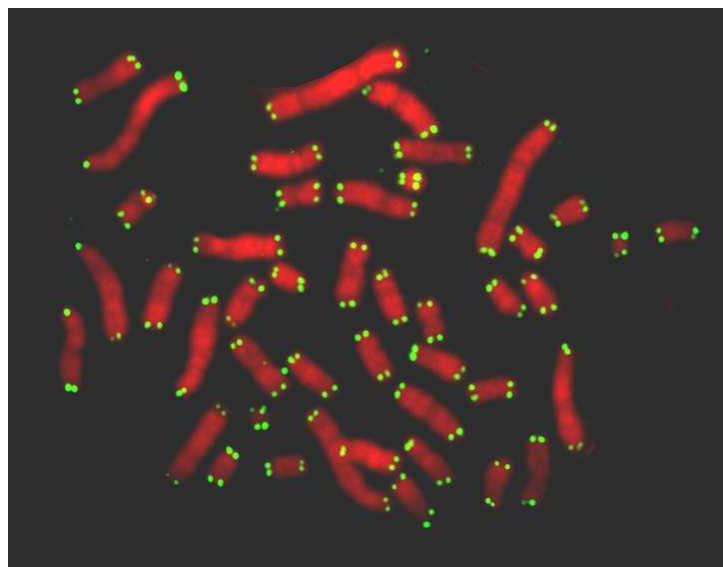


Figura 24. Metáfase de *Rhipidomys* híbrido macho (2n=44, NF=61) após hibridação *in situ* com a sonda telomérica.

Comparação dos Cariótipos de Espécies de *Rhipidomys*

Fizemos uma análise comparativa dos cariótipos das três espécies de *Rhipidomys* estudadas (*R. macrurus*, *R. mastacalis* e *R. cariri*), utilizando os padrões de bandeamento G, C e a coloração das regiões organizadoras de nucléolos pela prata. Para complementar nosso estudo, realizamos alguns experimentos de hibridação *in situ* fluorescente utilizando como sondas DNAs genômicos (GISH).

A comparação do padrão de bandas G das espécies de *Rhipidomys* coletadas em Minas Gerais revelou uma grande conservação entre os autossomos de cada uma das três espécies, permitindo estabelecer total correspondência entre os três cariótipos (Tabela 8, Figura 25). Sete dos 21 pares autossômicos das três espécies apresentaram a mesma morfologia e o mesmo padrão de bandas. Os outros 14 pares de autossomos apresentaram morfologias diferentes entre *Rhipidomys mastacalis* (NF alto) e *R. macrurus* e *R. cariri* (NF baixo). Nesses pares foi possível observar que, embora a morfologia diferisse, o padrão de bandas parecia conservado ao longo dos cromossomos correspondentes em cada uma das três espécies. Esta observação não seria a esperada caso inversões pericêntricas fossem responsáveis pela variação de morfologia e de NF entre as espécies.

Tabela 7. Correspondência entre os autossomos das espécies de *Rhipidomys*.

	<i>R. macrurus</i>	<i>R. mastacalis</i>	<i>R. cariri</i>
Cromossomos Conservados	1	17	1
	12	18	12
	15	19	15
	16	20	16
	18	21	18
	19	15	20
	20	12	21
Cromossomos com Diferentes Morfologias (RC)	2	1	2
	3	2	3
	4	3	4
	5	4	5
	6	5	6
	7	6	7
	8	7	8
	9	8	9
	10	9	10
	11	10	11
	13	11	13
	14	13	14
	17	14	17
	21	16	19

A mudança na morfologia dos cromossomos sem alteração no padrão de bandeamento G pode ser explicada por um fenômeno descoberto há 16 anos, o Reposicionamento Centromérico (RC) (Voullaire *et al.*, 1993). Esse fenômeno consiste na mudança da posição do centrômero, por transposição da região centromérica (Verlinsky *et al.* 1995) ou por formação de um neocentrômero com degradação ou latência do centrômero antigo (Ferrerri *et al.*, 2005). No neocentrômero ocorre heterocromatinização das regiões pericentroméricas e um aumento no número de cópias de DNA repetitivo comuns ao centrômero e, paralelamente, há perda de heterocromatina na região do antigo centrômero (Ventura *et al.*, 2001). Casos de RC já foram registrados em primatas, aves, gado, rato, eqüinos e porco e sugeridos para outras espécies (Band *et al.*, 2000; Carbone *et al.*, 2006; Eder *et al.*, 2003; Kasai *et al.*, 2003; Kobayashi, 2008; Montefalcone *et al.*, 1999; Ventura *et al.*, 2004). Na maioria desses trabalhos, foram comparados organismos pertencentes a gêneros ou até a ordens diferentes. Dentro de um mesmo gênero, são conhecidos casos de RC em eqüinos (Carbone *et al.* 2006) e em ratos do gênero *Tokudaia*, no qual apenas os cromossomos X sofreram RC (Kobayashi *et al.*, 2008). Além disso, vários casos de RC foram detectados em humanos (Amor *et al.*, 2004).

Dentre os 29 cariótipos encontrados para o gênero *Rhipidomys*, apenas quatro apresentaram um número diplóide diferente de $2n=44$, *R. nitela* com $2n=48$, $NF=67$ e 68 (Andrades-Miranda *et al.*, 2002; Volobouev e Catzefflis, 2000) e *R. cf. nitela* com $2n=50$, $NF=71$ e 72 (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999). Em contraste com a conservação do número diplóide, foi observada uma grande variação do número fundamental, $NF=46$ a 80 nas espécies com $2n=44$ (Andrades-Miranda *et al.*, 2002; Patton *et al.*, 2000). Embora vários autores tenham sugerido que as variações em NF eram decorrentes de inversões pericêntricas, em nenhum trabalho foram indicados os trechos invertidos nos cromossomos rearranjados (Andrades-Miranda *et al.*, 2002; Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999; Svartman e Almeida, 1993; Volobouev e Catzefflis, 2000; Zanchin *et al.*, 1992). Assim, seria interessante rever esses estudos levando em consideração a possibilidade de RCs em diferentes espécies de *Rhipidomys*.

A análise de padrões de bandeamento C em espécies de *Rhipidomys* permitiu verificar a ocorrência de adições/deleções de heterocromatina constitutiva (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999; Svartman e Almeida, 1993; Zanchin *et al.*, 1992). Translocações e rearranjos robertsonianos foram aventados para explicar as diferenças entre espécies com diferentes números diplóides (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999; Volobouev e Catzefflis, 2000).

Na nossa amostra de Minas Gerais, regiões heterocromáticas pericentroméricas foram observadas em cerca de metade dos autossomos, na maioria acrocêntricos, de *R. mastacalis*, metade dos autossomos, na maioria acrocêntricos de *R. macrurus* macho e, em

cerca de um terço dos cromossomos, na maioria acrocêntricos, de *R. cariri*. A fêmea de *R. macrurus* foi o único indivíduo de nossa amostra que só teve os cromossomos X marcados. A diferença no tamanho e morfologia do cromossomo X no gênero *Rhipidomys* pode ser explicada por adição/deleção de heterocromatina no braço curto, ou no caso de *R. nitela* descrito por Volobouev e Catzefflis (2000), pela adição de uma quantidade tão grande de heterocromatina que o braço heterocromático era maior que o eucromático. Svartman e Almeida (1993) descreveram a presença de uma banda heterocromática intersticial no par 1 de *Rhipidomys* cf. *macrurus* e de *R. macrurus* que poderia representar o ponto de quebra envolvido numa inversão cromossômica. Esta banda heterocromática não foi evidenciada em nenhum dos espécimes que analisamos.

