

PEDRO HENRIQUE FONSECA RABELO

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE *Thrichomys apereoides* (LUND, 1839) E
Kannabateomys amblyonyx (WAGNER, 1845) (RODENTIA:
ECHIMYIDAE) PROVENIENTES DO ESTADO DE MINAS GERAIS,
BRASIL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R114a
2015 Rabelo, Pedro Henrique Fonseca, 1990-
Análise citogenética de *Thrichomys apereoides* (Lund, 1839) e *Kannabateomys amblyonyx* (Wagner, 1845) (Rodentia, Echimyidae) provenientes do Estado de Minas Gerais, Brasil / Pedro Henrique Fonseca Rabelo. – Viçosa, MG, 2015.

ix, 49f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Gisele Mendes Lessa Del Giúdice.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Roedores. 2. Citogenética. 3. *Thrichomys apereoides*.
4. *Kannabateomys amblyonyx*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 599.35

PEDRO HENRIQUE FONSECA RABELO

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE *Thrichomys apereoides* (LUND, 1839) E
Kannabateomys amblyonyx (WAGNER, 1845) (RODENTIA:
ECHIMYIDAE) PROVENIENTES DO ESTADO DE MINAS GERAIS,
BRASIL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de OUTUBRO de 2015.

Marta Svartman

Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Coorientador)

Gisele Mendes Lessa Del Giúdice
(Orientador)

Ao meu pai, Vicente, que com certeza está torcendo
por mim, esteja onde estiver.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Telma, e meu irmão, João, pela torcida e apoio até o fim dessa etapa.

Ao meu pai, Vicente, que, mesmo não estando mais entre nós, foi importante para minha formação pessoal e profissional.

Ao professor Jorge, que me aceitou de braços abertos como novo marujo no Beagle.

A todos os marujos do Beagle, em especial ao Ighor, Marina e Silvana, que me acompanharam nos primeiros passos da citogenética.

A todos os moojenianos, em especial ao laboratório de mastozoologia, que, mesmo eu mudando de área, sempre me deram suporte e me acompanharam nos bons e maus momentos. LabMasto sempre estará no meu coração.

À Natalia, Leo e ao Fabiano pelas amostras utilizadas no experimento.

Aos funcionários do Parque Estadual do Sumidouro, pelo apoio.

Ao Marquito pelos mapas.

À professora Gisele, que desde a minha formatura confiou em mim e me aceitou para este novo desafio.

À banca pela disponibilidade e correções.

A todas as pessoas que apareceram na minha vida, sejam de Viçosa ou não, sejam recentes ou não, que com certeza contribuíram para formar a pessoa que eu sou hoje.

Aos membros da república “Um dia a casa cai”, minha segunda família em Viçosa, pelos ótimos momentos juntos.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À TODOS VOCÊS O MEU MUITO OBRIGADO!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2. OBJETIVOS.....	09
2.1. OBJETIVO GERAL.....	09
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	09
3. ARTIGO I.....	10
4. ARTIGO II.....	29
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	49

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL:

Figura 1- A) *Thrichomys apereoides* fotografado na região de Lagoa Santa (MG) (Foto: Camilo A. Gonzáles). B) *Kannabateomys amblyonyx* fotografado em Cataguases (Foto: Fabiano A. Aguiar).....04

ARTIGO I:

Figura 1 – A) Mapa de distribuição do gênero *Thrichomys* no Brasil. **Asterisco** – *Thrichomys fosteri*, **Hexágono** – *Thrichomys pachyurus*, **Círculo preto** – *Thrichomys inermis*, **Círculo branco** – *Thrichomys apereoides* (BRAGGIO e BONVICINO, 2004); **Quadrado** – *Thrichomys laurentius* (BONVICINO et al., 2002); **Estrela** – *Thrichomys apereoides* de Lagoa Santa (presente estudo). b) Árvore de máxima parcimônia proposta por Braggio e Bonvicino (2004), mostrando as relações filogenéticas entre as espécies de *Thrichomys*.....14.

Figura 2 – Cariótipo de fêmea de *Thrichomys apereoides* ($2n=28$) (MZUFV 3997) proveniente de Lagoa Santa (MG), com presença de constrição secundária no par cromossômico 2. Par sexual do macho acrescentado (MZUFV 4003).....15

Figura 3 – Cariótipo de macho de *Thrichomys apereoides* (MZUFV 4004) tratado com a técnica de Banda C, mostrando regiões heterocromáticas.....16

Figura 4 – Cariótipo de fêmea de *Thrichomys apereoides* (MZUFV 3995) submetido ao processo de impregnação por nitrato de prata (Ag-NOR). Região organizadora de nucléolo presente na constrição secundária no par cromossômico 2.....16

Figura 5 – Cariótipo de macho de *Thrichomys apereoides* (MZUFV 4004) após o FISH usando a sonda GA₍₁₅₎.....17

Figura 6 - Cariótipo de macho de *Thrichomys apereoides* (MZUFV 4208) tratado com a sonda GAG₍₁₀₎.....17

Figura 7 – Cariótipo de fêmea de *Thichomys apereoides* (MZUFV 3994) tratado com a sonda CGG₍₁₀₎.....18

ARTIGO II:

Figura 1 – A) Mapa de distribuição de *Kannabateomys amblyonyx* no Brasil. Localidades de coleta: 1-Viçosa, 2-Leopoldina. B) Filograma adaptado de GALEWSKI (2005) mostrando as relações filogenéticas dentro da família Echimyidae com valores de números diplóides e fundamentais quando disponíveis na literatura: *D. dactylinus* e *L. emiliae* (ANISKIN, 1993), *D. boliviensis* (DUNNUM, 2001), *I. pagurus* e *I. bistriata* (BONVICINO et al., 2003), *M. didelphoides* (LIMA et al., 1998), *P. blainvilli* (LEITE et al., 2008), *K. amblyonyx* (presente estudo), *Proechimys* (E SILVA et al., 2012), *Thrichomys apereoides* (ARTIGO I), *Myocastor coypus* (GONZALES E BRUMZORRILA, 1995), *Trinomys* (CORRÊA et al., 2005), *Clyomys laticeps* (BEZERRA et al., 2012) . A seta representa o ramo dos equimídeos arborícolas.....33

Figura 2 – Cariótipo de fêmea de *Kannabateomys amblyonyx* (2n=98) (MZUFV 4228). Par sexual do macho acrescentado (MZUFV 4229).....35

Figura 3 – Cariótipo de macho de *Kannabateomys amblyonyx* (MZUFV 4229) após bandeamento C, evidenciando as regiões heterocromáticas.....35

Figura 4 – Cariótipo de macho de *Kannabateomys amblyonyx* (MZUFV 4229) submetido à técnica Ag-NOR. Regiões organizadoras de nucléolo presentes no par 8 metacêntrico.....36

Figura 5 – Cariótipo de fêmea de *Kannabateomys amblyonyx* (MZUFV 4228) após FISH com a sonda GA₍₁₅₎.....37

Figura 6 – Cariótipo de fêmea de *Kannabateomys amblyonyx* (MZUFV 4228) após FISH com a sonda CA₍₁₅₎.....37

Figura 7 – Cariótipo de fêmea de <i>Kannabateomys amblyonyx</i> (MZUFV 4228) após FISH com a sonda CAA ₍₁₀₎	38
---	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I:

Tabela 1 – Lista de espécimes analisados e depositados no Museu de Zoologia João Moojen (MZUFV)	13
--	----

ARTIGO II:

Tabela 1 -Lista de espécimes de <i>Kannabateomys amblyonyx</i> analisados e depositados no Museu de Zoologia João Moojen (MZUFV)	32
---	----

RESUMO

RABELO, Pedro Henrique Fonseca, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2015. **ANÁLISE CITOGENÉTICA DE *Thrichomys apereoides* (LUND, 1839) E *Kannabateomys amblyonyx* (WAGNER, 1845) provenientes do estado de Minas Gerais, BRASIL.** Orientadora: Gisele Mendes Lessa Del Giúdice. Coorientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

A família Echimyidae é uma das famílias de maior diversidade taxonômica, morfológica e ecológica dentre os roedores, com 20 gêneros e 90 espécies válidas. Os roedores possuem alta variabilidade cariotípica, permitindo que os dados citogenéticos contribuam com a descoberta de novas espécies ou de grupos de espécies mais aparentadas, além de permitirem estudos de variação geográfica intra-específicos. O seguinte trabalho teve como objetivo realizar o estudo citogenético em *Kannabateomys amblyonyx* (N=2) em Minas Gerais e a descrição cariotípica da população de *Thrichomys apereoides* (N=10) coletado em Lagoa Santa (MG). Foram realizadas as técnicas de coloração com Giemsa, bandeamento CBG, Ag-NOR e hibridizações *in situ* (FISH) com sondas de DNAs repetitivos microssatélites GA₍₁₅₎, CA₍₁₅₎ e CAA₍₁₀₎ em *K. amblyonyx* e GA₍₁₅₎, CGG₍₁₀₎ e GAG₍₁₀₎ em *T. apereoides*. *Kannabateomys amblyonyx* apresentou 2n=98 cromossomos, com 13 pares metacêntricos, 2 submetacêntricos e 33 acrocêntricos, X metacêntrico e Y acrocêntrico. *Thrichomys apereoides* apresentou 2n=28, com 11 pares de metacêntricos, 1 submetacêntrico, 1 acrocêntrico, X acrocêntrico e Y submetacêntrico. A Ag-NOR apresentou marcação telomérica no par 8 em *K. amblyonyx* e na constrição secundária do par 2 em *T. apereoides*. O bandeamento CBG apresentou padrões de heterocromatina nas regiões pericentroméricas dos autosomos e o Y totalmente heterocromático em ambas as espécies, marcação pericentromérica no cromossomo X de *K. amblyonyx* e intersticial em *T. apereoides*. Todas as sondas de DNA microssatélite se acumularam em regiões intersticiais em diferentes pares cromossômicos em *K. amblyonyx*, enquanto *T. apereoides* apresentou padrões geralmente associados às regiões heterocromáticas. Os resultados ampliaram o conhecimento citogenético das citadas espécies, com rearranjos como fusões/fissões e inversões sendo importantes nas mudanças cariotípicas de ambas as espécies. A adição de novas técnicas de bandeamento e hibridização permitiu comparações citogenéticas com grupos mais próximos, definindo os caminhos da evolução cromossômica de ambas as espécies.

ABSTRACT

RABELO, Pedro Henrique Fonseca, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2015. **ANÁLISE CITOGENÉTICA DE *Thrichomys apereoides* (LUND, 1839) E *Kannabateomys amblyonyx* (WAGNER, 1845) provenientes do estado de Minas Gerais, BRASIL.** Adviser: Gisele Mendes Lessa Del Giúdice. Co-adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

The Echimyidae family is one of the families with largest taxonomic, morphological and ecological diversity among rodents, with 20 genera and 90 valid species. Rodents have a high variable karyotypes, so cytogenetic data contribute to the discovery of new species or more groups of related species, as well as allowing specific study of intra-geographic variation. The following study conducted the cytogenetic study of *Kannabateomys amblyonyx* (N = 2) in Minas Gerais and the karyotype description of the population of *Thrichomys apereoides* (N = 10) collected in Lagoa Santa (Minas Gerais), its type locality. The techniques performed were Giemsa staining, CBG banding, Ag-NOR and in situ hybridization (FISH) with microsatellite repetitive DNA probes GA₍₁₅₎, CA₍₁₅₎ and CAA₍₁₀₎ in *K. amblyonyx* and GA₍₁₅₎, CGG₍₁₀₎ and GAG₍₁₀₎ in *T. apereoides*. *Kannabateomys amblyonyx* presented 2n = 98 chromosomes, with 13 metacentric pairs, 2 submetacentric and 33 acrocentric, metacentric X and Y acrocentric. *Thrichomys apereoides* presented 2n = 28, with 11 pairs of metacentric, 1 submetacentric, 1 telocentric, acrocentric X and Y submetacentric. The Ag-NOR presented telomeric marking at the pair 8 in *K. amblyonyx* and on the secondary constriction on pair 2 in *T. apereoides*. The CBG banding patterns showed heterochromatin in the pericentromeric regions of autosomes and the Y totally heterochromatic in both species, pericentromeric marking on chromosome X in *K. amblyonyx* and interstitial in *T. apereoides*. All microsatellite DNA probes have built up in interstitial regions in different chromosome pairs in *K. amblyonyx* while *T. apereoides* presented repetitive DNA patterns usually associated with heterochromatic regions. The results expanded the cytogenetic knowledge of the above species with rearrangements, such as fusions/fissions and inversions, important factors on karyotype changes in the evolution of both species. The addition of new techniques of banding and hybridization allowed cytogenetic comparisons with nearby groups, defining the ways of chromosomal evolution of both species.

1. INTRODUÇÃO GERAL:

Os pequenos mamíferos não-voadores, representados pelos roedores e marsupiais presentes nas ordens Rodentia e Didelphimorphia, respectivamente, são animais cujos adultos pesam em média menos que 1 kg. Os pequenos mamíferos não-voadores são um grupo extremamente diversificado, com 293 espécies descritas para o Brasil, representando 41,43% do total de mamíferos no território nacional (REIS et al., 2011). Dentre estes, os roedores são o táxon com maior número de espécies viventes, com aproximadamente 74 gêneros e 236 espécies no país (BONVICINO e OLIVEIRA, 2008; REIS et al., 2011).

A família Echimyidae, composta pelos ratos-de-espinho terrestres e arborícolas, ratos-corós e ratos-do-bambu, é uma das famílias com maior diversidade taxonômica, morfológica e ecológica dentre os roedores, com aproximadamente 20 gêneros e 90 espécies (GALEWSKI et al., 2005; LARA et al., 1996; LEITE e PATTON, 2002). O monofiletismo da família é bem suportado, porém ainda existem controvérsias em relação ao parentesco filogenético dos táxons superiores (LEITE e PATTON, 2002). WOODS (1993) dividiu o grupo em quatro subfamílias viventes (Dactylomyinae, Echimyinae, Eumysopinae e Chaetomyinae), porém MARTIN(1994), a partir de análises de estrutura do esmalte dentário, excluiu o gênero *Chaetomys* (Chaetomyinae), incluindo-o na família Erethizontidae, e análises filogenéticas (FABRE et al., 2012; GALEWSKI et al., 2005; LEITE e PATTON, 2002) suportam a inclusão de *Myocastor* (Myocastoridae) e *Capromys* (Capromyidae) dentro de Echimyidae.