A comparação das Ag-RON permitiu identificar cromossomos com RON que são correspondentes em espécies diferentes. Os três pares acrocêntricos médios portadores da RON em *R. cariri* e *R. macrurus* macho são semelhantes aos pares com Ag-RON descritos em *R. macrurus* e *R. cf. macrurus* por Svartman e Almeida (1993) e dois deles provavelmente equivalem ao segundo maior par acrocêntrico do cariótipo de *R. mastacalis* (par 18) e ao par metacêntrico médio (par 10) dessa mesma espécie. O par 10 marcado em *R. macrurus* fêmea pode ser equivalente ao par submetacêntrico médio portador da RON em *R. mastacalis* (par 9). Outra marcação semelhante entre essas duas espécies é a encontrada no menor par acrocêntrico, par 21 de *R. macrurus* e 16 de *R. mastacalis*. Entretanto, somente em *R. macrurus* ocorriam marcações em ambos os braços cromossômicos. Um único homólogo do par 21 de *R. mastacalis* ($2n=44$, $NF=52$) descrito por Silva e Yonenaga-Yassuda (1999) apresentou Ag-RON.

A variabilidade no número e na morfologia dos cromossomos marcados por Ag-RON pode resultar tanto de variação da posição dos genes ribossômicos nos cromossomos, quanto da atividade diferencial desses genes em cada célula, já que a prata só marca RON ativas (Sumner, 2003). A hibridação *in situ* com sondas de DNA ribossômico pode indicar a localização desses genes, sem a necessidade de que tenham estado ativos.

Após a hibridação *in situ* com a sonda telomérica, foram observados apenas sinais na região terminal de todos os braços cromossômicos nas três espécies estudadas, sem evidência de marcações intersticiais. Esse mesmo tipo de resultado já havia sido encontrado anteriormente em *R. mastacalis*, *R. cf. mastacalis*, *R. nitela*, *R. leucodactylus* e em duas outras espécies não identificadas (Andrades-Miranda *et al.*, 2002; Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999). A presença de marcações teloméricas intersticiais poderia ser um indício de ocorrência de algum rearranjo envolvendo o telômero. No entanto, a ausência de marcações intersticiais por si só não descarta a possibilidade de ocorrência de rearranjos.

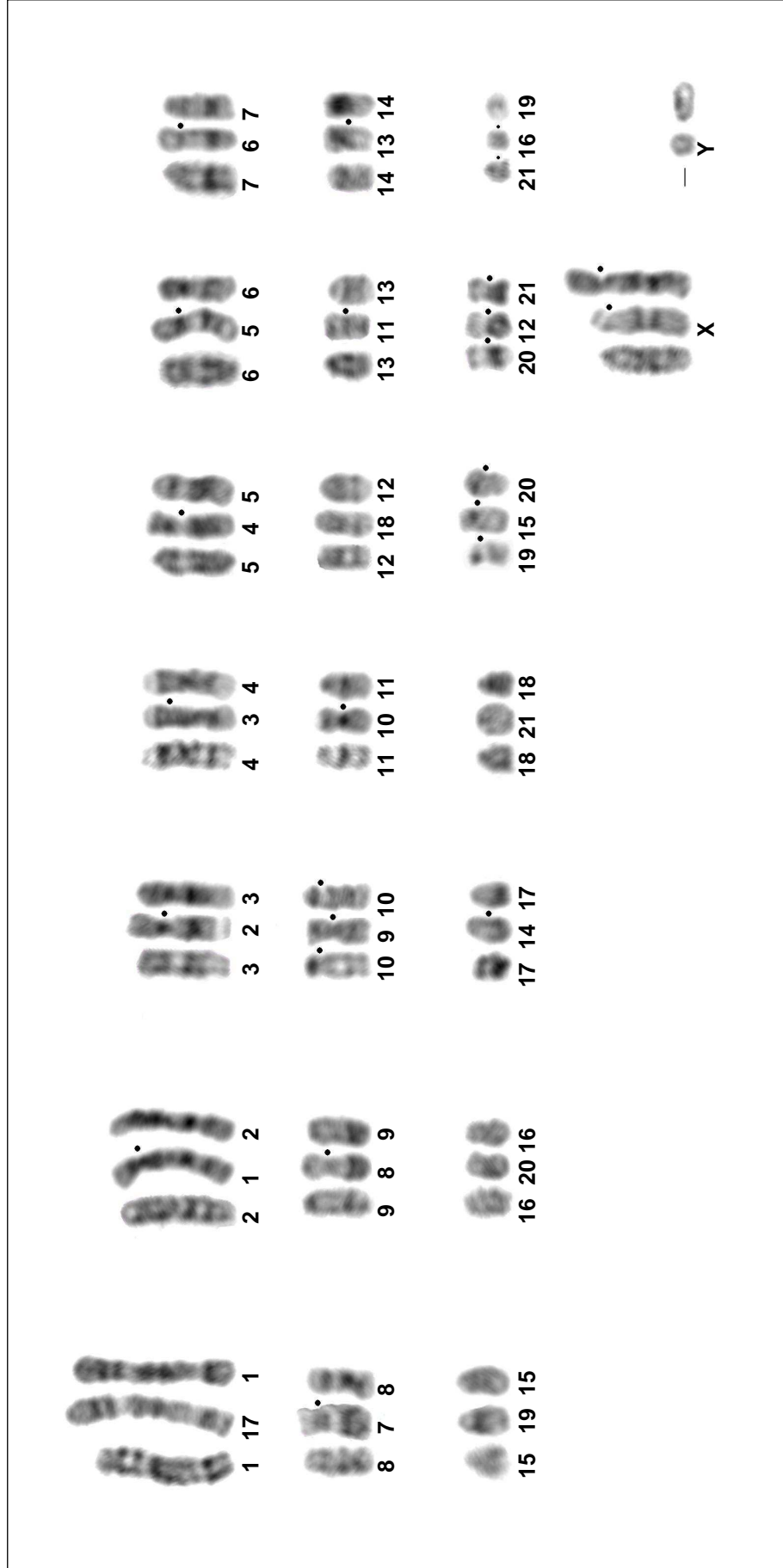


Figura 25. Comparação entre os padrões de bandas G dos cromossomos de *Rhipidomys macrurus*, *R. mastacalis* e *R. cariri*, da esquerda para a direita. Para a montagem foi utilizado como modelo o cariótipo de *R. macrurus*. O ponto à direita de alguns cromossomos indica a posição do centrômero nos cromossomos com dois braços. Os cromossomos Y foram retirados de outras metáfases em mesma escala, exceto o de *R. macrurus* para o qual não obtivemos resultados de bandeamento G.

Hibridação *in situ* com DNA Genômico Total (GISH)

Com o intuito de comparar os genomas das espécies de *Rhipidomys*, utilizamos DNAs genômicos como sondas para experimentos de hibridação *in situ*. Dispúnhamos de fragmentos de fígado, rins e coração congelados apenas de um *Rhipidomys* híbrido e de um *R. mastacalis*, ambos machos, a partir dos quais foram extraídos os DNAs genômicos. Após a extração, cada um desses DNAs foi marcado com digoxigenina. O DNA genômico do híbrido foi marcado também com biotina para ser usado em experimentos de hibridação simultânea com duas sondas.

Cada DNA genômico marcado foi inicialmente hibridado a preparações de cromossomos da mesma espécie com o intuito de avaliar se as condições experimentais utilizadas eram adequadas (controles, Figura 26). Em seguida, os DNAs genômicos marcados foram utilizados em experimentos conforme indicado na Tabela 9.

Cada sonda marcada por digoxigenina foi hibridada separadamente em preparações cromossômicas de *R. macrurus*, *R. mastacalis*, *R. cariri* e *Rhipidomys* híbrido. A hibridação simultânea com DNA de *R. mastacalis* marcado com digoxigenina e DNA de *Rhipidomys* híbrido marcado com biotina foi realizada em preparações cromossômicas de *R. mastacalis*, *R. cariri* e *Rhipidomys* híbrido.

Tabela 8. Experimentos de hibridação *in situ* com DNA genômico total.

Experimentos	DNA marcado (sonda)	Cromossomos
Controle I	<i>R. mastacalis</i> (digoxigenina)	<i>R. mastacalis</i>
Controle II	Híbrido (digoxigenina)	Híbrido
I	<i>R. mastacalis</i> (digoxigenina)	<i>R. macrurus</i>
II	Híbrido (digoxigenina)	<i>R. macrurus</i>
III	Híbrido (digoxigenina)	<i>R. mastacalis</i>
IV	<i>R. mastacalis</i> (digoxigenina)+ Híbrido (biotina)	<i>R. mastacalis</i>
V	<i>R. mastacalis</i> (digoxigenina)	<i>R. cariri</i>
VI	Híbrido (digoxigenina)	<i>R. cariri</i>
VII	<i>R. mastacalis</i> (digoxigenina)+ Híbrido (biotina)	<i>R. cariri</i>
VIII	<i>R. mastacalis</i> (digoxigenina)	Híbrido
IX	<i>R. mastacalis</i> (digoxigenina)+ Híbrido (biotina)	Híbrido

Experimentos Controle

Controle I. A hibridação do DNA genômico de *Rhipidomys mastacalis* a preparações cromossômicas da própria espécie resultou em marcações ao longo de todos os cromossomos, mais intensa nas regiões de heterocromatina constitutiva. Marcações mais fortes foram visualizadas no braço curto do cromossomo X e no Y inteiro, com destaque para a região pericentromérica. Marcações mais evidentes foram observadas também na região terminal de dois pares metacêntricos, na região pericentromérica de dois pares com dois braços, de todos pares acrocêntricos pequenos e do maior par acrocêntrico (par 17), que, além dessa marcação, apresentou uma marcação intersticial leve no terço proximal do braço longo. Um único autossomo submetacêntrico grande, correspondente a um dos cromossomos do par 3, apresentou uma marcação terminal bem intensa no braço curto (Figura 26a) e provavelmente é o mesmo cromossomo que apresentou Ag-RON (Figura 13).

Controle II. A hibridação do DNA genômico do híbrido a preparações cromossômicas dele próprio resultou na marcação do braço curto do cromossomo X e do cromossomo Y inteiro, mais forte na região pericentromérica. Vários autossomos acrocêntricos médios a pequenos e dois cromossomos com dois braços apresentaram marcações mais fortes na região pericentromérica. Alguns cromossomos com dois braços apresentaram-se marcados nas regiões terminais. O maior par autossômico (par 1) apresentou marcações mais evidentes na região pericentromérica e no terço proximal do braço longo (Figura 26 b).

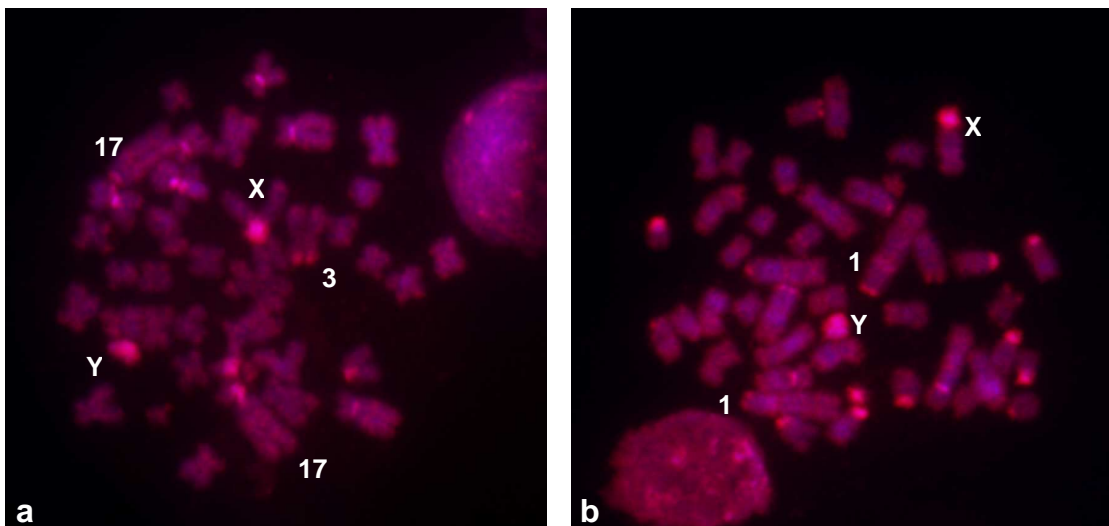


Figura 26. Controles dos experimentos de hibridação com DNA genômico total: **(a)** metáfase de *Rhipidomys mastacalis* macho ($2n=44$, $NF=74$) após hibridação *in situ* com o DNA genômico total de *R. mastacalis* marcado com digoxigenina e **(b)** metáfase de *Rhipidomys* híbrido macho ($2n=44$, $NF=61$) após hibridação *in situ* com DNA genômico total do híbrido (*R. mastacalis* x *R. cariri*) marcado com digoxigenina. As sondas foram detectadas com o anticorpo antidigoxigenina acoplado à rodamina (vermelho) e a contra-coloração dos cromossomos foi feita com DAPI.

Rhipidomys macrurus (Experimentos I e II)

A hibridação da sonda de *Rhipidomys mastacalis* a cromossomos de *R. macrurus* fêmea resultou na marcação de todos os cromossomos. Algumas regiões apresentaram uma marcação mais evidente, como a região heterocromática do cromossomo X, que também foi evidenciada pelo bandeamento C (Figura 6), e as extremidades distais do menor cromossomo do complemento (par 21), que é portador de RON em ambos os braços (Figura 8). O par 1 apresentou uma marcação leve na região pericentromérica e no terço proximal do braço longo em algumas metáfases (Figura 27a).

A hibridação do DNA genômico de *Rhipidomys* híbrido (*R. mastacalis* x *R. cariri*) em cromossomos de *R. macrurus* permitiu a observação de marcações semelhantes às observadas com a sonda de *R. mastacalis* (Figura 27b).

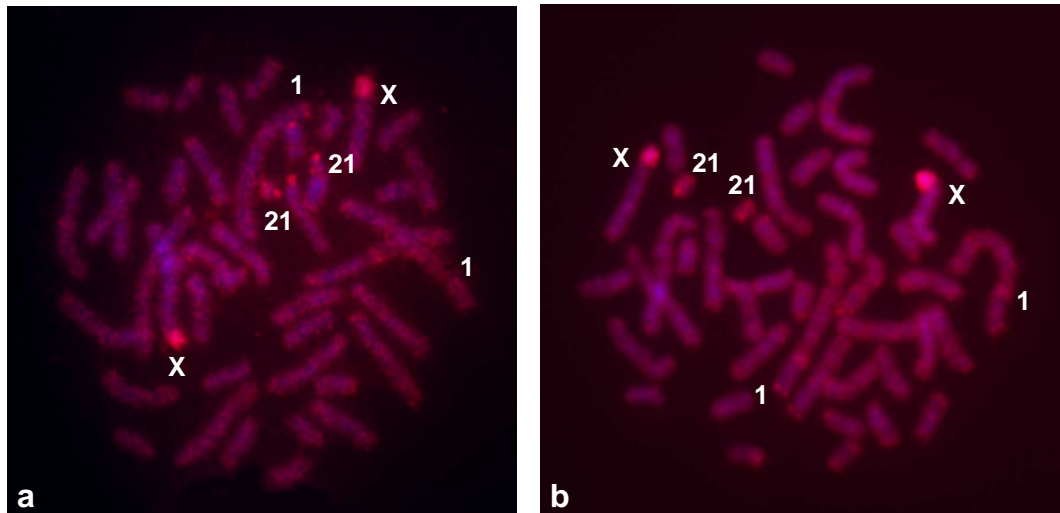


Figura 27. Metáfases de *Rhipidomys macrurus* fêmea ($2n=44$, $NF=50$) após hibridação *in situ* com: **(a)** DNA genômico total de *R. mastacalis* e **(b)** DNA genômico total do híbrido (metáfase parcial, $2n=42$). As sondas foram marcadas com digoxigenina e detectadas com um anticorpo antidigoxigenina acoplado a rodamina (vermelho). A contra-coloração dos cromossomos foi feita com DAPI.