O gênero *Thrichomys* foi considerado por muito tempo um grupo monoespecífico, sendo *T. apereoides* sua única espécie (WOODS, 1993). Porém, com base em estudos morfométricos, citogenéticos e moleculares, novas espécies foram propostas: *T. pachyurus*, *T. laurentius*, *T. inermis*, *Thrichomys fosteri* e *T. apereoides* (BONVICINO et al., 2002; BORODIN et al., 2006; BRAGGIO e BONVICINO, 2004; DOS REIS e PESSÔA, 2004; PESSÔA et al., 2004, NASCIMENTO et al., 2013). *Thrichomys fosteri* ocorre nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, *T. laurentius* na região nordeste brasileira, do estado do Ceará ao da Bahia, *T. inermis* do estado da Bahia até Tocantins e *Thrichomys pachyurus* nos estados de Tocantins, Goiás e Distrito Federal (BONVICINO e OLIVEIRA, 2008, NASCIMENTO et al., 2013).

Thrichomys apereoides (Lund, 1839) (Figura 1A) é encontrado nos estados de Minas Gerais, Goiás e Bahia e tem como localidade tipo a cidade de Lagoa Santa (MG).

Possui tamanho médio a grande, cauda menor que o tamanho do corpo, uma pelagem cinzenta na região dorsal e branca na região ventral, com a presença de um anel de pelos brancos em volta dos olhos. São animais terrestres, crepusculares e que possuem uma dieta bem diversificada, sendo encontrados principalmente em regiões de Cerrado, Caatinga e Pantanal (BONVICINO e OLIVEIRA, 2008; REIS et al., 2011).

Kannabateomys amblyonyx (Wagner, 1845) (Figura 1B), inserido na subfamília Dactylomyinae, distribuiu-se do Espírito Santo ao Rio Grande do Sul (BONVICINO e OLIVEIRA, 2008), com registros atuais em Minas Gerais (SILVA et al., 2012), tendo como localidade tipo a cidade de Ipanema (SP) (REIS et al., 2011). Possui tamanho grande, cauda maior que o comprimento do corpo e pelagem ferrugínea. São animais endêmicos da Mata Atlântica, arborícolas e com hábitos de vida e alimentares bem específicos, estando sempre associados a plantações de bambu nativas ou exóticas, associadas à mata nativa. São animais principalmente noturnos, porém, também há registros de atividades durante o dia (SARTI et al., 2012).

WAGNER (1845) descreveu a espécie *Dactylomys amblyonyx* a partir de crânios coletados pelo naturalista austríaco Johann Natterer (1787-1843) em sua passagem pela cidade de Ipanema (SP) entre os anos de 1820 e 1824, porém JENTINK (1891), a partir de dados dentários, fez uma revisão da espécie *D. amblyonyx*, criando um novo gênero, sendo este *Kannabateomys*. Até o momento não existem estudos populacionais desta espécie, provavelmente devido ao fato ser pouco representada em coleções zoológicas por ser de difícil coleta (AGUIAR, 2014).

Mesmo sendo um grupo bastante estudado, a taxonomia de pequenos mamíferos não-voadores é bem complexa devido à alta similaridade entre os táxons (REIS et al., 2011). Assim, estudos morfológicos, citogenéticos e moleculares podem ser informativos sobre os padrões taxonômicos, ecológicos, evolutivos e distribucionais de roedores e marsupiais. Análises citogenéticas têm se mostrado eficazes no estudo de mamíferos, já que alguns grupos caracterizam-se por apresentar amplas variações cromossômicas (PEREIRA e GEISE, 2007). Em Echimyidae, muitos trabalhos de citogenética visam descrições de novos cariótipos e de novas espécies, com o número diplóide e fundamental sendo utilizados, muitas vezes, como marcadores taxonômicos (ARAÚJO et al., 2013; BEZERRA et al., 2012; BONVICINO et al., 2002; CORRÊA et al., 2005; PESSÓA et al., 2004).

A partir da década de 70, a citogenética clássica tem sido uma ferramenta imprescindível no estudo de mamíferos e outros vertebrados. A partir de técnicas de

bandeamento, foi possível identificar regiões específicas, como aquelas ricas em heterocromatina constitutiva (Bandas CBG) (SUMNER, 1972) ou organizadoras de nucléolo a partir de nitrato de prata (Ag-NOR) (HOWELL e BLACK, 1980), sendo importantes na identificação de diferentes citótipos entre as espécies (YONENAGA-YASSUDA, 2005). O nascimento da citogenética molecular, a partir da década de 80, revolucionou os estudos citogenéticos nos seres vivos, pois permitiu que os cromossomos fossem isolados, purificados e fracionados em seus componentes moleculares, podendo ser então sequenciados e clonados (YONENAGA-YASSUDA, 2005).

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (PINKEL, 1986) permitiu a localização de sequências de DNA específicas nos cromossomos, associando dados moleculares a dados citogenéticos (DI-NIZO, 2013). A técnica se baseia na desnaturação do DNA-alvo e a hibridização de sondas fluorescentes de DNA ou RNA, que são complementares a regiões específicas nos diferentes cromossomos metafásicos ou interfásicos (GUERRA, 2005). Diferentes tipos de sondas fluorescentes podem ser criadas e utilizadas na FISH: sondas de sequências únicas de DNA, como genes; sondas de DNA repetitivo disperso; sondas cromossômicas, utilizadas em técnicas de pintura; sondas genômicas de sequências grandes e repetitivas; sondas de DNAs repetitivos em *tandem*, como as centroméricas, teloméricas e de DNA ribossômico; entre outras (GUERRA, 2005). Atualmente, a hibridização *in situ* tem sido utilizada em conjunto com técnicas de citogenética clássica, visando entender os processos de evolução cromossômica, responsáveis pelas diferenças cariotípicas encontradas entre as espécies.

Em relação às espécies analisadas neste trabalho, os estudos de citogenética e da biologia molecular são ainda escassos. Em *Thrichomys apereoides* há registros de cariótipos e técnicas como Banda C e Ag-NOR na literatura (BONVICINO et al., 2002; PESSÔA et al., 2004), porém não existem estudos citogenéticos nas populações que ocorrem na região de Lagoa Santa, sua localidade tipo. Ainda não existem estudos citogenéticos mais elaborados em *Kannabateomys amblyonyx* (FAGUNDES et al., 2001; PARESQUE et al., 2004), com a maioria dos estudos nesta espécie referindo-se a características ecológicas, comportamentais e distribucionais desses indivíduos (AGUIAR, 2013; SARTI et al., 2012; SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2008). Sendo assim, faz-se necessário o estudo citogenético clássico e molecular de ambas as espécies, visando o melhor entendimento dos padrões cariotípicos de *T. apereoides* e *K.*

amblyonyx e das relações filogenéticas destas duas espécies dentro da família Echimyidae.

A)



B)



Figura 1- A) *Thrichomys apereoides* fotografado na região de Lagoa Santa (MG) (Foto: Camilo A. Gonzáles). B) *Kannabateomys amblyonyx* fotografado em Cataguases (Foto: Fabiano A. Aguiar).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AGUIAR, F. 2014. Estudo das variações intra e interpopulacional em caracteres cranianos de *Kannabateomys amblyonyx* (WAGNER, 1845) (Rodentia:Echimyidae). **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

AGUIAR, F.; QUINTELA, F. M.; GONZÁLEZ, C. A. & LESSA, G. 2013. Redescoberta de *Kannabateomys amblyonyx* (Wagner, 1845) em sua localidade tipo e revisão sobre a distribuição geográfica. Anais do XI Congresso de Ecologia do Brasil, Porto Seguro, BA.

ARAÚJO, N. P. DE et al. 2013. New karyotypes of Atlantic tree rats, genus *Phyllomys* (Echimyidae, Rodentia). **Genome**, v. 8, p. 1–8.

BEZERRA, A. M. R. et al. 2012. A new karyotype for the spiny rat *Clyomys laticeps* (Thomas, 1909) (Rodentia, Echimyidae) from Central Brazil. **Comparative Cytogenetics**, v. 6, n. 2, p. 153–161.

BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A DE. 2008. **Guia dos roedores do Brasil , com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, v. 15, 120 p.

BONVICINO, C. R.; OTAZU, I. B.; D´ANDREA, P. S. 2002. Karyologic evidence of diversification of the genus *Thrichomys* (Rodentia, Echimyidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 97, n. 3-4, p. 200–204.

BORODIN, P. M. et al. 2006. Reproductive isolation due to the genetic incompatibilities between *Thrichomys pachyurus* and two subspecies of *Thrichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). **Genome / National Research Council Canada**, v. 49, n. 2, p. 159–167.

BRAGGIO, E.; BONVICINO, C. R. 2004. Molecular Divergence in the genus *Thrichomys* (Rodentia, Echimyidae). **Journal of Mammalogy**, v. 85, n. 2, p. 316-320.

CORRÊA, M. M. O. et al. 2005. The Karyotypes of *Trinomys moojeni* (Pessoa, Oliveira & Reis 1992) and the *Trinomys setosus elegans* (Lund, 1842) (Rodentia, Echimyidae) from Minas Gerais, eastern Brazil. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 63, n. 1, p. 169–174.

DI-NIZO, C. B. 2012. Citotaxonomia e evolução cromossômica em *Oligoryzomys* (Rodentia, Sigmodontinae). **Dissertação (Mestrado)**. USP, Instituto Butantan, IPT, São Paulo.

FAGUNDES, V.; MENDES, S. L.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 2001. Descrição do cariótipo do rato da taquara (*Kannabateomys amblyonyx*) do Espírito Santo com $2n=98$: o maior número diplóide de um roedor brasileiro. In: 47 Congresso Nacional de Genética, 2001, Águas de Lindóia. Anais do 47 Congresso Nacional de Genética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, v. 1. p. 580-580.

GALEWSKI, T. et al. 2005. Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): A phylogenetic and chronological approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 34, n. 3, p. 601–615.

GUERRA, M. 2005. Hibridização in situ: Princípios Básicos. **In: FISH, Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p 1-32.

HOWELL W. M.; BLACK, D. A. 1980. Controlled silver staining of nucleolusorganizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 439, n. 36, p. 1014-1015.

JENTINK, F. A. 1891. On *Dactylomys dactylinus* and *Kannabateomys amblyonyx*. Notes from the Leyden Museum, Leyden 8: 105-111.

LARA, M. C.; PATTON, J. L.; DA SILVA, M. N. 1996. The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 5, n. 2, p. 403–413.

LEITE, Y. L. R.; PATTON, J. L. 2002. Evolution of South American spiny rats (Rodentia, Echimyidae): the star-phylogeny hypothesis revisited. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, p. 455–464.

MARTIN, T. 1994. On the systematic position of *Chaetomys subspinosus* (Rodentia: Caviomorpha) based on evidence from the incisor enamel microstructure. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 2, n. 2, p. 117–131.

PARESQUE, R.; SOUZA, W. P.; MENDES, S. L.; 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**, v. 17, p. 5-33.

PEREIRA, L.; GEISE, L. 2007. Karyotype composition of some rodents and marsupials from Chapada Diamantina (Bahia, Brasil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 3, p. 509–518.

PESSÓA, L. M.; DE OLIVEIRA, J. A.; LOPES, M. O. G. 2004. Karyological and morphometric variation in the genus *Thrichomys* (Rodentia: Echimyidae). **Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde**, v. 69, n. 4, p. 258–269.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 2934-2938.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A. & LIMA, I. P. 2011. **Mamíferos do Brasil**. 2 ed, Londrina: Nélío R. dos Reis, 441 p.

SARTI, P. T.; SILVA, R. B.; VIEIRA, E. M. 2012. Daily activity patterns of the Atlantic bamboo rat (*Kannabateomys amblyonyx*) in southern Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 7, n. 2, p. 108–113.

SILVA, F. A. DA et al. 2012. Distribuição e conservação do rato-do-bambu *Kannabateomys amblyonyx* (Rodentia, Echimyidae) no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 7, n. 1, p. 21–25.

SILVA, R. B.; VIEIRA, E. M.; IZAR, P. 2008. Social monogamy and biparental care of the Neotropical southern bamboo rat (*Kannabateomys amblyonyx*). **Journal of Mammalogy**, v. 89, n. 6, p. 1464–1472.

SUMNER A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 604-306.

WOODS, C.A. 1993. Suborder Hystricognathi. **Mammals Species of the World. A taxonomic and geographic reference**. 2 ed, Editado por D.E. WILSON E D.M. REEDER. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. p. 771–806.

YONENAGA-YASSUDA, Y. 2005. Contribuição da FISH à citogenética de mamíferos e répteis. **In: FISH, Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p 89-114.

2. OBJETIVOS:

2.1. OBJETIVO GERAL:

Este trabalho tem como objetivo a caracterização citogenética de populações de *Thrichomys apereoides* e *Kannabateomys amblyonyx* provenientes do estado de Minas Gerais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a. Caracterização cariotípica de *Thrichomys apereoides* e *Kannabateomys amblyonyx*.
- b. Caracterização dos padrões cromossômicos obtidos com astécnicas de coloração tradicional com Giemsa, banda CBG, Ag-NOR e FISH com sondas de DNA microssatélite.
- c. Comparar os resultados com os padrões citogenéticos de espécies aparentadas.

3. ARTIGO I:

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE *Thrichomys apereoides* (LUND, 1839) (RODENTIA, ECHIMYIDAE) PROVENIENTES DE LAGOA SANTA, ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL.

Pedro Henrique Fonseca Rabelo, Jorge Abdala Dergam e Gisele Lessa

Laboratório de Sistemática Molecular – Beagle, Departamento de Biologia Animal, 174
Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO:

Os roedores possuem uma alta variabilidade cariotípica, permitindo que os dados citogenéticos contribuam com a descoberta de novas espécies ou de grupos de espécies mais aparentados. O seguinte trabalho teve como objetivo realizar a descrição cariotípica da população de *Thrichomys apereoides* (N=10) na sua localidade tipo, Lagoa Santa (MG). Foram realizadas as técnicas de coloração com Giemsa, bandeamento CBG, Ag-NOR e hibridizações *in situ* (FISH) com sondas DNA microssatélite GA₍₁₅₎, CGG₍₁₀₎ e GAG₍₁₀₎. *T. apereoides* apresentou 2n=28, com 11 pares de metacêntricos, 1 submetacêntrico, 1 acrocêntrico, X acrocêntrico e Y submetacêntrico. A Ag-NOR apresentou marcação na constrição secundária do par 2 e o bandeamento CBG apresentou blocos conspícuos de heterocromatina nas regiões pericentroméricas dos autossomos, intersticial no cromossomo X e Y totalmente heterocromático. *T. apereoides* apresentou diferentes padrões de DNA repetitivo, geralmente associados às regiões heterocromáticas. Os resultados obtidos ampliaram o conhecimento citogenético sobre a população oriunda de Lagoa Santa (MG), com a inserção de novas técnicas de bandeamento e hibridização, permitindo comparações citogenéticas com grupos filogeneticamente mais aparentados.

PALAVRAS-CHAVE: *Thrichomys apereoides*, Cariótipo, Banda C, Ag-NOR, FISH.