Rhipidomys mastacalis (Experimentos III e IV)

A hibridação da sonda de DNA genômico do híbrido em metáfases de *R. mastacalis* forneceram um resultado semelhante ao obtido com o controle I (DNA genômico de *R. mastacalis* em células de *R. mastacalis*). Entretanto, neste experimento, diferentemente do controle, não foi observada marcação no par 3 (Figura 28).

A sonda de *R. mastacalis* e de *Rhipidomys* híbrido contêm o genoma total de *R. mastacalis*, porém só a segunda sonda contém o genoma de *R. cariri*. Caso houvesse diferença considerável entre os genomas dessas espécies, poderíamos encontrar alguma diferença na marcação com essas sondas, o que não ocorreu nem nas regiões heterocromáticas (Figura 29).

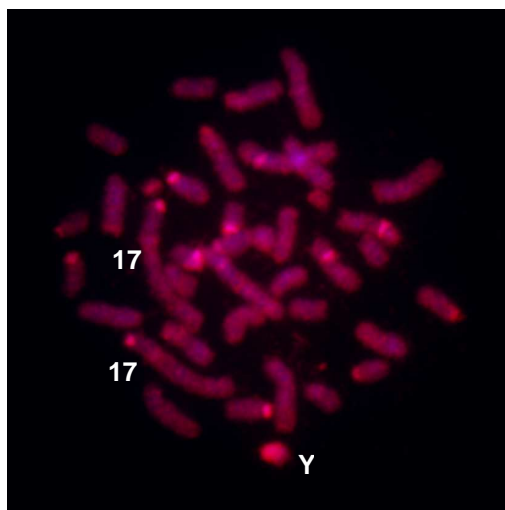


Figura 28. Metáfase parcial ($2n=39$) de *Rhipidomys mastacalis* macho ($2n=44$, $NF=74$) após hibridação *in situ* com DNA genômico total do híbrido. A sonda foi marcada com digoxigenina e detectada com um anticorpo antidigoxigenina acoplado a rodamina (vermelho). A contra-coloração dos cromossomos foi feita com DAPI.

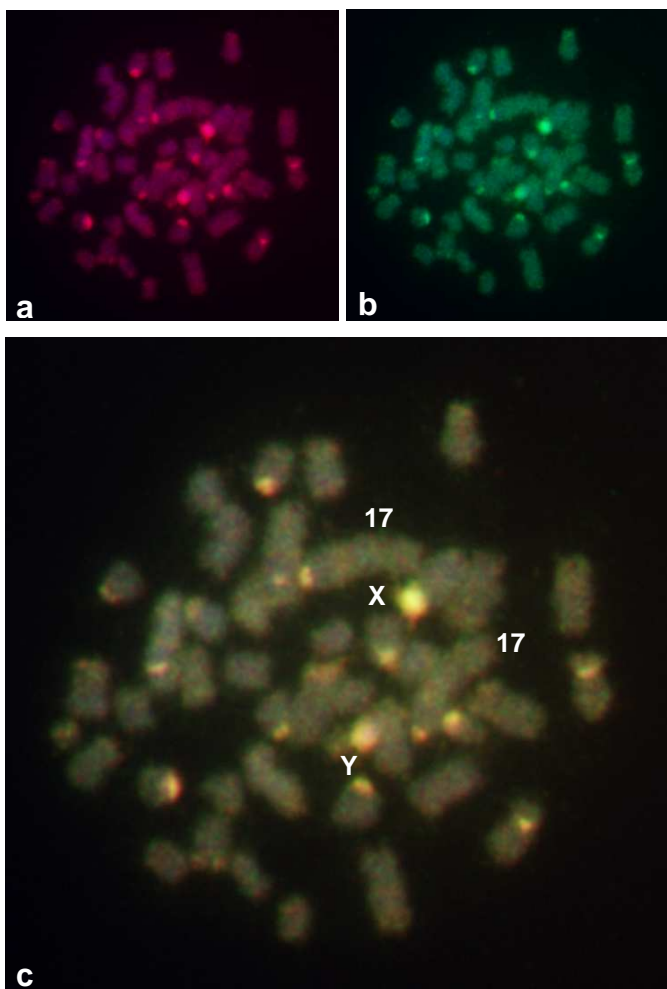


Figura 29. Metáfase de *Rhipidomys mastacalis* macho ($2n=44$, $NF=74$) após hibridação *in situ* com DNA genômico total de *R. mastacalis* (a) e do híbrido (b). Em (c) a imagem resultante da sobreposição de (a) e (b). As sondas foram marcadas com digoxigenina e biotina e detectadas com um anticorpo antidigoxigenina acoplado a rodamina (vermelho) e avidina acoplada a FITC (verde), respectivamente. A contra-coloração dos cromossomos foi feita com DAPI.

Rhipidomys cariri (Experimentos V, VI e VII)

A hibridação das sondas de DNA genômico total de *R. mastacalis* e do híbrido em células de *R. cariri* forneceram resultados semelhantes. Ambas as sondas hibridaram em todos os cromossomos e marcaram mais intensamente a região pericentromérica de quase todos os autossomos de *R. cariri*, com diferentes intensidades. Não foram observadas marcações intersticiais. A heterocromatina do braço curto do par de cromossomos X ficou bem evidente, sendo que a região pericentromérica ficou ainda mais brilhante. O menor par do complemento (par 19) apresentava uma única marcação bem forte na região pericentromérica e outras marcações fortes foram observadas nos cromossomos acrocêntricos pequenos. O par 1, maior par acrocêntrico, apresentou apenas uma leve marcação pericentromérica (Figura 30).

A hibridação simultânea de sondas genômicas de *R. mastacalis* e do híbrido produziu um padrão semelhante, mostrando que o DNA genômico das espécie *R. mastacalis* e *R. cariri* são equivalentes.

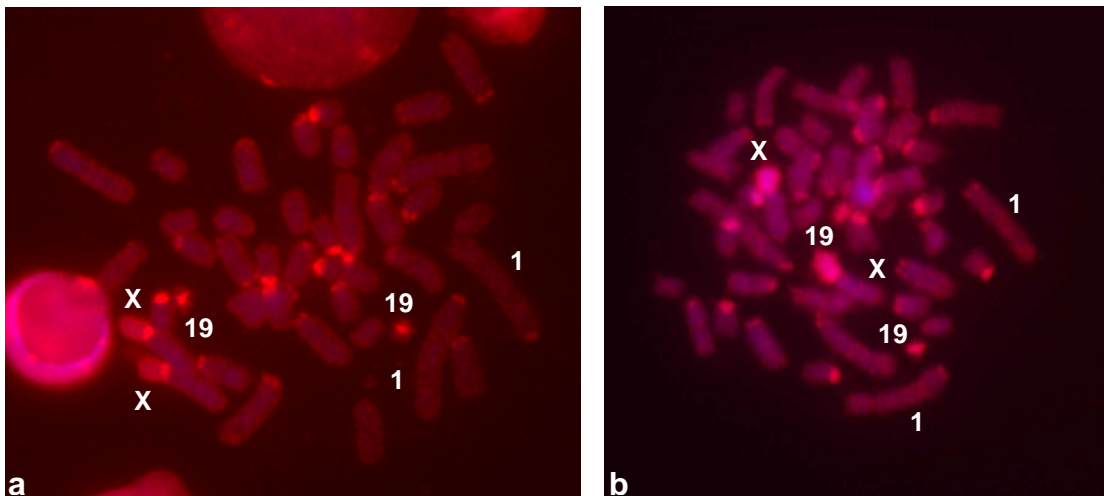


Figura 30. Metáfases de *Rhipidomys cariri* fêmea ($2n=44$, $NF=48$) após hibridação *in situ* com: **(a)** DNA genômico total de *R. mastacalis* (metáfase parcial, $2n=43$) e **(b)** DNA genômico total do híbrido. As sondas foram marcadas com digoxigenina e detectadas com um anticorpo antidigoxigenina acoplado a rodamina (vermelho). A contra-coloração dos cromossomos foi feita com DAPI.

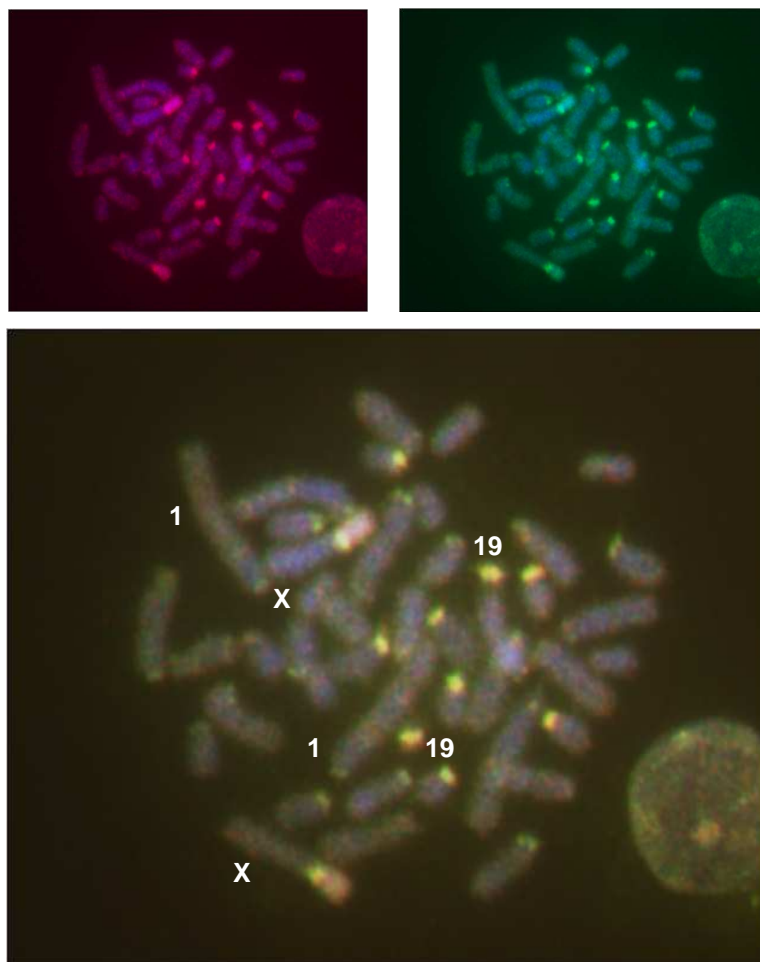


Figura 31. Metáfase de *Rhipidomys cariri* fêmea ($2n=44$, $NF=48$) após hibridação *in situ* com DNA genômico total de *R. mastacalis* **(a)** e do híbrido **(b)**. Em **(c)** a imagem resultante da sobreposição de **(a)** e **(b)**. As sondas foram marcadas com digoxigenina e biotina e detectadas com um anticorpo antidigoxigenina acoplado a rodamina (vermelho) e avidina acoplada a FITC (verde), respectivamente. A contra-coloração dos cromossomos foi feita com DAPI.

***Rhipidomys* Híbrido** (Experimentos VIII e IX)

A hibridação da sonda de DNA genômico de *R. mastacalis* marcou todos os cromossomos do híbrido interespecífico (Figura 32), evidenciando as mesmas regiões marcadas no experimento controle II (Figura 26b). A hibridação simultânea enfatiza que ambas as sondas marcam as mesmas regiões cromossômicas (Figura 33).

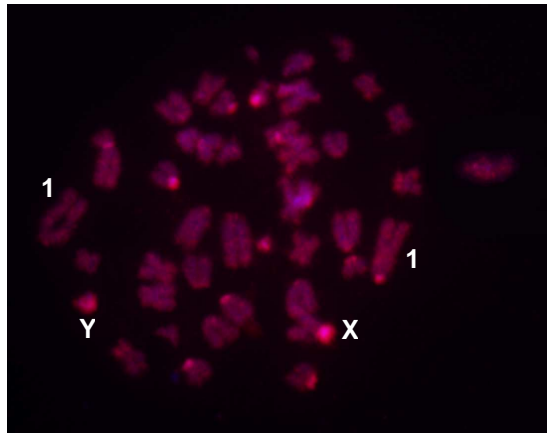


Figura 32. Metáfase parcial ($2n=42$) de *Rhipidomys* híbrido macho ($2n=44$, $NF=61$) após hibridação *in situ* com DNA genômico total de *R. mastacalis*. As sondas foram marcadas com digoxigenina e detectadas com um anticorpo antidigoxigenina acoplado a rodamina (vermelho). A contra-coloração dos cromossomos foi feita com DAPI.

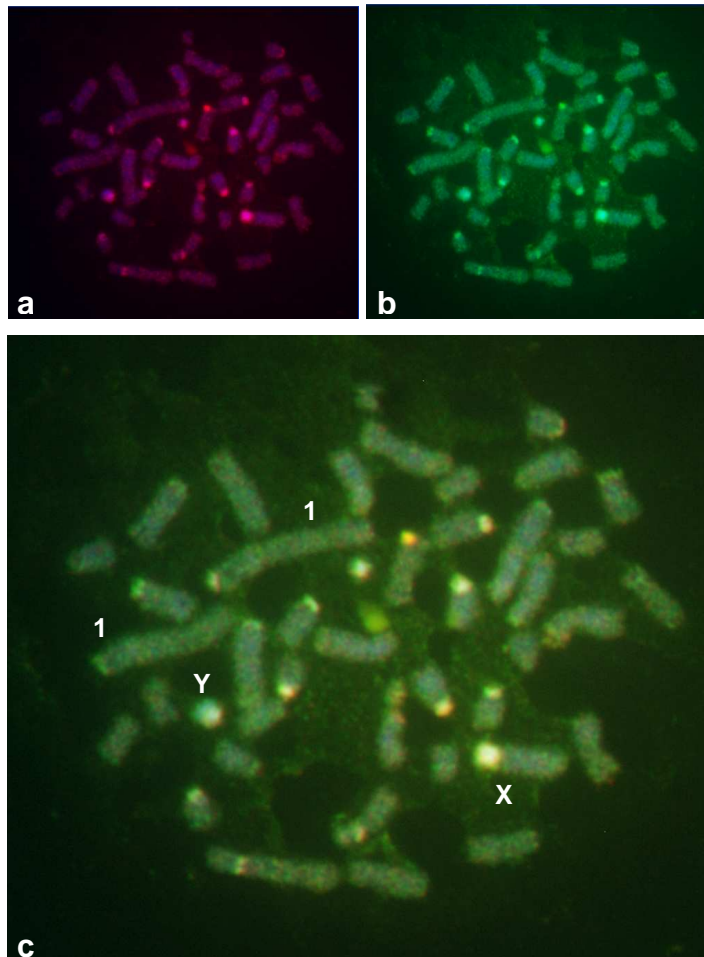


Figura 33. Metáfase de *Rhipidomys* híbrido macho ($2n=44$, $NF=61$) após hibridação *in situ* com DNA genômico total de *R. mastacalis* (a) e do híbrido (b). Em (c) a imagem resultante da sobreposição de (a) e (b). As sondas foram marcadas com digoxigenina e biotina e detectadas com um anticorpo antidigoxigenina acoplado a rodamina (vermelho) e avidina acoplada a FITC (verde), respectivamente. A contra-coloração dos cromossomos foi feita com DAPI.

As sondas representando o genoma completo de *Rhipidomys mastacalis* e do híbrido marcaram totalmente os genomas das espécies de *Rhipidomys* analisadas nesse trabalho: *R. mastacalis*, *R. macrurus*, *R. cariri* e do híbrido, inclusive as regiões heterocromáticas. A hibridação *in situ* do DNA genômico de uma espécie com seus cromossomos deve produzir marcações mais intensas nas regiões de heterocromatina constitutiva devido à presença de DNA repetitivo. Entretanto, quando se hibrida o DNA genômico em cromossomos de uma espécie distinta não é comum a ocorrência de marcações em regiões heterocromáticas que, por serem regiões não codificantes, podem acumular mutações, levando à sua divergência entre as espécies. Trabalhos anteriores usando hibridação *in situ* com DNA genômico total para comparar genomas de espécies aparentadas revelaram que as regiões de heterocromatina constitutiva eram espécie-específicas (De Leo *et. al*, 1999; Svartman e Vianna-Morgante, 1999; Valente e Martins, 2009). No presente trabalho, as marcações nas espécies de *Rhipidomys*, contrariando esses estudos, eram mais evidentes em regiões heterocromáticas de autossomos e dos cromossomos sexuais.