INTRODUÇÃO:

A família Echimyidae é uma das famílias com taxonomia, morfologia e ecologia mais diversificada dentre os roedores (LEITE e PATTON, 2002). Este táxon é dividido em quatro subfamílias com aproximadamente 20 gêneros e mais de 90 espécies descritas, distribuída desde a América Central até a Argentina (ARAÚJO et al., 2013; LARA et al., 1996; LEITE e PATTON, 2002).

O gênero *Thrichomys*, pertencente à subfamília Eumysopinae, abrange animais de tamanho médio a grande, cauda menor que o tamanho do corpo, uma pelagem cinzenta na região dorsal e branca na região ventral, com a presença de um anel de pelos brancos em volta dos olhos (BONVICINO e OLIVEIRA, 2008). São animais terrestres, crepusculares e que possuem uma dieta bem diversificada, sendo encontrados principalmente em regiões de Cerrado, Caatinga e Pantanal (BONVICINO e OLIVEIRA, 2008; REIS et al., 2011).

Devido à alta similaridade morfológica, o gênero *Thrichomys* foi considerado por muito tempo um grupo monoespecífico, sendo *T. apereoides* sua única espécie descrita (WOODS, 1993). Porém, estudos morfométricos, citogenéticos e moleculares permitiram o reconhecimento de cinco novas espécies: *T. pachyurus*, *T. laurentius*, *T. inermis*, *Thrichomys fosteri* e *T. apereoides* (BONVICINO et al., 2002; BORODIN et al., 2006; BRAGGIO e BONVICINO, 2004; DOS REIS e PESSÔA, 2004; PESSÔA et al., 2004, NASCIMENTO et al., 2013). Todas estas espécies são alopátricas: *T. fosteri* ocorre nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, *T. laurentius* na região nordeste brasileira, do estado do Ceará ao da Bahia, *T. inermis* do estado da Bahia até Tocantins, *Thrichomys pachyurus* nos estados de Tocantins, Goiás e Distrito Federal e *T. apereoides* nos estados de Minas Gerais e Bahia (BONVICINO e OLIVEIRA, 2008) (Figura 1A).

As análises citogenéticas representam uma importante abordagem no estudo taxonômico de roedores, pois os mesmos possuem uma alta variabilidade nos valores de número diplóide e fundamental, sendo considerados marcadores diagnósticos na descrição de novas espécies. Dentro do gênero *Thrichomys* as diferenças cariotípicas são particularmente evidentes entre os táxons: *Thrichomys fosteri* apresenta $2n=34$, *T. laurentius* e *Thrichomys pachyurus* com $2n=30$ (NF 54 e 56, respectivamente), *T.*

inermis com $2n=26$ e *T. apereoides* com $2n=28$ (BONVICINO et al., 2002; BORODIN et al., 2006; PESSÓA et al., 2004, NASCIMENTO et al., 2013) (Figura 1B).

A partir de 1970, a citogenética clássica auxiliou o entendimento taxonômico de mamíferos e outros vertebrados. Técnicas de bandeamento cromossômico permitiram a definição de regiões específicas nos cromossomos, como as de heterocromatina (bandeamento CBG) e organizadoras de nucléolo (Ag-NOR) (YONENAGA-YASSUDA, 2005). Com o nascimento da citogenética molecular, os cromossomos puderam, então, ser isolados, fracionados, sequenciados e clonados. A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é uma técnica revolucionária no mapeamento cromossômico, que permitiu, a partir da utilização de diferentes sondas fluorescentes de fragmentos de DNA, a detecção de regiões cromossômicas muitas vezes não identificadas pelas técnicas de bandeamento tradicionais (YONENAGA-YASSUDA, 2005).

No estado de Minas Gerais, o Carste de Lagoa Santa e seu entorno são de grande importância dentro do Cerrado mineiro. Suas formações cavernícolas apresentam um ambiente único de fossilização, que, somado ao fato de ser uma das regiões com a mastofauna extinta e vivente mais conhecidas (LEITE e COSTA, 2002), permitiu que a mesma fosse classificada de Especial Importância Biológica para a Conservação de Mamíferos de Minas Gerais (BIODIVERSITAS, acesso em 06 de novembro de 2013).

Um dos pioneiros no estudo de mamíferos dentro da região cárstica de Lagoa Santa foi Peter Lund (1801-1880). Grande parte de seu trabalho foi publicado no livro “Memórias sobre a Paleontologia Brasileira”, revisado e comentado por Carlos de Paula Couto em 1950, contando a passagem de Lund pelo Carste de Lagoa Santa, com a descrição de aproximadamente 115 espécies de mamíferos fósseis e viventes e, dentre elas, 21 espécies de marsupiais e 50 espécies de roedores, incluindo espécies-tipo.

Apesar dos estudos citogenéticos terem auxiliado no entendimento taxonômico do gênero, muitos deles definiram apenas o número diploide das espécies (BONVICINO et al., 2002; PESSÓA et al., 2004), com pouca ou nenhuma informação sobre os principais padrões de bandeamento e morfologia cromossômicos. PESSÓA et al. (2004) definiram o número diploide, bandeamento C, bandeamento G e o padrão de impregnação por prata (Ag-NOR) de *Thrichomys apereoides* de Lagoa Santa (localidade tipo) no estado de Minas Gerais. Porém, o número amostral foi de apenas um exemplar, sendo necessário um estudo mais abrangente da espécie na região. Por outro lado, não existem estudos com sondas de DNA repetitivo microssatélite em nenhuma espécie da família Echimyidae. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi

analisar citogeneticamente exemplares de *T. apereoides* provenientes de Lagoa Santa (MG), visando definir de forma mais completa os padrões citogenéticos populacionais desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS:

Foram utilizadas suspensões celulares de dez indivíduos de *Thrichomys apereoides* provenientes de Lagoa Santa (MG) (19° 37' 38" S, 43° 53' 23" W) (Figura 1A), que já se encontravam depositadas no Museu de Zoologia João Moojen na Universidade Federal de Viçosa (Tabela 1) (Licença do SISBIO 13045-1, emissão: 29/04/2011). As suspensões foram obtidas a partir do protocolo de FORD e HAMERTON (1956), o qual inclui a extração de células em divisão da medula óssea dos indivíduos.

Espécie	Sexo	N	Nº de registro
<i>Thrichomys apereoides</i>	M	5	MZUFV 3994
			MZUFV3995
			MZUFV 3996
			MZUFV 3997
			MZUFV 3998
	F	5	MZUFV4000
			MZUFV4002
			MZUFV 4003
			MZUFV 4004
			MZUFV 4208

Tabela 1 – Lista de espécimes analisados e depositados no Museu de Zoologia João Moojen (MZUFV).

Após a obtenção de células mitóticas em suspensão, as lâminas foram analisadas a partir de coloração tradicional em microscopia de luz para contagem de metáfases viáveis, utilizadas para definição do número diplóide dos animais provenientes de Lagoa Santa. Os cromossomos foram medidos no programa Image Pro Plus ® e classificados segundo LEVAN et al. (1964) com modificações em: metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a). Posteriormente,

Figura 1 – A) Mapa de distribuição do gênero *Thrichomys* no Brasil. **Asterisco** – *Thrichomys fosteri*, **Hexágono** – *Thrichomys pachyurus*, **Círculo preto** – *Thrichomys inermis*, **Círculo branco** – *Thrichomys apereoides* (BRAGGIO e BONVICINO, 2004); **Quadrado** – *Thrichomys laurentius* (BONVICINO et al., 2002); **Estrela** – *Thrichomys apereoides* de Lagoa Santa (presente estudo). b) Árvore de máxima parcimônia proposta por Braggio e Bonvicino (2004), mostrando as relações filogenéticas entre as espécies de *Thrichomys*.

RESULTADOS:

Todos os espécimes de *Thrichomys apereoides* apresentaram $2n=28$ cromossomos e número fundamental (NF) = 50. O cariótipo é composto por 11 pares de cromossomos metacêntricos de diferentes tamanhos, um par de submetacêntricos (par 5), um par de grandes acrocêntricos; os cromossomos sexuais foram representados por um X de porte médio e acrocêntrico e o Y por um cromossomo pequeno e submetacêntrico. O par cromossômico metacêntrico 2 apresentou uma constrição secundária no braço curto (Figura 2).

As análises de bandeamento CBG evidenciaram regiões centroméricas de heterocromatina em 11 dos pares de cromossomos autossômicos, uma marcação intersticial no cromossomo X e o Y totalmente heterocromático (Figura 3). As metáfases submetidas à impregnação por prata (Ag-NOR) apresentaram regiões organizadoras de nucléolo no par 2 metacêntrico, coincidentes com a constrição secundária (Figura 4).

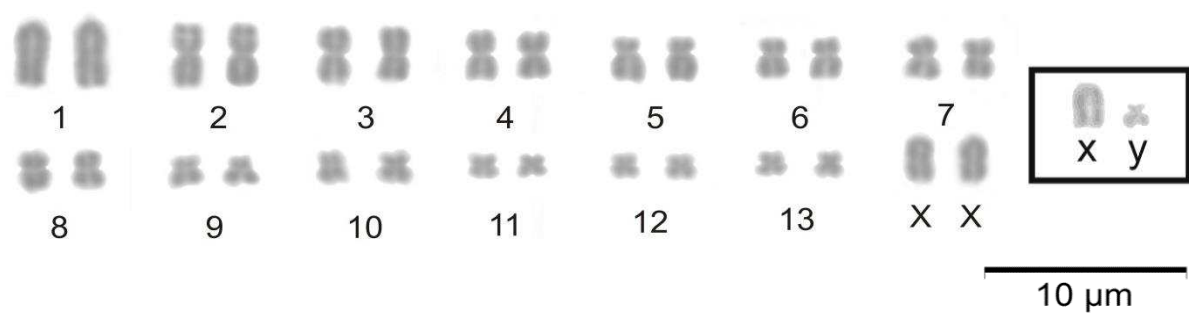


Figura 2 – Cariótipo de fêmea de *Thrichomys apereoides* ($2n=28$) (MZUFV 3997) proveniente de Lagoa Santa (MG), com presença de constrição secundária no par cromossômico 2. Par sexual do macho acrescentado (MZUFV 4003).

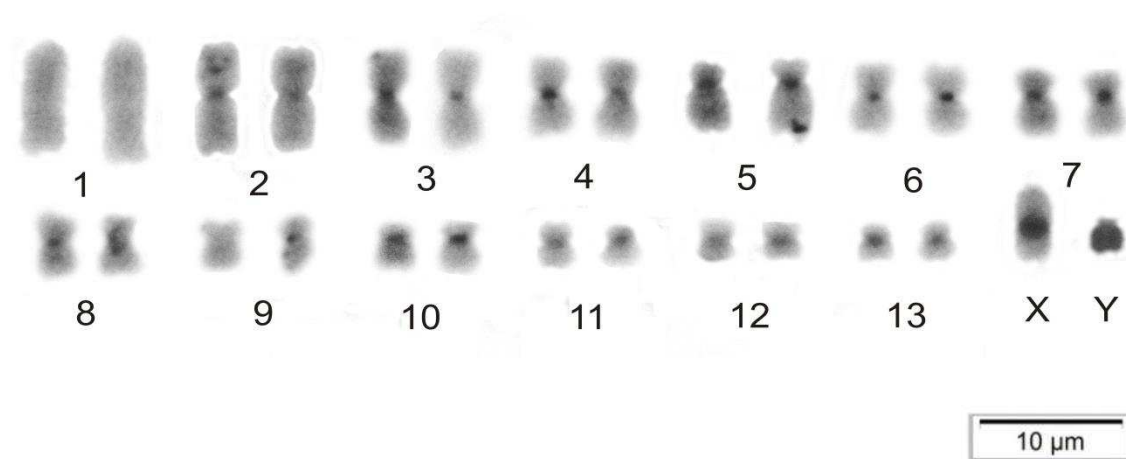


Figura 3 – Cariótipo de macho de *Thrichomys apereoides* (MZUFV 4004) tratado com a técnica de Banda C, mostrando regiões heterocromáticas.

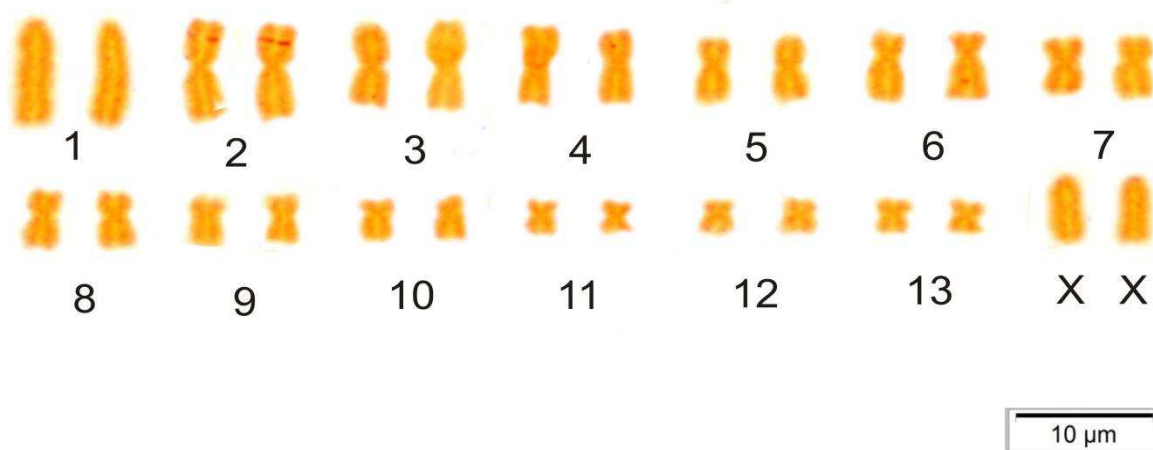


Figura 4 – Cariótipo de fêmea de *Thrichomys apereoides* (MZUFV 3995) submetido ao processo de impregnação por nitrato de prata (Ag-NOR). Região organizadora de nucléolo presente na constrição secundária no par cromossômico 2.

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) apresentou padrões de DNA repetitivo microssatélite que foram específicos de cada sonda. A sonda GA₍₁₅₎ apresentou marcações centroméricas em sete pares de autossomos (pares cromossômicos número 3, 4, 5, 6, 7, 9 e 10) em ambos os sexos (Figura 5). Já a sonda GAG₍₁₀₎ apresentou fluorescência distribuída ao longo dos cromossomos em todos os pares cromossômicos, com acúmulos maiores nos pares 1, 2 e 6, assim como marcações subtelo méricas nos demais pares. O cromossomo X também apresentou fluorescência ao longo de sua extensão, com maior acumulação em uma faixa intersticial, enquanto que o Y apresentou uma marcação subtelo mérica no seu braço curto (Figura 6). A sonda CGG₍₁₀₎ evidenciou uma marcação forte na constrição secundária no par 2 metacêntrico e marcações pericentroméricas menos evidentes em cinco pares autossômicos (pares cromossômicos número 4, 5, 6, 7 e 10) (Figura 7).