Algumas marcações observadas após hibridação *in situ*, como o par 21 de *Rhipidomys macrurus* fêmea (Figura 27), os cromossomos médios com dois braços com marcação terminal e o cromossomo 3 de *R. mastacalis* (Figura 26a, 28 e 29), podem ser justificadas por repetições de genes ribossômicos, já que essas mesmas regiões apresentaram marcações pelo nitrato de prata.

A marcação intersticial observada no par 1 de *Rhipidomys macrurus*, *R. cariri* e do híbrido e no par 17 de *R. mastacalis* após experimentos de GISH parece coincidir com a observada por Svartman e Almeida (1993) em *R. macrurus* após o bandeamento C. Essa marcação foi sugerida pelas autoras como um possível ponto de quebra resultante de uma inversão pericêntrica, porém pode também ser um vestígio de um centrômero inativo, de um novo centrômero em formação, ou simplesmente de DNA repetitivo fora da região pericentromérica.

A similaridade genômica entre as espécies de *Rhipidomys* evidenciada pelos padrões de bandeamentos e pelos experimentos de GISH pode ser explicada por uma taxa de mutação baixa ou pela separação recente destas espécies. Essa última hipótese também justificaria a presença de híbridos interespecíficos na natureza, uma vez que os indivíduos podem ainda não se reconhecer como espécies distintas, não havendo isolamento reprodutivo pré-zigótico.

É importante destacar que nossos dados de GISH são preliminares. Novos experimentos incluindo a utilização de DNA genômico de *Rhipidomys macrurus*, *R. mastacalis* e *R. cariri* devem fornecer mais detalhes sobre a relação entre os genomas de diferentes espécies de *Rhipidomys*.

O estado de Minas Gerais está localizado entre os paralelos 14°13'58" e 22°54'00" de latitude sul e os meridianos de 39°51'32" e 51°02'35" a oeste de Greenwich, num planalto cuja altitude varia de 100 a 1500 metros. Os climas tropical e tropical de altitude são predominantes em Minas Gerais. Nas regiões sul, sudeste, leste e central do estado são registrados os maiores índices pluviométricos. No outro extremo, nas porções norte e nordeste, as chuvas escassas e as altas temperaturas tornam essas regiões muito susceptíveis à seca. As variadas formas de relevo em Minas Gerais, aliadas aos diferentes solos e climas, propiciam ambientes muito diversos, recobertos por vegetações características, adaptadas a cada um dos ambientes encontrados nos três biomas do estado. O Cerrado, localizado na porção centro-oeste, ocupa cerca de 57% do território de Minas Gerais, a Mata Atlântica, localizada na porção leste, cerca de 41% da área do estado e a Caatinga, restrita ao norte do Estado, ocupa cerca de 2% do território mineiro. Generalizando, encontramos, portanto, Cerrado ao sul e a oeste, região dos campos rupestres no centro e Mata Atlântica no leste, com áreas de transição difíceis de caracterizar, ¹segundo o IEF¹.

Ao que tudo indica, o gênero *Rhipidomys* ocorre em todos os biomas de Minas Gerais e, considerando os pontos amostrados, apresentou uma considerável diversidade cariotípica. Todos os cariótipos registrados para o estado apresentaram o mesmo número de cromossomos, $2n=44$, comum à maioria das espécies de *Rhipidomys*. Os números fundamentais nesses espécimes variaram de 48 à 74, abrangendo dois dos três grupos citogenéticos propostos por Andrades-Miranda *et al.* (2002): *Rhipidomys leucodactylus* ($2n=44$ e NF baixo) e *Rhipidomys mastacalis* ($2n=44$, NF alto). O terceiro grupo, *Rhipidomys nitela*, que reúne táxons que apresentam $2n$ diferente de 44, parece ser exclusivo da região amazônica (norte do Brasil, Venezuela e Guiana Francesa).

O grupo *Rhipidomys mastacalis* se distribui no leste do Brasil abrangendo os estados de Pernambuco, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e, em direção à região central, Minas Gerais e Goiás (Zanchin *et al.*, 1992; Paresque *et al.*, 1994; Tribe, 1996; Andrades-Miranda *et al.*, 2002). O grupo *Rhipidomys leucodactylus* tem uma distribuição mais ampla, ocorrendo em todos os estados brasileiros da região sudeste, quatro estados da região norte, dois dos três estados da região central e na Bahia, além de ocorrer na Venezuela e Colômbia (Aguilera *et al.*, 1994; Andrades-Miranda *et al.*, 2002; Gardner e Patton, 1976; Patton *et al.*, 2000; Pereira e Geise, 2007; Svartman e Almeida, 1993; Tribe, 1996; Zanchin *et al.*, 1992). Um indivíduo com cariótipo intermediário ao desses dois grupos, provavelmente um híbrido interespecífico, foi encontrado na Bahia (Silva e Yonenaga-

¹ <http://www.ief.mg.gov.br>

Yassuda, 1999), estado onde essas duas espécies ocorrem, podendo portanto indicar uma área de simpatria com zona de hibridação.

A variação citogenética presente em parte do grupo *Rhipidomys leucodactylus*, que possui NF=48 a 52 com três pares metacêntricos/submetacêntricos pequenos, é, em grande parte, resultante de rearranjos envolvendo os pares 4 e 10, que são acrocêntricos em alguns cariótipos e subtelocêntricos em outros. Os heteromorfismos encontrados no par 10 e o NF=51 citado para o cariótipo de Mocambinho (Minas Gerais) podem ser consequência do cruzamento entre indivíduos com esses diferentes citótipos (Svartman e Almeida, 1993; Tribe, 1996; este trabalho). A alta frequência destes heteromorfismos observada e a pouca variação relativa entre os citótipos sugerem que indivíduos com diferentes NF podem cruzar e gerar indivíduos férteis e, pelo conceito biológico de espécie, ser considerados da mesma espécie. Um estudo reprodutivo do grupo poderia confirmar essa suposição.

As diferenças de NF observadas em *Rhipidomys mastacalis*, NF=74-80, (Andrades-Miranda *et al.*, 2002; Zanchin *et al.*, 1992) podem ser explicadas por eventos de reposicionamento centromérico (RC). Este rearranjo também pode estar envolvido nas diferenças entre os NF de *R. mastacalis* e os descritos no grupo de *Rhipidomys leucodactylus*, NF=46-52, como sugerido neste trabalho (Patton *et al.*, 2000; Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999). A possibilidade de cruzamentos entre espécies desse dois grupos com cariótipos com NF tão distintos gerando indivíduos viáveis pode ser mais facilmente compreendida se rearranjos do tipo RC explicarem as diferenças de NF. Um provável híbrido entre esses dois grupos de *Rhipidomys* já foi registrado (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1999) e não foram descritos cariótipos de indivíduos com NF intermediário ao NF do híbrido e de uma das espécies dos grupos parentais, o que pode significar que os híbridos resultantes do cruzamento entre os grupos sejam inférteis. O aumento no tamanho amostral e experimentos de cruzamento em laboratório poderiam ajudar a esclarecer os limites taxonômicos entre as espécies de *Rhipidomys*.

Comparando as espécies da tribo Thomasomyini já cariotipadas e com fotos disponíveis na literatura, o número diplóide mais recorrente é 44, que aparece em todos o gêneros e que normalmente está associado a números fundamentais baixos (Aguilera *et al.*, 1994, 2000; Gardner e Patton, 1976; Salazar-Bravo e Yates, 2007). Em *Rhipidomys*, gênero mais basal da tribo (D'Elía *et al.*, 2005), o número diplóide 44 aparece em todas as espécies fazendo-nos supor que provavelmente o cariótipo ancestral possuía 44 cromossomos predominantemente ou em sua totalidade, como o caso de algumas espécies de *Thomasomys* (Aguilera *et al.*, 2000; Gardner e Patton, 1976), acrocêntricos.

Estudos genéticos do gênero *Rhipidomys* são escassos e a ampliação de análises morfológicas, genéticas, ecológicas, taxonômicas e citogenéticas desse táxon, abrangendo um maior número de indivíduos, é necessária para esclarecer melhor a diversidade do grupo

e os limites entre as espécies. Os estudos moleculares já realizados utilizaram uma ou poucas espécies do gênero para esclarecer questões taxonômicas dentro de Sigmodontinae (D'Elía *et al.*, 2003, 2005; Percequillo *et al.*, 2008; Smith e Patton, 1999). Nenhum estudo foi feito para esclarecer os limites específicos desse gênero. Esses limites são alvo de discussões por causa da semelhança morfológica entre os gêneros e da separação baseada em caracteres contínuos que podem ser apenas resultado de variação geográfica.

A citogenética tem auxiliado a esclarecer alguns aspectos das diferenças entre as espécies de *Rhipidomys*, mas a falta de mais estudos, principalmente utilizando técnicas de bandeamento e de citogenética molecular, dificulta o esclarecimento das relações entre diferentes cariótipos.

O mecanismo de RC foi descrito recentemente. Poucos casos de ocorrência desse rearranjo são conhecidos e não se sabe exatamente quais são os mecanismos envolvidos. Ao compararmos o padrão de bandeamento G entre espécies de *Rhipidomys* com NF alto e com NF baixo, não observamos mudanças nos padrões de bandas, o que nos levou a concluir que a explicação mais plausível para as diferenças no NF seria a ocorrência de RC neste gênero. A aparente freqüente ocorrência de reposicionamentos centroméricos em *Rhipidomys* sugere que algum mecanismo possa estar favorecendo este tipo de rearranjo no gênero.

Em outros organismos, o RC foi demonstrado principalmente por experimentos de hibridação *in situ* com seqüências gênicas ou para comparação de regiões genômicas já seqüenciadas (Band *et al.*, 2000; Carbone *et al.*, 2006; Eder *et al.*, 2003; Kasai *et al.*, 2003; Kobayashi, 2008; Montefalcone *et al.*, 1999; Ventura *et al.*, 2004). No caso de *Rhipidomys*, não há disponibilidade no momento de dados moleculares que permitam a realização deste tipo de comparação. Nossos resultados sugerem que um aprofundamento das análises citogenéticas em *Rhipidomys* pode fornecer informações importantes sobre a estrutura e função do genoma de mamíferos.

V. Conclusões

- Estudamos três espécies de *Rhipidomys* de Minas Gerais, *R. macrurus*, *R. mastacalis* e *R. cariri* e híbridos interespecíficos resultantes do cruzamento das duas últimas espécies. Utilizamos técnicas de bandeamento G, C e Ag-RON e hibridação *in situ* com sondas de seqüências teloméricas e DNA genômico total.
- Todas as espécies analisadas apresentaram o mesmo número diplóide, $2n=44$, porém o NF foi bastante variável, NF= 48, 49, 50 e 74. A variação no número de braços cromossômicos entre os cariótipos e a conservação do padrão de bandas sugerem que o principal rearranjo cromossômico envolvido na evolução do gênero sejam reposicionamentos centroméricos (RC).
- As regiões de heterocromatina constitutiva variaram entre os citótipos. Em um dos indivíduos de *R. macrurus* foi encontrada heterocromatina apenas nos cromossomos X, no maior e no menor par autossômico, enquanto no outro indivíduo da espécie e nas outras espécies regiões heterocromáticas apareciam em cerca de metade dos cromossomos, principalmente na região pericentromérica de cromossomos acrocêntricos.
- Os genomas das três espécies foram completamente marcados com as sondas de DNA genômico total de *R. mastacalis* e do híbrido. Uma conservação genômica incomum foi encontrada entre as regiões heterocromáticas das espécies de *Rhipidomys*, sugerindo uma alta semelhança entre os genomas.
- O gênero *Rhipidomys* pode representar um bom modelo para entender melhor o mecanismo do reposicionamento centromérico, fenômeno ainda pouco compreendido.

VI. Referências Bibliográficas

- AGUILERA M, PÉREZ-ZAPATA A, MARTINO A, BARROS MA, PATTON J (1994). Karyosystematics of *Aepomys* and *Rhipidomys* (Rodentia, Cricetidae). *Acta Científica Venezolana*, 45: 247-248.
- AGUILERA M, PÉREZ-ZAPATA A, OCHOA JG, SORIANO P (2000). Karyology of *Aepeomys* and *Thomasomys* (Rodentia: Muridae) from the Venezuelan Andes. *J. Mamm.*, 81(1): 52-58.
- ALLENDORF FW, LEARY RF, SPRUELL P, WENBURG JK (2001). The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.*, 16: 613-622.
- AMOR DJ, BENTLEY K, RYAN J, PERRY J, WONG L, SLATER H, CHOO AKH (2004). Human centromere repositioning "in progress". *PNAS*, 101(17): 6542-6547.
- ANDRADES-MIRANDA J, OLIVEIRA LFB de, LIMA-ROSA CAV, SANA DA, NUNES AP, MATTEVI MS (2002). Genetics studies in representatives of genus *Rhipidomys* (Rodentia, Sigmodontinae) from Brazil. *Acta Theriol.*, 47(2): 125-135.

- FERRERI GC, LISCINSKY DM, MACK JA, ELDRIDGE MDB, O'NEILL JR (2005). Retention of Latent Centromeres in the Mammalian Genome. *Journal of Heredity* 96(3): 217-224.
- FORD CE , HAMERTON J L (1956). A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosome. *Stain Technol.*, 3: 247-251.
- FREITAS TRO (2006) Cytogenetics status of four *Ctenomys* species in the south of Brazil. *Genetica*, 126: 227-235.
- GARAGNA S, BROCCOLI D, REDI CA, SEARLE JB, COOKE HJ, CAPANNA E (1995). Robertsonian metacentrics of house mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. *Chromosoma*, 103: 685-692.
- GARDNER AL, PATTON JL (1976). Karyotypic variation in Oryzomyini rodents (Cricetinae) with comments on chromosomal evolution in the Neotropical cricetinae complex. *Occasional Papers of the Museum of Zoology. Universidade Estadual de Louisiana*, 9: 1-48.
- GEISE L (1995). Os roedores Sigmodontinae (Rodentia, Muridae) do estado do Rio de Janeiro. Sistemática, citogenética, distribuição e variação geográfica. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 389.
- GÓMEZ-LAVERDE M, MONTENEGRO-DÍAZ O, LÓPEZ-ARÉVALO H, CADENA A, BUENO ML (1997). Karyology, Morphology, and Ecology of *Thomasomys laniger* and *T. niveipes* (Rodentia) in Colombia. *J. Mamm.*, 78(4): 1282-1289.
- HONACKI JH, KINMAN KE, KOEPL JW (1982). *Mammals species of the world*. Allen Inc. and the Association of Systematics Collections. Lawrence, Kansas, Estados Unidos da América, 694.
- HOWELL WM, BLACK DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *CMLS*, 36(8): 1014-1015.
- INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS - IEF (2009). Cobertura vegetal de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.ief.mg.gov.br>>. Acesso em: 20 Jan. 2009.
- KASAI F, GARCIA C, ARRUGA MV, FERGUSON-SMITH MA (2003). Chromosome homology between chicken (*Gallus gallus domesticus*) and the red-legged partridge (*Alectoris rufa*); evidence of the occurrence of a neocentromere during evolution. *Cytogenet Genome Res.*, 102: 326-330.
- KING M (1993). *Species Evolution: The Role of Chromosomal Change*. Cambridge University Press: Cambridge, 358.
- KOBAYASHI T, YAMADA F, HASHIMOTO T, ABE S, MATSUDA Y, KUROIWA A (2008). Centromere repositioning in the X chromosome of XO/XO mammals, Ryukyu spiny rat. *Chromosome Res.*, 16 (4): 587-593.
- MONTEFALCONE G, TEMPESTA S, ROCCHI M, ARCHIDIACONO N (1999). Centromere Repositioning. *Genome Res.*, 9: 1184-1188
- MUSSER GG, CARLETON MD (1993). Family Muridae. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*, Smithsonian Press, Washington, 501-755.
- MUSSER GG, CARLETON MD (2005). Family Muridae. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 2ed, Smithsonian Press, Washington.
- MYERS P (2000). Rodentia (online), *Animal Diversity Web*. Disponível em: <<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rodentia.html>>. Acessado em: 21/10/07.
- NANDA I, SCHNEIDER-RASP S, WINKING H, SCHMID M (1995). Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia, Muridae) during Robertsonian rearrangements. *Chromosome Res.*, 3: 399-409.