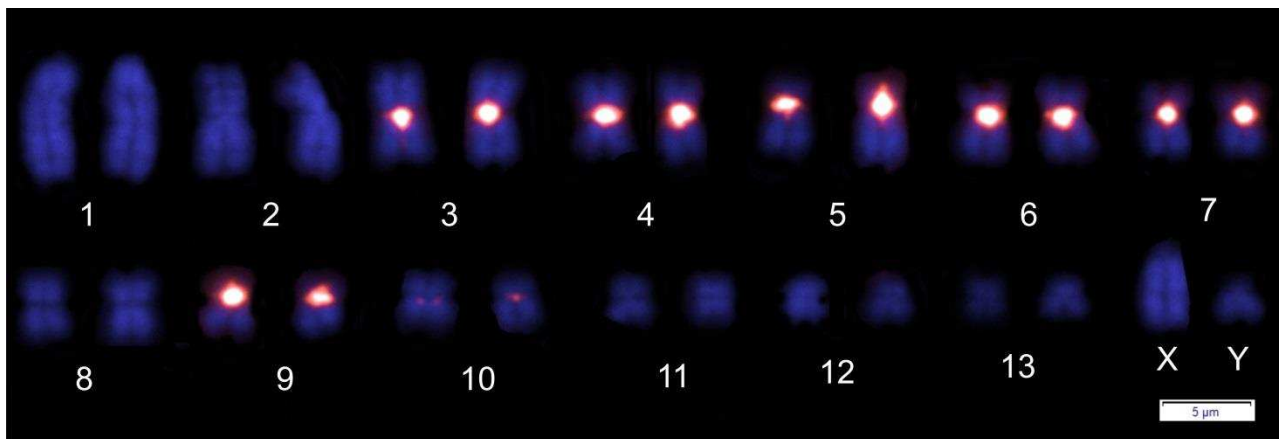


Figura 5 – Cariótipo de macho de *Thrichomys apereoides* (MZUFV 4004) após o FISH usando a sonda GA₍₁₅₎.

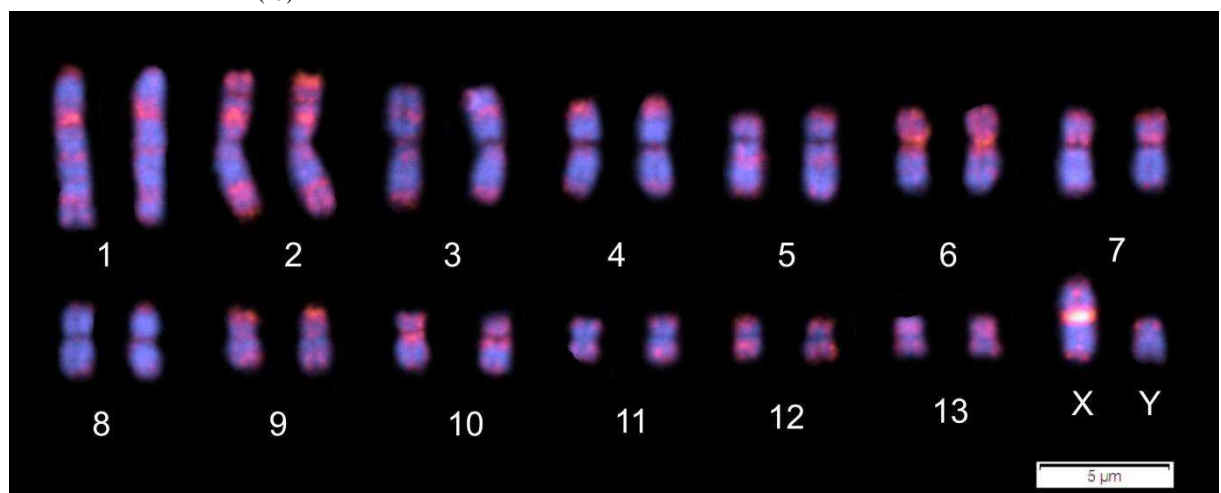


Figura 6 - Cariótipo de macho de *Thrichomys apereoides* (MZUFV 4208) tratado com a sonda GAG₍₁₀₎.

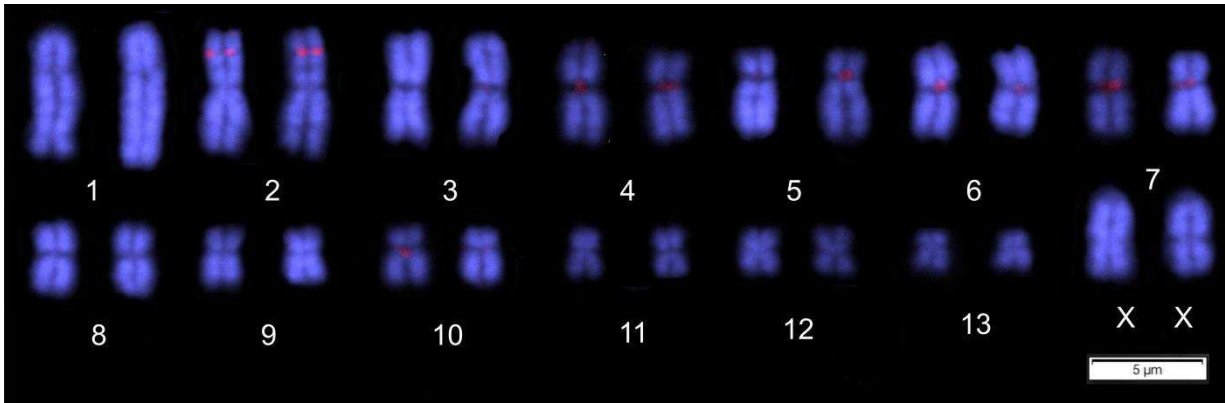


Figura 7 – Cariótipo de fêmea de *Thichomys apereoides* (MZUFV 3994) tratado com a sonda CGG₍₁₀₎.

DISCUSSÃO:

O cariótipo com as técnicas de coloração convencional (Giemsa) de *T. apereoides* de Lagoa Santa ($2n=28$) observado no presente estudo foi o mesmo descrito por PESSÔA et al. (2004) e possui características comuns dentro do gênero, como a presença de somente um par autossômico acrocêntrico, a constrição secundária em um par metacêntrico; os cromossomos sexuais também eram um X acrocêntrico e o Y submetacêntrico, embora seus tamanhos relativos variem entre as espécies (PESSÔA et al., 2004). Dentro do gênero é encontrado em *T. fosteri* ($2n=34$, NF = 64) 16 pares meta/submetacêntricos, X grande submetacêntrico e Y pequeno metacêntrico; *T. laurentius* ($2n=30$, NF = 54) com 12 pares de meta/submetacêntricos, 1 acrocêntrico, X grande telocêntrico e Y pequeno submetacêntrico; *Thrichomys pachyurus* ($2n= 30$, NF = 56) possui 13 pares de meta/submetacêntricos, X médio acrocêntrico e Y pequeno submetacêntrico e *T. inermis* ($2n=26$, NF=48) com 12 pares de meta/submetacêntricos, X grande subteloacêntrico e Y pequeno submetacêntrico (BONVICINO et al., 2002; PESSÔA et al., 2004, NASCIMENTO et al., 2013).

O número diplóide relativamente baixo de *Thrichomys apereoides* já foi considerado como evolutivamente mais recente dentro do gênero. BONVICINO e colaboradores (2002) observaram que populações de *Thrichomys* com maior número diplóide (*T. fosteri*, $2n=34$) se localizavam próximas aos registros fósseis do Mioceno (REIG, 1989) no oeste do Brasil, considerando o mesmo como ancestral. Com base nesta hipótese, os citados autores propuseram que a evolução cromossômica do gênero

decrece em número diplóide nas populações distribuídas do oeste para o leste brasileiro.

Acredita-se que os primeiros equimídios eram escansoriais e se distribuíam na região central brasileira, representando adaptações à expansão de áreas abertas durante o Mioceno (PASCUAL e JAUREGUIZAR, 1990). O gênero *Thrichomys* possui um tempo de divergência bem recente (aproximadamente 13 Ma) (GALEWSKI et al., 2005), o que explicaria parcialmente a alta similaridade morfológica entre os táxons. BRAGGIO e BONVICINO (2004) e, posteriormente, NASCIMENTO et al. (2013), a partir de análises moleculares, observaram que a relação entre as espécies *Thrichomys laurentius*, *Thrichomys aff. laurentius*, *Thrichomys aff. apereoides* e *Thrichomys apereoides* é de caráter parafilético: em todas as análises, *T. laurentius* e *T. aff. laurentius* ($2n=30$, NF=54) foi definido como um grupo parafilético, porém fortemente ligado à *T. apereoides* e *T. aff. apereoides* ($2n=28$, NF=50/52), o que indica que ambas devem ser consideradas como a mesma espécie apesar das diferenças cariotípicas. Por outro lado, o monofiletismo de *T. pachyurus*, *T. inermis* e *T. fosteri* é bem suportado (Figura 1B). Possivelmente, o tempo de diversificação cariológica entre os dois grupos é recente, e o citótipo de *T. apereoides* ($2n=28$) foi originado a partir de uma fusão cromossômica a partir de uma população ancestral com $2n=30$. Ainda de acordo com os dados moleculares e citogenéticos destes autores e os resultados do presente estudo, *T. apereoides* estaria representado por 2 citótipos com $2n=28$, FN=50, $2n=28$, FN = 52. A falta de concordância com as duas árvores obtidas por Braggio e Bonvicino (2004) pode ser explicada por retenção de polimorfismos mitocondriais ancestrais (AVISE, 2006) ou pela origem independente dos números diploides, com base na existência de pontos de quebra cromossômicos. Este fato determina que, em alguns grupos, os números diploides não são bons indicadores filogenéticos (ELER et al., 2007). Com base nesses dados, a proposta da existência de uma variação clinal de diminuição oeste-leste do número diplóide deve ser reavaliada.

Foi possível observar que, em *Thrichomys apereoides*, a maioria da composição cariotípica é formada por cromossomos de dois braços, abrangendo quase a totalidade do cariótipo, estando presente em todas as outras espécies para o gênero descritas, com a presença de somente um par autossômico telocêntrico, quando presente, como ocorre em *T. apereoides* e *T. laurentius* (PESSÓA et al., 2004). Essa característica também ocorre em outros Hystricognathi, nas espécies do gênero *Kerodon* (LESSA et al., 2013; ZAPPES et al., 2014), bem como em outros gêneros de Echimyidae, como em *Trinomys*

(CORRÊA et al., 2005), *Clyomys* (BEZERRA et al., 2012), *Proechimys* (SILVA et al., 2012) e *Phyllomys* (LEITE et al., 2008).

Os padrões de heterocromatina desta população também foram observados por PESSÓA et al. (2004), exceto a presença de um bloco heterocromático pericentromérico no cromossomo X, que não ocorreu no presente estudo, sugerindo a possibilidade de polimorfismo deste cromossomo nesta região. A presença de heterocromatina nos pares cromossômicos autossômicos parece ser uma característica apomórfica dentro do gênero, ocorrendo nas espécies de *Thrichomys* da região leste brasileira. *T. fosteri*, cujo cariótipo é considerado ancestral, possui regiões C-positivas nos pares cromossômicos sexuais, enquanto estas se encontram ausentes nos pares autossômicos, porém, em todas as outras espécies dentro do gênero, a heterocromatina é presente nos pares autossômicos (PESSÓA et al., 2004). Outra característica comum ao gênero é o fato que o cromossomo Y é totalmente heterocromático, assim como também ocorre em *T. apereoides*. Somente *T. inermis* possui o cromossomo Y parcialmente heterocromático (PESSÓA et al., 2004). Essas diferenças podem ter sido fruto de rearranjos cromossômicos, como adições/deleções heterocromáticas bem como fusões/fissões cromossômicas, comuns em roedores (ARAÚJO et al., 2013; BARROS et al., 2009; BEZERRA et al., 2012). Tais rearranjos podem diminuir a taxa de crossing-over e são importantes no isolamento reprodutivo e, conseqüentemente, nos processos de especiação (STEFANSSON et al., 2005, HOFFMANN; RIESEBERG, 2008). Acreditava-se que a evolução cromossômica dentro de Echimyidae era consequência de rearranjos devidos principalmente às translocações robertsonianas, já que, na família, existe uma alta variabilidade no número diploide dos indivíduos e uma pequena diferença nos valores de número fundamental (LIMA et al., 1998). Porém Dunnum (2001), a partir de uma análise estatística dos cariótipos descritos até então, definiu que há uma diferença significativa entre os valores de números fundamentais, hipotetizando de forma alternativa, que inversões para/pericentroméricas possam ter sido importantes na evolução cariotípica dentro de Echimyidae. O alto grau de variação cariotípica observado dentro de *T. apereoides* sustenta a hipótese de Dunnum (2001).

Tipicamente, na família Echimyidae, regiões de Ag-NOR estão associadas a constrições secundárias e se encontram restritas a um par cromossômico (ARAÚJO et al., 2013; VILELA et al., 2009). A presença de regiões de Ag-NOR intersticiais é considerada uma característica plesiomórfica dentro dos Hystricognathi (VILELA et al., 2009), sendo esta observada em *Thrichomys apereoides*, corroborando as análises feitas

por PESSÔA et al. (2004). Estes autores indicam ainda que em todas as espécies do gênero, regiões de Ag-NOR são encontradas também em regiões intersticiais e em somente um par cromossômico. Após análise das figuras do citado estudo, conclui-se que em todas as espécies deste gênero, o par de cromossomos portadores corresponde ao observado em *T. apereoides*. Apenas *T. fosteri* ($2n=34$, $NF=64$) possui a região de Ag-NOR associada ao braço maior do par 2 metacêntrico, onde a constrição secundária está localizada (DOS REIS e PESSÔA, 2004; PESSÔA et al., 2004).

DNAs microssatélites são sequências simples e repetitivas em *tandem*, possuindo um tamanho reduzido (de 1-6 nucleotídeos) (GUERRA, 2005). Geralmente, DNAs microssatélites estão associados a regiões heterocromáticas no genoma (teloméricas, centroméricas e nos cromossomos sexuais) em diferentes grupos de vertebrados (CIOFFI et al., 2011; POKORNÁ et al., 2011; SUPIWONG et al., 2013), em regiões Ag-NOR (VANZELA et al., 2002), ou também podem se distribuir por todo o cromossomo, tanto em regiões heterocromáticas como eucromáticas (CIOFFI et al., 2012). Em *T. apereoides* a sonda GA₍₁₅₎ ocorreu principalmente em associação com regiões heterocromáticas, com exceção do par 9, o qual aparece eucromático após bandeamento CBG. A ausência de marcações desta sonda nos pares 1, 2, 8, 11, 12, 13 demonstra que a história evolutiva dos cromossomos no gênero *Thrichomys* envolve grandes diferenças entre os pares cromossômicos. A sonda CGG₍₁₀₎ apresentou uma associação conspícua com a região de Ag-NOR e associações mais fracas com regiões heterocromáticas de cinco pares cromossômicos, correspondendo a um subconjunto dos pares marcados com a sonda GA₍₁₅₎. Finalmente, a sonda GAG₍₁₀₎ se distribuiu tanto em regiões heterocromáticas quanto eucromáticas, porém com uma evidente acumulação na região intersticial no cromossomo X, também heterocromática. CIOFFI e colaboradores (2012), a partir de estudos sobre o acúmulo de DNAs microssatélites nos pares de cromossomos sexuais de diferentes citótipos de duas espécies de peixes (*Leporinus reinhardti* e *Triporthus auritus*), propuseram que, evolutivamente, pode ocorrer uma acumulação inicial de DNAs repetitivos microssatélite nos cromossomos, identificados pela hibridização *in situ*, e uma posterior heterocromatização nos mesmos, o que pode justificar a presença de DNAs repetitivos associados também a regiões eucromáticas. O avanço nos padrões de FISH obtidos com sondas de DNA repetitivo permite elaborações de hipóteses mais específicas da evolução cromossômica dentro de *T. apereoides* ou entre as espécies deste gênero, conforme demonstrado por SANTOS et al. (2009) em *Hoplias malabaricus*.

Os diversos tipos de DNA repetitivo (satélites, minissatélites, microssatélites, elementos transponíveis) podem apresentar padrões característicos em animais e plantas (GAO et al., 2009, VANZELA et al., 2002), sendo importantes meios para a definição de diferenças cariotípicas entre as espécies (SUPIWONG et al., 2013). Trabalhos com DNAs microssatélites mono, di e trinucleotídicos são raros em mamíferos, sendo mais comum o uso de sondas específicas a um determinado genoma (ACOSTA et al., 2010; KARAMYSHEVA et al., 2010). Estudos com as sondas utilizadas aqui são mais comuns em peixes, plantas e répteis (CIOFFI et al., 2011; KUBAT et al., 2008; POKORNÁ et al., 2011). Assim, as sondas utilizadas no presente estudo ($GA_{(15)}$, $CGG_{(10)}$ e $GAG_{(10)}$) apresentaram padrões divergentes em *Hoplais malabaricus* (CIOFFI et al., 2011), nos lagartos *Coleonyx elegans* e *Eremias velox* (POKORNÁ et al., 2011) e na planta *Silene latifolia* (KUBAT et al., 2008). *H. malabaricus* apresentou uma maior acumulação de $GA_{(15)}$ nas regiões subteloméricas, enquanto $CGG_{(10)}$ e $GAG_{(10)}$ se distribuíram por todos os cromossomos (CIOFFI et al., 2011), já para *C. elegans*, *E. velox* (POKORNÁ et al., 2011) e *S. latifolia* (KUBAT et al., 2008), todas as sondas se distribuíram uniformemente no genoma, resultado similar somente à sonda $GAG_{(10)}$ em *Thrichomys apereoides*.

Análises realizadas com DNA repetitivo em mamíferos geralmente envolvem a utilização de sondas teloméricas e de DNA ribossômico 18S (ARAÚJO et al., 2013; FAGUNDES et al., 2004; SUÁREZ-VILLOTA et al., 2014; AMARAL et al., 2013). Segundo SUPIWONG et al. (2013), sondas teloméricas são importantes para indicar possíveis rearranjos cromossômicos durante a evolução cariotípica de diferentes espécies e se baseiam na presença ou ausência de marcações teloméricas intersticiais (TI). ARAÚJO et al. (2013) formularam hipóteses para a evolução cromossômica em espécies do gênero *Phyllomys* a partir da presença de TIs nos cariótipos. Sendo assim, a utilização de sondas teloméricas e de outras de DNAs microssatélites em *Thrichomys apereoides* são importantes para melhor entendimento de sua história evolutiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ACOSTA, M. J. et al. 2010. Characterization of the satellite DNA Msat-160 from species of Terricola (*Microtus*) and Arvicola (Rodentia, Arvicolinae). **Genetica**, v. 138, n. 9-10, p. 1085–1098.

AMARAL, P. J. S. et al. 2013. *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae): characterization and taxonomic considerations of a form with a very low diploid number and a multiple sex chromosome system. **BMC Genetics**, v. 14, p. 21.

ARAÚJO, N. P. DE et al. 2013. New karyotypes of Atlantic tree rats, genus *Phyllomys* (Echimyidae, Rodentia). **Genome**, v. 8, p. 1–8.

AVISE, J. C. 2006. *Evolutionary Pathways in Nature: A Phylogenetic Approach*. Cambridge University Press, New York, 286 pp.

BARROS, M. C. et al. 2009. Molecular phylogenies, chromosomes and dispersion in Brazilian akodontines (Rodentia, Sigmodontinae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 99, p. 373–380.

BEZERRA, A. M. R. et al. 2012. A new karyotype for the spiny rat *Clyomys laticeps* (Thomas, 1909) (Rodentia, Echimyidae) from Central Brazil. **Comparative Cytogenetics**, v. 6, p. 153–161.

BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A DE. 2008. **Guia dos roedores do Brasil , com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, v. 15, 120 p.

BONVICINO, C. R.; OTAZU, I. B.; D´ANDREA, P. S. 2002. Karyologic evidence of diversification of the genus *Thrichomys* (Rodentia, Echimyidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 97, p. 200–204.

BORODIN, P. M. et al. 2006. Reproductive isolation due to the genetic incompatibilities between *Thrichomys pachyurus* and two subspecies of *Thrichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). **Genome / National Research Council Canada**, v. 49, p. 159–167.

BRAGGIO, E.; BONVICINO, C. R. 2004. Molecular Divergence in the genus *Thrichomys* (Rodentia, Echimyidae). **Journal of Mammalogy**, v. 85, p. 316-320.

CIOFFI, M. B. et al. 2012. The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. **Molecular Cytogenetics**, v. 5, 7 p.

CIOFFI, M. B.; KEJNOVSKY, E.; BERTOLLO, L. A C. 2011. The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, p. 289–296.

CORRÊA, M. M. O. et al. 2005. The Karyotypes of *Trinomys moojeni* (Pessoa, Oliveira & Reis 1992) and the *Trinomys setosus elegans* (Lund, 1842) (Rodentia, Echimyidae) from Minas Gerais, eastern Brazil. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 63, p. 169–174.

DOS REIS, S. F.; PESSÔA, L. M. 2004. *Thrichomys apereoides*. **Mammalian Species**, v. 741, p. 1–5.

DUNNUM, J. L.; SALAZAR-BRAVO, J.; YATES, T. L. 2001. The Bolivian bamboo rat, *Dactylomys boliviensis* (Rodentia: Echimyidae), a new record for chromosome number in a mammal. **Mammalian Biology**, v. 66, p. 121-126.

ELER, E. S. et al. 2007. The karyotypes of the thorny catfishes *Wertheimeriamaculata* Steindachner, 1877 and *Hassarwilderi* Kindle, 1895 (Siluriformes: Doradidae) and their relevance in doradids chromosomal evolution. **Genetica**, v. 130, p. 99-103.

E SILVA, C. E. F. et al. 2012. Karyological analysis of *Proechimys cuvieri* and *Proechimys guyannensis* (Rodentia, Echimyidae) from central Amazon. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 88–94.

FABRE, P; GALEWSKI, T.; TILAK, M.; DOUZERY, E. J. P. 2012. Diversification of South American spiny rats (Echimyidae): a multigene phylogenetic approach. **Zoologica Scripta**, v. 42, p. 117-134.

FAGUNDES, V.; CAMACHO, J. P. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 2004. Are the dot-like chromosomes in *Trinomys iheringi* (Rodentia, Echimyidae) B chromosomes? **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 159–164.

FORD C.E.; HAMERTON J.L. 1956. The chromosomes of man. **Nature**. v. 178, p. 1020–1023.

FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS .2005. Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. Acesso em: 06 de novembro de 2013. Disponível em: <(http://www.biodiversitas.org.br/atlas/mamiferos.asp)>

GALEWSKI, T. et al. 2005. Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): A phylogenetic and chronological approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 34, p. 601–615.

GAO, H. et al. 2009. Discrepancy variation of dinucleotide microsatellite repeats in eukaryotic genomes. **Biological Research**, v. 42, p. 365–375.

GUERRA, M. 2005. Hibridização in situ: Princípios Básicos. **In: FISH, Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p 1-32.

HOFFMANN A. A.; RIESEBERG L. H. 2008. Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 39, p 21-42.

HOWELL W. M.; BLACK, D. A. 1980. Controlled silver staining of nucleolusorganizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 439, p. 1014-1015.

KARAMYSHEVA, T. V et al. 2010. Comparative FISH analysis of C-positive blocks of centromeric chromosomal regions of pygmy wood mice *Sylvaemus uralensis* (Rodentia, Muridae). **Russian Journal of Genetics**, v. 46, p. 712–724.

KUBAT, Z. et al. 2008 Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome / National Research Council Canada**, v. 51, n. 5, p. 350–356.

LARA, M. C.; PATTON, J. L.; DA SILVA, M. N. 1996 The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 5, p. 403–413.

LEITE, Y. L. R.; PATTON, J. L. 2002. Evolution of South American spiny rats (Rodentia, Echimyidae): the star-phylogeny hypothesis revisited. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, p. 455–464.

LEITE, Y. L. R.; CHRISTOFF, A. U.; FAGUNDES, V. 2008. A New Species of Atlantic Forest Tree Rat, Genus *Phyllomys* (Rodentia, Echimyidae) from Southern Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 89, p. 845–851.

LESSA, G. et al. 2013. Chromosomal differentiation in *Kerodonrupestris* (Rodentia: Caviidae) from the Brazilian semi-arid region. **Mastozoología Neotropical**, v. 20, p. 399–405.

LEVAN A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosome. **Hereditas**. v. 1, p. 201–220.

LIMA, J. F. S.; LANGGUTH, A.; SOUZA, L. C. 1998. The karyotype of *Makalata didelphoides* (Rodentia, Echimyidae). **Z Säugetierkunde**, v. 63, p. 315-318.

LUND, P. W. 1836. Lista atualizada dos mamíferos fósseis e atuais do Vale do Rio das Velhas, segundo os trabalhos de Peter Wilhelm Lund e Herluf Winge. In: **PAULACOUTO, C. de. (ed.). Memórias sobre a paleontologia brasileira**. Rio de Janeiro, Instituto Nacional do Livro, 1950.

NASCIMENTO, F. F. et al. 2013. The Role of Historical Barriers in the Diversification Processes in Open Vegetation Formations during the Miocene/Pliocene Using an Ancient Rodent Lineage as a Model. **Plos one**, v. 8, p. 1-13.

PASCUAL, R.; JAUREGUIZAR, E.O. 1990. Evolving climates and mammal faunas in Cenezoic South America. **Journal of Human Evolution**, v. 19, p. 23–60.

PESSÓA, L. M.; DE OLIVEIRA, J. A.; LOPES, M. O. G. 2004. Karyological and morphometric variation in the genus *Thrichomys* (Rodentia: Echimyidae). **Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde**, v. 69, p. 258–269.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 2934-2938.

POKORNÁ, M.; KRATOCHVÍL, L.; KEJNOVSKÝ, E. 2011. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). **BMC Genetics**, v. 12, p. 1-7.

REIG, O. 1989. Karyotypic repatterning as one triggering factor in cases of explosive speciation. **Fontdevilla A (ed): Evolutionary Biology of Transient Unstable Populations**, p. 246–289.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A. & LIMA, I. P. 2011. **Mamíferos do Brasil**. 2 ed, Londrina: Nélío R. dos Reis, 441 p.

SANTOS, U. et al. 2009. Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 75, p. 2326-2343.

STEFANSSON H. et al. 2005. A common inversion under selection in Europeans. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p 129-137.

SUÁREZ-VILLOTA, E. Y. et al. 2014. Homomorphic Sex Chromosomes and the Intriguing Y Chromosome of *Ctenomys* Rodent Species (Rodentia, Ctenomyidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 143, p. 232–240.

SUMNER A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 604-306.

SUPIWONG, W.; LIEHR, T.; CIOFFI, M. B. 2013. Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). **Cytogenetics**, v. 6, p. 1–7.

VANZELA, A. L. L. et al. 2002. Differential distribution of (GA)₉+C Microsatellite on Chromosomes of Some Animal and Plant Species. **Cytologia**, v. 67, p. 9-13.

VILELA, R. V et al. 2009. The taxonomic status of the endangered thin-spined porcupine, *Chaetomys subspinosus* (Olfers, 1818), based on molecular and karyologic data. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p. 1-17.

WOODS, C. A. 1993. Suborder Hystricognathi. **Mammals species of the world. A taxonomic and geographic reference**. 2 ed. Editado por D. E. WILSON e D. M. REEDER. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. p 771–806.

YONENAGA-YASSUDA, Y. 2005. Contribuição da FISH à citogenética de mamíferos e répteis. **In: FISH, Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p 89-114.

ZAPPES, I.; PORTELLA, A.; LESSA, G. 2014. Description of Karyotype of *Kerodon acrobata*, an endemic rodent in Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 1, p. 251–256.

4. ARTIGO II:

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE *Kannabateomys amblyonyx* (Wagner, 1845)
(RODENTIA, ECHIMYIDAE) DA ZONA DA MATA NORTE, ESTADO DE MINAS
GERAIS, BRASIL.

Pedro Henrique Fonseca Rabelo, Fabiano Aguiar da Silva, Jorge Abdala Dergam e
Gisele Lessa

Laboratório de Sistemática Molecular – Beagle, Departamento de Biologia Animal, 174
Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO:

A família Echimyidae é uma das famílias de roedores de maior diversidade taxonômica, com 20 gêneros e 90 espécies e apresenta uma alta variabilidade cariotípica, característica que permite a descoberta de novas espécies e o estudo de variações geográficas intra-específicas. O seguinte trabalho tem como objetivo realizar o estudo citogenético em *Kannabateomys amblyonyx* (N=2) em Leopoldina e Viçosa, utilizando técnicas de coloração com Giemsa, bandeamento CBG, Ag-NOR e hibridizações *in situ* fluorescente (FISH) com sondas DNA microssatélite GA₍₁₅₎, CA₍₁₅₎ e CAA₍₁₀₎. A espécie apresentou 2n=98 cromossomos, com 13 pares metacêntricos, dois submetacêntricos e 33 acrocêntricos, X metacêntrico e Y acrocêntrico. A RON apresentou-se telomérica no par 8 e o bandeamento CBG evidenciou heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas dos autossomos e do X; o cromossomo Y apresentou-se totalmente heterocromático. Todas as sondas de DNA microssatélite se acumularam em regiões intersticiais em diferentes pares de cromossomos em *K. amblyonyx*. Os resultados obtidos ampliaram o conhecimento citogenético da espécie, com novos dados sendo apresentados após um longo período. Pela primeira vez, técnicas de hibridização *in situ* com DNAs microssatélites são utilizadas na família Echimyidae, permitindo comparações citogenéticas com grupos mais próximos.