- NOWAK RM (1991). Walker's Mammals of the World. 5ed, v2, John Hopkins University, Baltimore/London, 1614.
- NOWAK RM (1999). Walker's Mammals of the World. 6ed, John Hopkins University, Baltimore/London, 328.
- O'NEILL RJW, O'NEILL MJ, GRAVES JAM (1998). Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in an interspecific mammalian hybrid. *Nature*, 393: 68-72.
- PARESQUE R, SOUZA WP, MENDES S, FAGUNDES V (2004). Composição cariotípica da fauna de roedores e marsupiais de duas áreas de Mata Atlântica do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, 17: 5-33.
- PATTON JL, DA SILVA MNF, MALCOLM RJ (2000). Mammals of Rio Juruá, Western Amazonian Brazil: Evolutionary and Ecological Diversification. *Bulletin American Museum Natural History*, 244.
- PERCEQUILLO AR, GONÇALVES PR, DE OLIVEIRA JA (2004). The rediscovery of *Rhagomys rufescens* (Thomas, 1886), with a morphological redescription and comments on its systematic relationships based on morphological and molecular (cytochrome b) characters. *Mamm. Biol.* 69 (4) 238-257.
- PEREIRA LG, GEISE L (2007). Karyotype composition of some rodents and marsupials from Chapada Diamantina (Bahia, Brasil). *Braz J. Biol.*, 67(3):509-518.
- REIG OA (1986). Diversity patterns and differentiation of high Andean rodents. *High Altitude Tropical Biogeography*, F. Vuilleumier and M. Monasterio, eds., Oxford University Press, London, 404-439.
- REIS NR, PERACCHI AL, PEDRO WA, LIMA IP (2006). *Mamíferos do Brasil*. Universidade Estadual de Londrina, 437.
- ROEMER I, GRÜTZNER F, WINKING H, HAAF T, ORTH A, SKIDMORE L, ANTCZAK D, FUNDELE, R (1999). Global methylation in eutherian hybrids. *Nature*, 401: 131-132.
- SALAZAR-BRAVO J, YATES TL (2007). A New Species of *Thomasomys* (Cricetidae: Sigmodontinae) from Central Bolivia. *The Quintessential Naturalist: Honoring the Life and Legacy of Oliver P. Pearson*, 747-774. University of California Publications in Zoology 134:1-981.
- SAMBROOK J, RUSSELL CW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY
- SEABRIGHT M (1971) A rapid technique for human chromosomes. *Lancet*, 2: 971-972.
- SILVA MJJ, YONENAGA-YASSUDA Y (1997). New karyotypes of two related species of *Oligoryzomys* genus (Cricetidae, Rodentia) involving centric fusion with loss of NORs and distribution telomeric (TTAGGG)_n sequences. *Hereditas*, 127: 217-229.
- SILVA MJJ, YONENAGA-YASSUDA Y (1998). Heterogeneity and meiotic behaviour of B and sex chromosomes, banding patterns and localization of (TTAGGG)_n sequences by FISH, in the Neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). *Chromosome Res.*, 6: 455-462.
- SILVA MJJ, YONENAGA-YASSUDA Y (1999). Autosomal and sex chromosomal polymorphisms with multiple rearrangements and a new karyotype in the genus *Rhipidomys* (Sigmodontinae, Rodentia). *Hereditas*, 131: 211-220.
- SMITH GR (1992) Introgression in fishes – significance for paleontology, cladistics, and evolutionary rates. *Syst. Biol.*, 41: 41–57.

- SMITH M, PATTON JL (1999). Phylogenetics Relationships and the Radiation of Sigmodontinae Rodents in South America: Evidence from Cytochrome b. *J. Mamm. Evol.*, 6(2): 89-128.
- SUMNER AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. *Exp. Cell Res.*, 75: 305-306.
- SUMNER AT (2003) Chromosomes- Organization and Function. Blackwell Science. Malden, MA. 133-142.
- SVARTMAN M, ALMEIDA EJC de (1993). Pericentric inversion and X chromosome polymorphism in *Rhipidomys* sp. (Cricetidae, Rodentia) from Brazil. *Caryologia*, 46(2-3): 219-225.
- SVARTMAN M, VIANNA-MORGANTE AM (1999). Comparative genome analysis in American marsupials: chromosome banding and *in-situ* hybridization. *Chromosome Res.*, 7: 267-275.
- TRIBE CJ (1996). The Neotropical rodent genus *Rhipidomys* (Cricetidae, Sigmodontinae) – a taxonomic revision. Tese de Doutorado. University College London, Londres, Inglaterra, 316.
- VALENTE GT, MARTINS C (2009). Citogenética Comparativa de Peixes Ciclídeos por Meio de Hibridização in situ Genômica (GISH) com Ênfase em *Oreochromis Niloticus*. Tese de Mestrado. UNESP, São Paulo.
- TRIBE CJ (2005). A new species of *Rhipidomys* (Rodentia, Muroidea) from north-eastern Brazil. *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, 63 (1): 131-146.
- VENTURA M, ARCHIDIACONO N, ROCCHI M (2001.) Centromere Emergence in Evolution *Genome Res.*, 11: 595-599
- VENTURA M, WEIGL S, CARBONE L, CARDONE MF, MISCEO D, TETI M, D'ADDABBO P, WANDALL A, BJÖRCK E, DE JONG PJ, SHE X, EICHLER EE, ARCHIDIACONO N, ROCCHI M (2004). Recurrent Sites for New Centromere Seeding Genome. *Res.* 14: 1696-1703.
- VERLINSKY Y, GINSBERG N, CHMURA M, FREIDINE M, WHITE M, STROM C, KULIEV A (1995). Cross-hybridization of the chromosome 13/21 _ satellite DNA probe to chromosome 22 in the prenatal screening of common chromosomal aneuploidies by FISH. *Prenat. Diagn.* 15: 831-834.
- VOLOBOUEV VT, CATZEFLIS FM (2000). Chromosome banding analysis (G-, R- and C-bands) of *Rhipidomys nitela* and a review of the cytogenetics of *Rhipidomys* (Rodentia, Sigmodontinae). *Mammalia*, 64(3): 353-360.
- VOSS RS, LINZEY AV (1981). Comparative gross morphology of male accessory glands among Neotropical Muridae (Mammalia: Rodentia) with comments on systematic implications. *Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan.* 159:1-41.
- VOULLAIRE LE, SLATER HR, PETROVIC V, CHOO KH (1993). A functional marker centromere with no detectable alpha-satellite, satellite III, or CENP-B protein: activation of a latent centromere? *Am. J. Hum. Genet.*, 52: 1153-1163.
- ZANCHIN NIT, LANGGUTH A, MATTEVI MS (1992). Karyotypes of Brazilian species of *Rhipidomys* (Rodentia, Cricetidae). *J. Mammal.*, 73(1): 120-122.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)