PALAVRAS-CHAVE: *Kannabateomys amblyonyx*, Cariótipo, Banda C, Ag-NOR, FISH.

INTRODUÇÃO:

A família Echimyidae, composta pelos ratos de espinhos, ratos-corós e ratos do bambu, é dividida em quatro subfamílias e possui aproximadamente 20 gêneros e 90 espécies (ARAÚJO et al., 2013). É um dos grupos de Rodentia com maior diversidade morfológica, ecológica e taxonômica, com distribuição da América Central até a Argentina (ARAÚJO et al., 2013; BONVICINO e OLIVEIRA, 2008; LEITE e PATTON, 2002).

Johann Baptist von Natterer (1787-1843) foi um grande naturalista austríaco, sendo um dos maiores coletores de aves e mamíferos e responsável por catalogar uma das maiores coleções científicas durante o século XIX (VANZOLINI, 1993; MONTEZ, 2010). Entre os anos de 1820 e 1824, o mesmo realizou expedições na cidade de Ipanema (SP), onde coletou dois crânios de *K. amblyonyx*. WAGNER (1845), a partir de análises cranianas dos exemplares coletados por Natterer descreveu *Dactylomys amblyonyx*. Posteriormente, JENTINK (1891) propôs um novo gênero com base em caracteres dentários, renomeando a espécie para *Kannabateomys amblyonyx*.

O gênero *Kannabateomys*, pertencente à subfamília Dactylomyinae, possui apenas a espécie *Kannabateomys amblyonyx* (Wagner, 1845), a qual é conhecida popularmente como rato-do-bambu ou rato-de-taquara. Esta espécie tem como localidade tipo a cidade de Ipanema (SP) (REIS et al., 2011) e distribui-se do Espírito Santo ao Rio Grande do Sul (REIS et al., 2011), com registros recentes em Minas Gerais (SILVA et al., 2012). Possui tamanho grande, cauda maior que o comprimento do corpo e pelagem ferrugínea (BONVICINO e OLIVEIRA, 2008). São animais endêmicos da Mata Atlântica, arborícolas e com hábitos de vida e alimentares bem específicos, estando sempre associados a plantações de bambu nativas ou exóticas, associadas à mata nativa, com hábitos principalmente noturnos e pouca atividade durante o dia (SARTI et al., 2012; SILVA et al., 2008).

Análises citogenéticas são importantes no estudo de mamíferos, sendo um importante método científico na identificação de muitas espécies a partir de diferenças cromossômicas (PEREIRA e GEISE, 2007). A família Echimyidae apresenta uma alta variabilidade cariotípica entre gêneros, espécies e populações; assim, estudos que abordam características como número diplóide e número fundamental são relevantes para o reconhecimento e diagnóstico de novas espécies (ARAÚJO et al., 2013;

BEZERRA et al., 2012; BONVICINO et al., 2002; CORRÊA et al., 2005; MACHADO et al., 2005).

Desde a década de 70, técnicas citogenéticas de bandeamento cromossômicos têm sido de grande ajuda para o melhor entendimento taxonômico de mamíferos e outros vertebrados, com a detecção, por exemplo, de regiões de heterocromatina (através da técnica de bandeamento CBG) e de regiões organizadoras de nucléolo (através da técnica de impregnação com nitrato de prata Ag-NOR) (YONENAGA-YASSUDA, 2005). A partir de 1980, com o desenvolvimento da citogenética molecular, os cromossomos puderam ser então isolados e fracionados, podendo ser sequenciados e clonados. A hibridização *in situ* fluorescente (FISH), uma das técnicas de citogenética molecular, utiliza sondas fluorescentes de fragmentos de DNA com sequência complementar, é uma técnica rápida e eficiente no mapeamento cromossômico, identificando regiões não detectadas por outras técnicas de bandeamento (YONENAGA-YASSUDA, 2005).

Por possuir hábitos de vida bem específicos, *K. amblyonyx* é uma espécie pouco estudada. Isso ocorre, provavelmente, devido à sua baixa representatividade nas coleções zoológicas por ser uma espécie de difícil coleta (AGUIAR, 2014). Esse fator dificulta o conhecimento dos padrões de distribuição da espécie e estudos de variações, sejam morfológicas, citogenéticas e/ou moleculares das diferentes populações (AGUIAR, 2014).

Não há estudos citogenéticos, com definição do número diplóide e de padrões de bandeamento, há mais de dez anos (FAGUNDES et al., 2001, PARESQUE et al. 2004). Os estudos realizados mais recentemente em *Kannabateomys amblyonyx* se referem aos aspectos ecológicos, comportamentais e de distribuição dessa espécie (AGUIAR et al., 2013; SARTI et al., 2012; SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2008). Quanto a suas características cromossômicas, apenas seu número diploide ($2n=98$), fórmula cariotípica e padrão de Ag-NOR foram descritos para uma população do estado do Espírito Santo (FAGUNDES et al., 2001; PARESQUE et al., 2004). Assim, o presente estudo visa realizar a primeira descrição citogenética de uma população de *K. amblyonyx* proveniente do estado de Minas Gerais, utilizando técnicas de coloração convencional (Giemsa) para determinação do cariótipo, bandeamento C para identificação das regiões heterocromáticas, Ag-NOR para identificação das regiões organizadores de nucléolo e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNA microssatélite, visando contribuir para o entendimento taxonômico sobre a espécie.

MATERIAL E MÉTODOS:

Foram utilizadas suspensões celulares de dois indivíduos de *Kannabateomys amblyonyx* provenientes de Viçosa (20° 45' 14" S, 42° 52' 55" W) e Leopoldina (21° 31' 55" S, 42° 38' 35" W), ambas em Minas Gerais (Licença número 37986-3). Os espécimes foram depositados no Museu de Zoologia João Moojen de Oliveira, na Universidade Federal de Viçosa (Tabela 1) (Figura 1). Todas as suspensões foram obtidas a partir soluções de 80% de meio de cultura RPMI 1640, 20% de Soro Bovino Fetal e 50 µl de colchicina 1%.

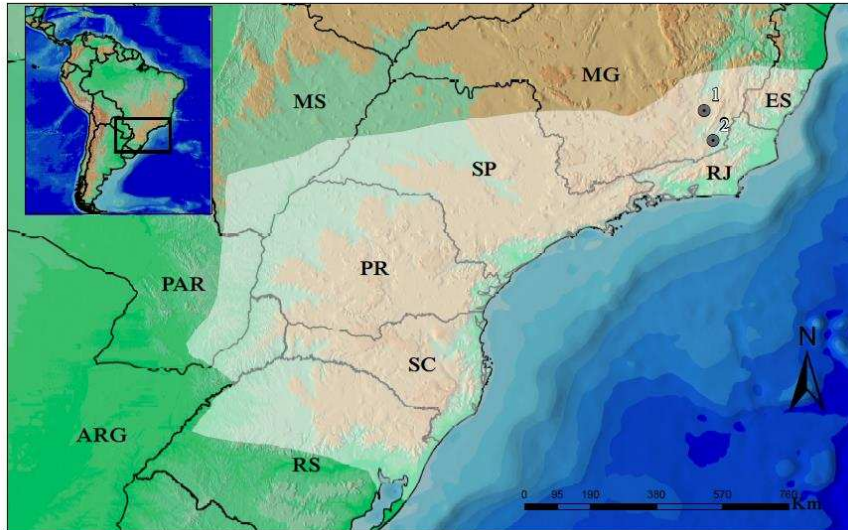
Espécie	Sexo	N	Procedência	Nº de registro
<i>Kannabateomys</i>	M	1	Viçosa	MZUFV4229
<i>amblyonyx</i>	F	1	Leopoldina	MZUFV 4228

Tabela 1 - Lista de espécimes de *Kannabateomys amblyonyx* analisados e depositados no Museu de Zoologia João Moojen (MZUFV).

Após a obtenção de células mitóticas, lâminas do material foram analisadas usando coloração tradicional em microscopia de luz para contagem de metáfases completas de cada espécie para definição do número diplóide dos animais. Os cromossomos foram medidos no programa Image Pro Plus ® e classificados segundo LEVAN et al. (1964) com modificações em: metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtlocêntricos (st) e acrocêntricos (a). Posteriormente, técnicas citogenéticas de bandeamento CBG (SUMNER, 1972) e Ag-NOR (HOWELL e BLACK, 1980), foram realizadas para definir as principais regiões de heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolo respectivamente. As imagens foram obtidas com o fotomicroscópio Olympus BX53 com câmera acoplada modelo DP73. No presente estudo também foi realizado a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) adaptada de PINKEL e colaboradores (1986) com as sondas fluorescentes de DNA microssatélite GA₍₁₅₎, CA₍₁₅₎ e CAA₍₁₀₎, sintetizadas e marcadas com o fluorocromo Cy3 na extremidade 5' de acordo com as instruções do fabricante (Sigma). As preparações cromossômicas foram desnaturadas com formamida 70%/2xSSC a 75 °C durante 3 minutos e cada lâmina foi tratada com o mix de hibridização formado por: 200 ng de sonda marcada, 50% de formamida, 2xSSC e 10% de sulfato de dextrano. Este mix foi aquecido a 75 °C por 10

minutos e as lâminas foram deixadas em câmara úmida a 37 °C overnight. Após a fase de hibridização, as lâminas foram lavadas uma vez nas soluções de 1xSSC e 4xSSC/0.5% Tween durante 5 minutos cada à temperatura ambiente e contra-coradas com DAPI. Os resultados foram fotografados com fotomicroscópio Olympus modelo BX53 com câmera monocromática acoplada modelo XM10.

A)



B)

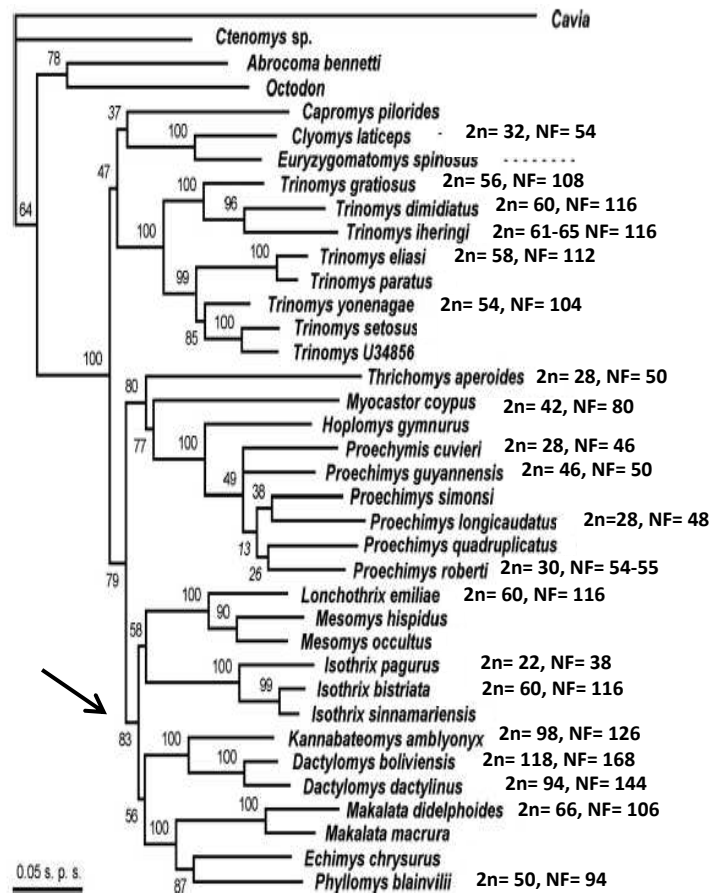


Figura 1 – A) Mapa de distribuição de *Kannabateomys amblyonyx* no Brasil. Localidades de coleta: 1-Viçosa, 2-Leopoldina. B) Filograma adaptado de GALEWSKI (2005) mostrando as relações filogenéticas dentro da família Echimyidae com valores de números diplóides e fundamentais quando disponíveis na literatura: *D. dactylinus* e *L. emiliae* (ANISKIN, 1993), *D. boliviensis* (DUNNUM, 2001), *I. pagurus* e *I. bistrata* (BONVICINO et al., 2003), *M. didelphoides* (LIMA et al., 1998), *P. blainvilli* (LEITE et al., 2008), *K. amblyonyx* (presente estudo), *Proechimys* (SILVA et al., 2012), *Thrichomys apereoides* (ARTIGO I), *Myocastor coypus* (GONZALES E BRUMZORRILA, 1995), *Trinomys* (CORRÊA et al., 2005), *Clyomys laticeps* (BEZERRA et al., 2012) . A seta representa a linhagem dos equimídeos arborícolas.

RESULTADOS:

Kannabateomys amblyonyx apresentou número diplóide de $2n=98$ cromossomos e número fundamental (NF) = 126. O cariótipo é composto por 13 pares de cromossomos metacêntricos, dois submetacêntricos e 33 pares acrocêntricos, sendo o X o maior metacêntrico e o Y e o maior acrocêntrico (Figura 2).

As análises de bandeamento CBG demonstraram grandes blocos heterocromáticos nas regiões pericentroméricas em todos os pares de cromossomos autossômicos, com destaque do par 1 submetacêntrico, que apresenta uma região heterocromática abrangendo quase a totalidade do braço curto. O cromossomo X apresentou marcação pericentromérica e o cromossomo Y é quase totalmente heterocromático (Figura 3). As metáfases submetidas à impregnação por nitrato de prata (Ag-NOR) apresentaram regiões organizadoras de nucléolo presentes no par 8 em ambos os sexos (Figura 4).

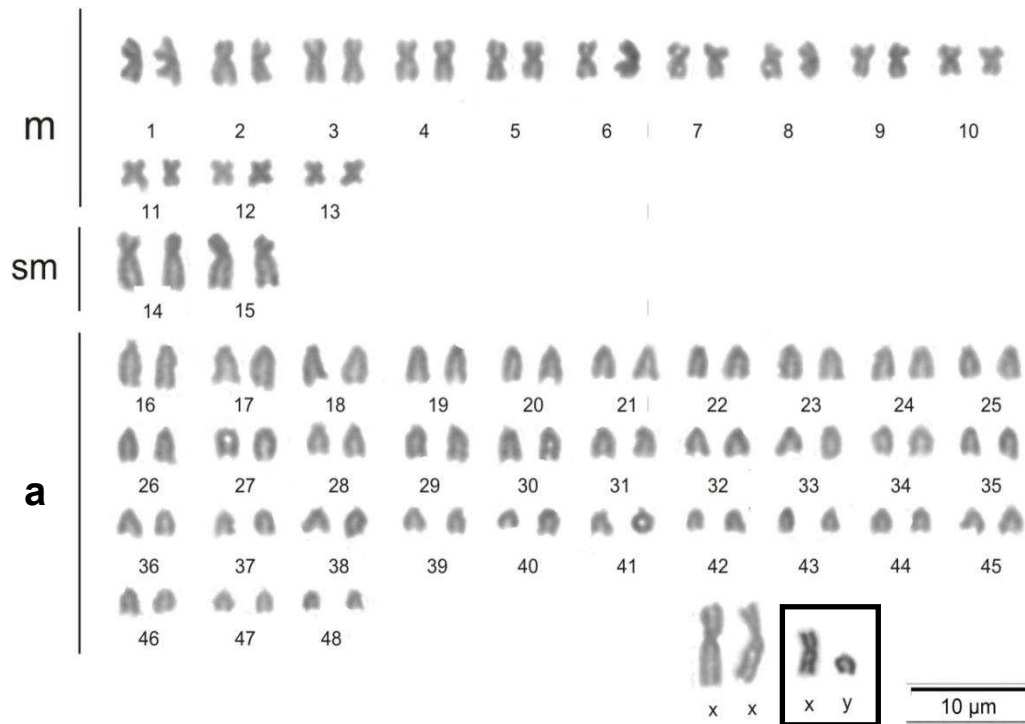


Figura 2 – Cariótipo de fêmea de *Kannabateomys amblyonyx* ($2n=98$) (MZUFV 4228). Par sexual do macho acrescentado (MZUFV 4229).

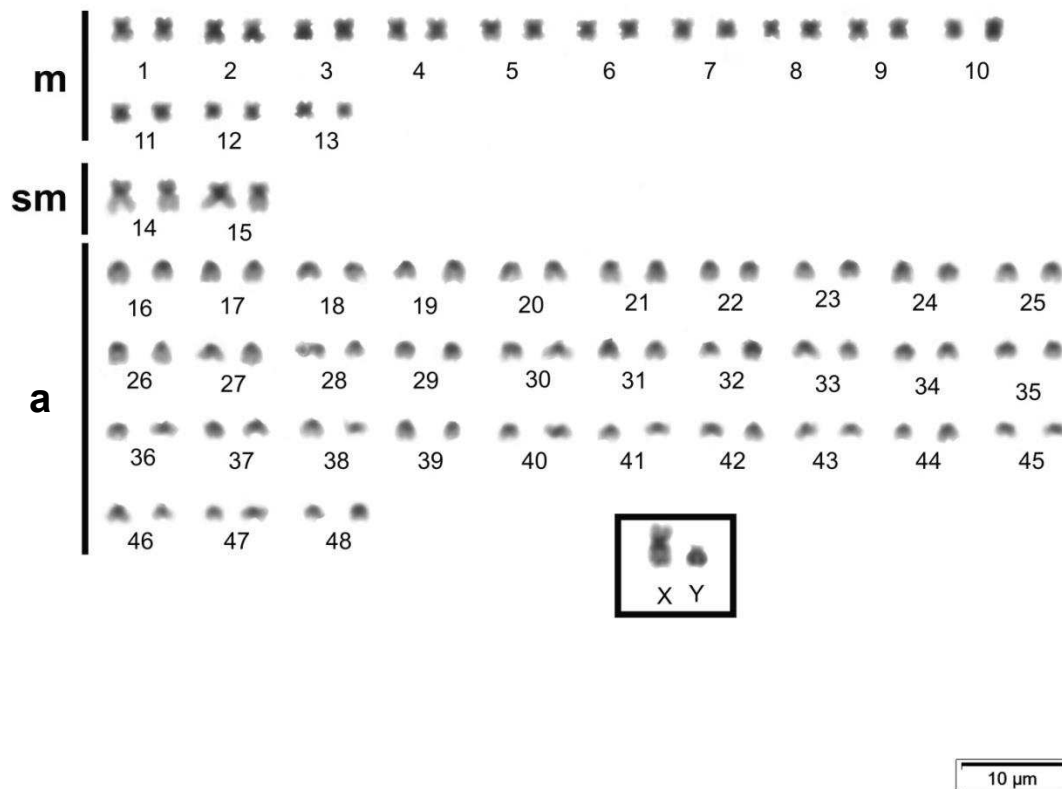


Figura 3 – Cariótipo de macho de *Kannabateomys amblyonyx* (MZUFV 4229) após bandeamento C, evidenciando as regiões heterocromáticas.

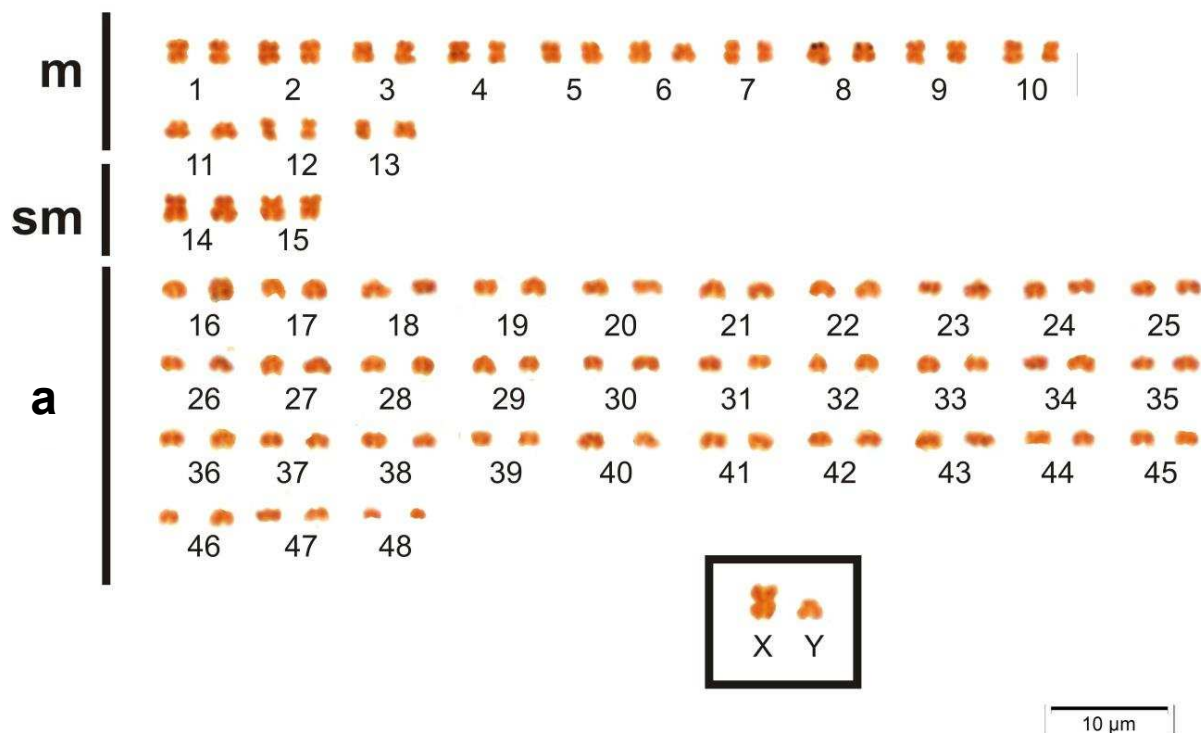


Figura 4 – Cariótipo de macho de *Kannabateomys amblyonyx* (MZUFV 4229) submetido à técnica Ag-NOR. Regiões organizadoras de nucléolo presentes no par 8 metacêntrico.

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) apresentou padrões de DNA repetitivo que variaram parcialmente entre as sondas, com marcações intersticiais próximas ao centrômero em diferentes pares cromossômicos. A sonda GA₍₁₅₎ (Figura 5) apresentou marcações em 17 pares acrocêntricos, enquanto que a sonda CA₍₁₅₎ (Figura 6) em 20 pares e a CAA₍₁₀₎ (Figura 7) em apenas três pares. Foi possível observar marcações co-localizadas nos pares 17, 18, 20, 23, 24, 28, 30, 33, 34, 35, 38, 47 com as sondas GA₍₁₅₎ e CA₍₁₅₎, nos pares 31 e 43 com as sondas CA₍₁₅₎ e CAA₍₁₀₎ e nos pares 1 metacêntrico (ambos os braços) e 18 telocêntrico com as três sondas. A sonda CAA₍₁₀₎ também marcou o braço longo do par 7 metacêntrico.

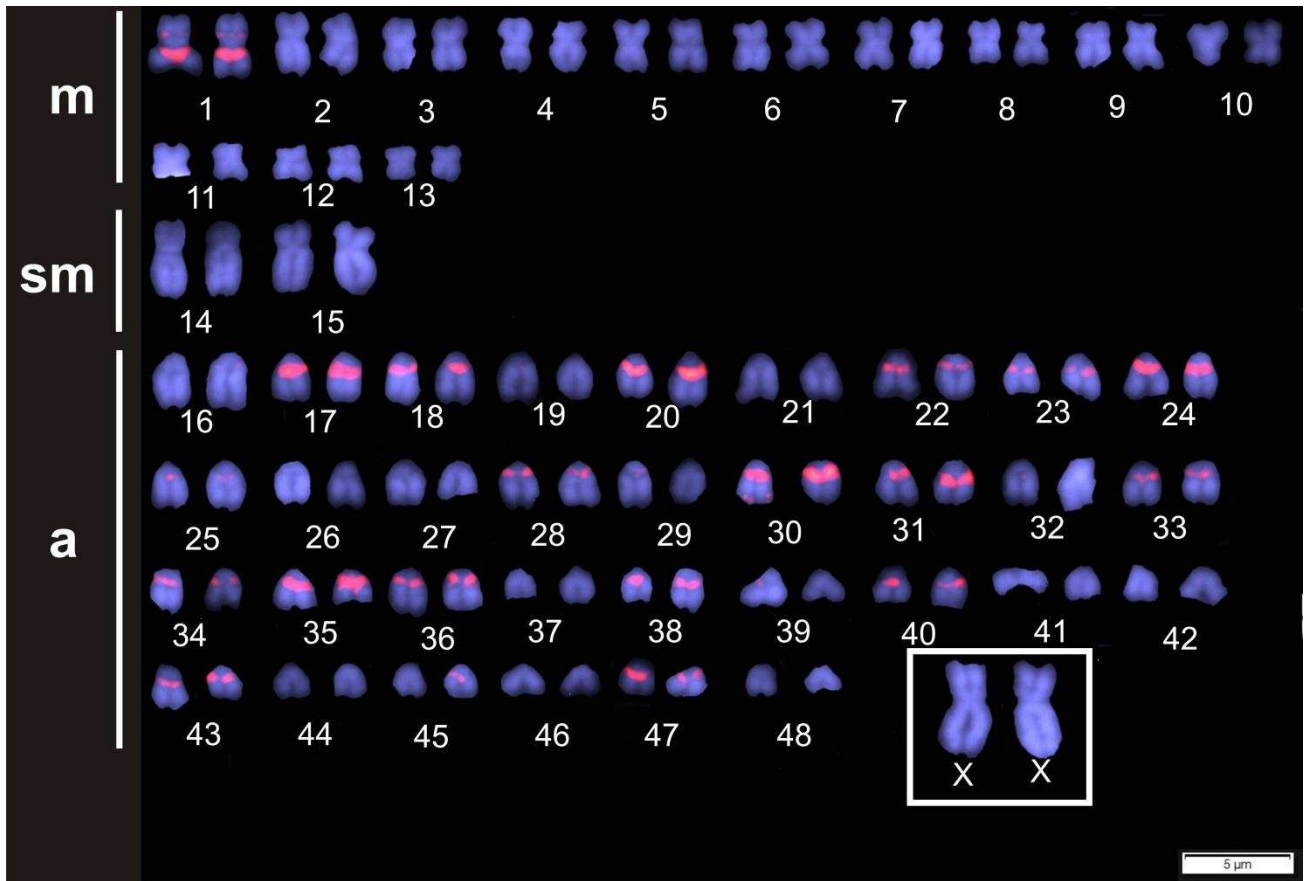


Figura 5 – Cariótipo de fêmea de *Kannabateomys amblyonyx* (MZUFV 4228) após FISH com a sonda GA₍₁₅₎.

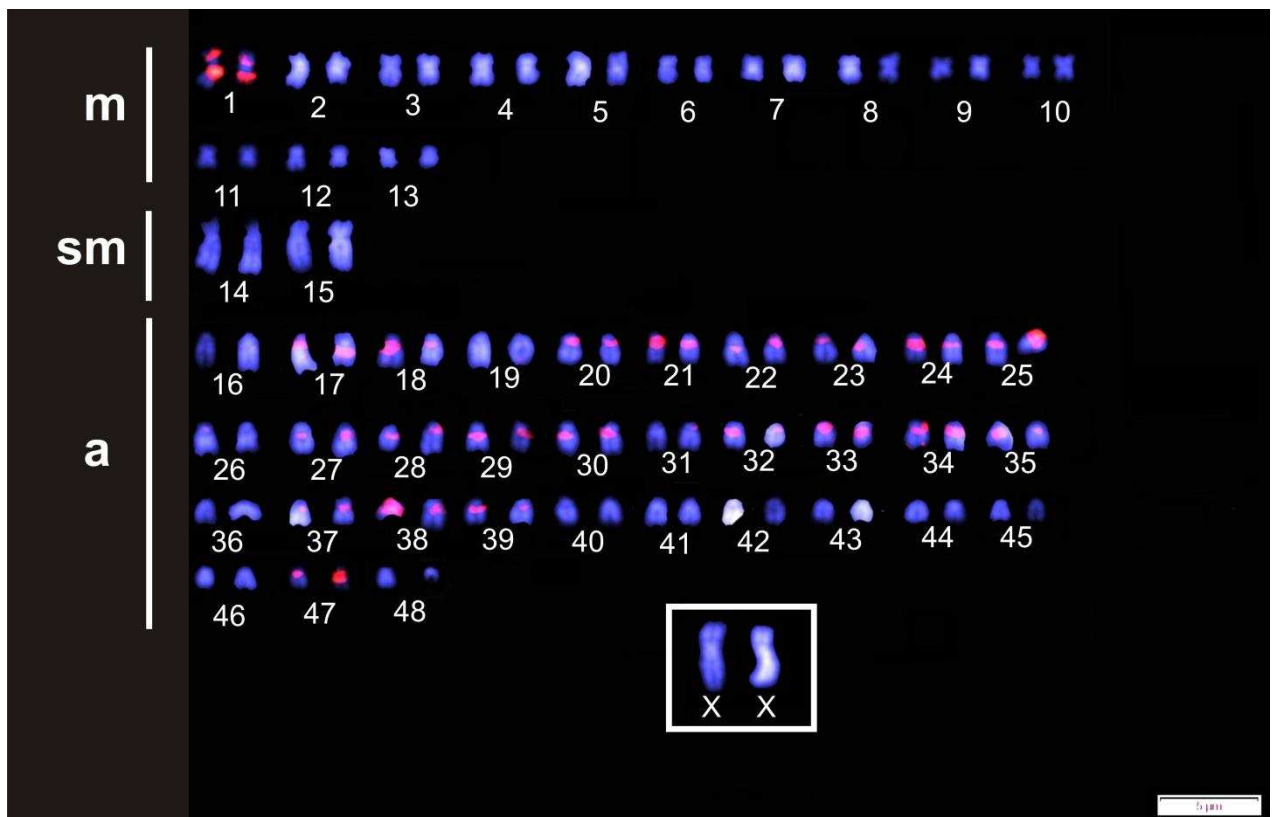


Figura 6 – Cariótipo de fêmea de *Kannabateomys amblyonyx* (MZUFV 4228) após FISH com a sonda CA₍₁₅₎.

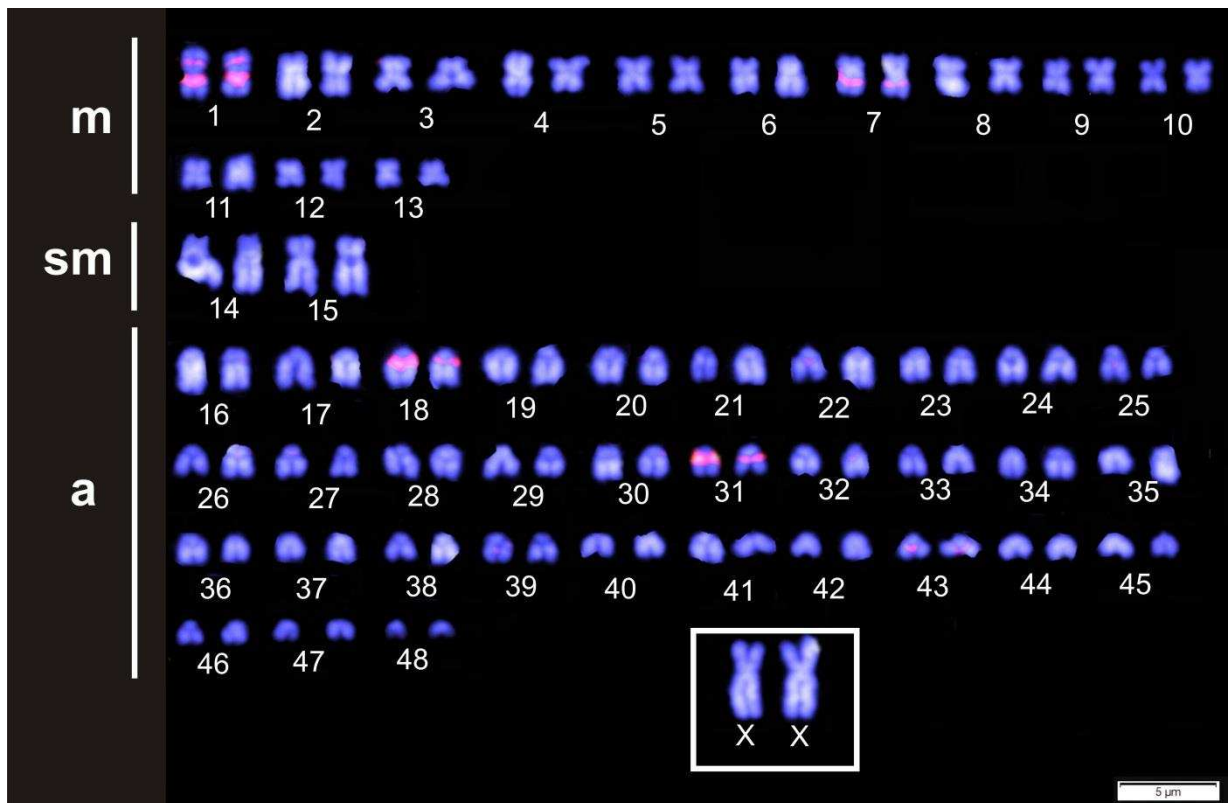


Figura 7 – Cariótipo de fêmea de *Kannabateomys amblyonyx* (MZUFV 4228) após FISH com a sonda CAA₍₁₀₎.

DISCUSSÃO:

Kannabateomys amblyonyx possui um elevado número diplóide ($2n=98$, NF=126), característico da subfamília Dactylomyinae. DUNNUM (2001) e ANISKIN (1993) descreveram os cariótipos de *Dactylomys boliviensis* ($2n=118$, NF=168) e *D. dactylinus* ($2n=94$, NF=144) respectivamente, as duas únicas espécies que ocorrem no Brasil desta subfamília além de *K. amblyonyx*. *D. boliviensis* apresenta 26 pares de meta/submetacêntricos e 32 pares de acrocêntricos, enquanto *D. dactylinus* possui 25 pares meta/submetacêntricos e 22 pares de acrocêntricos. Outras espécies de Echimyidae (Figura 1B) também apresentam números diploides elevados, porém bem menores que o observado em *K. amblyonyx*, como ocorre nos gêneros *Phyllomys* ($2n=50$, NF=94 em *P. blainvillii* até $2n=96$ *P. medius*) (LEITE et al., 2008), *Isothrix* ($2n=60$, NF=112 em *I. negrensis* e $2n=60$, NF=116 em *I. bistriata*) (BONVICINO et al., 2003), *Lonchothrix emiliae* ($2n=60$, NF=116) (ANISKIN, 1993) e *Makalata didelphoides* ($2n=66$, NF=106) (LIMA et al., 1998). A alta variabilidade entre os

números diploides e fundamentais dentro desta família permite que os mesmos sejam utilizados como marcadores para diagnóstico de novas espécies (VENTURA et al., 2008).

ANISKIN (1993) não conseguiu definir os cromossomos sexuais em *D. dactylinus*, e DUNNUM (2001) classificou o X como um grande submetacêntrico e o Y como um pequeno submetacêntrico em *D. boliviensis*, diferentes dos identificados no presente estudo para *K. amblyonyx*: o cromossomo X é o maior metacêntrico e o Y é um cromossomo acrocêntrico. Nos mamíferos, o cromossomo X compreende cerca de 5% do genoma, com a presença de dois braços e raramente é de tamanho reduzido, sendo muitas vezes o maior do cariótipo, característica comum na subordem Hystricomorpha, como em *Phyllomys lamarum* (ARAÚJO et al., 2013), *Kerodon rupestres* (LESSA et al., 2013) e *Kerodon acrobata* (ZAPPES et al., 2014).

Em *Kannabateomys amblyonyx*, a maioria dos pares cromossômicos apresenta apenas um braço. Essa característica ocorre em espécies de Echimyidae com números diploides elevados. *Phyllomys sulinus* ($2n=92$, NF=102, 6sm/m+39a) (LEITE et al., 2008), *Proechimys guyannensis* ($2n=46$, NF=50, 3m/sm+19a) (SILVA et al., 2012) e *Dactylomys boliviensis* ($2n=118$, NF=168, 26m/sm+32a) (DUNNUM, et al., 2001), possuem a maioria dos pares telocêntricos, enquanto que espécies com números diploides menores possuem um número maior de pares meta/submetacêntricos, como ocorre em *Phyllomys lamarum* ($2n=56$, NF=102, 24m/sm+3t) (ARAÚJO et al., 2013) e *Proechimys cuvieri* ($2n=28$, NF=46, 9m/sm+1st+3t) (E SILVA et al., 2012).

Padrões de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas são comuns dentro de Echimyidae (ARAÚJO et al., 2013; BEZERRA et al., 2012; FAGUNDES et al., 2004; PESSÔA et al., 2004). Enquanto *K. amblyonyx* possui regiões heterocromáticas em todos os cromossomos, *D. dactylinus* possui heterocromatina apenas em três pares metacêntricos, um par submetacêntrico e 19 pares acrocêntricos (ANISKIN, 1993). Rearranjos cromossômicos, como fissões/fusões cromossômicas e adições/deleções de heterocromatina são fatores importantes de especiação, atuando no isolamento reprodutivo de populações (STEFANSSON et al., 2005; HOFFMANN e RIESEBERG, 2008), e é evidente em espécies de roedores (ARAÚJO et al., 2013; BARROS et al., 2009; BEZERRA et al., 2012). Acreditava-se que a evolução cromossômica dentro de Echimyidae era consequência de principalmente translocações robertsonianas, já que na família existe uma alta variabilidade nos números diploides dos indivíduos e uma pequena diferença nos valores de números fundamentais. Porém,

DUNNUM (2001), a partir de uma análise estatística dos cariótipos, definiu que há uma diferença significativa entre os valores de números fundamentais, hipotetizando que inversões para/pericentroméricas também podem ter sido importantes na evolução cariotípica desta família.

Tipicamente, regiões de Ag-NOR estão associadas a constrições secundárias e ocorrem em somente um par cromossômico nos Echimyidae (VILELA et al., 2009). A presença de regiões de Ag-NOR intersticiais, seja no braço curto ou longo, pode ser considerada como uma característica plesiomórfica dentro da família, ocorrendo em gêneros mais distantes dentro dos equimídeos como *Thrichomys* (PESSÔA et al., 2004; ver Artigo I presente), *Phyllomys* (ARAÚJO et al., 2013) e *Euryzygomatomys* (VILELA et al., 2009). Em *K. amblyonyx* esse padrão intersticial não é observado, com a RON presente na porção distal do par metacêntrico 8, característica incomum dentro da família, que também pode ser observada em *Proechimys longicaudatus* (MACHADO et al., 2005) e, com base em dados moleculares (GALEWSKI, 2005), pode-se afirmar que esse caráter é homoplástico.

DNAs microssatélites são sequências simples e repetitivas em *tandem*, possuindo um tamanho reduzido (de 1-6 nucleotídeos) (GUERRA, 2005). Geralmente, DNAs microssatélites estão associados a regiões heterocromáticas no genoma (teloméricas, centroméricas e nos cromossomos sexuais) de diferentes grupos de vertebrados (CIOFFI et al. 2011; POKORNÁ et al., 2011; SUPIWONG et al., 2013), ou a regiões de Ag-NOR (VANZELA et al., 2002), ou mesmo podem se distribuir por todo o cromossomo, tanto em regiões heterocromáticas como eucromáticas (CIOFFI et al., 2012). CIOFFI e colaboradores (2012), analisando padrões de fluorescência de sondas de DNAs repetitivos nos cromossomos sexuais de duas espécies de peixes (*Leporinus reinhardti* e *Triportheus auritus*), observaram que somente em alguns casos, as sondas se acumulavam em regiões heterocromáticas. Em *K. amblyonyx*, todas as sondas utilizadas ($GA_{(15)}$, $CA_{(15)}$ e $CAA_{(10)}$) apresentaram marcações intersticiais nos pares de cromossomos autossômicos, estando ausentes no par sexual, sendo mais comuns nos pares telocêntricos e em locais próximos às regiões heterocromáticas. A presença das sondas em ambos os braços do par 1 obtidas com todas as sondas e no braço maior no par 7 obtidas com a sonda $CAA_{(10)}$ podem indicar possíveis fusões cromossômicas na história evolutiva de *K. amblyonyx*, devido ao fato de as mesmas serem mais comuns nos cromossomos acrocêntricos. Evolutivamente, uma maior concentração de DNA repetitivo nos cromossomos pode preceder uma futura heterocromatinização da região,

o que justifica a presença de DNAs microssatélites associados a regiões eucromáticas (CIOFFI et al., 2012).

Nos genomas de diferentes vertebrados, DNAs repetitivos (satélites, minissatélites, microssatélites e elementos transponíveis) possuem uma distribuição diversificada (GAO et al., 2009; VANZELA, 2002). Estudos com sondas de mono, di e trinucleotídeos são pouco comuns dentro de Rodentia, sendo mais comum a utilização de sequências repetitivas específicas do genoma de um determinado táxon (ACOSTA et al., 2010; KARAMYSHEVA et al., 2010). As sondas utilizadas aqui são mais frequentes em estudos com peixes, plantas e répteis (CIOFFI et al., 2011; POKORNÁ et al., 2011; KUBAT et al., 2008). As sondas GA₍₁₅₎, CA₍₁₅₎ e CAA₍₁₀₎ apresentaram diferentes acúmulos no peixe *Hoplias malabaricus* (CIOFFI et al., 2011), na planta *Silene latifolia* (KUBAT et al., 2008) e nos lagartos *Coleonyx elegans* e *Eremias velox* (POKORNÁ et al., 2011). Enquanto em *H. malabaricus*, as sondas se acumularam principalmente nas regiões subteloméricas dos cromossomos no cariótipo, em *C. elegans*, *E. velox* e *S. latifolia*, as mesmas apresentaram fluorescência uniforme ao longo de todos os cromossomos, resultados que diferem dos encontrados para o roedor *K. amblyonyx*.

Em roedores, estudos com DNA repetitivo geralmente incluem a utilização de sondas teloméricas e de DNA ribossômico 18S (ARAÚJO et al., 2013; FAGUNDES et al., 2004; SUÁREZ-VILLOTA et al., 2014). A utilização de sondas teloméricas em trabalhos com vertebrados são eficazes, pois indicam possíveis rearranjos cromossômicos durante a evolução de diferentes espécies, a partir da presença/ausência de marcações teloméricas em posição intersticial (SUPIWONG et al., 2013). Em Echimyidae, somente cinco espécies (*Proechimys gr. longicaudatus*, *Proechimys gr. goeldii*, *Trinomys iheringi*, *Phyllomys lamarum* e *Phyllomys sp.*) foram tratadas com sondas teloméricas até o momento (AMARAL et al., 2013; ARAÚJO et al., 2013; FAGUNDES et al., 2004; MACHADO et al., 2005). Somente em *P. lamarum* e *Phyllomys sp.* foi possível observar a presença de marcações intersticiais nos cariótipos amostrados, sugerindo rearranjos cromossômicos para as espécies do gênero (ARAÚJO et al., 2013).

As diferenças cariotípicas observadas entre *K. amblyonyx* da Mata Atlântica e as espécies do gênero-irmão, *Dactylomys*, da região amazônica, podem ter sido fixadas como parte do processo de especiação alopátrica entre as espécies dos dois biomas. A linhagem dos Echimyidae arborícolas possivelmente surgiu a partir de uma população

de ratos-de-espinho ancestral que ocupava uma vasta floresta contínua na América do Sul, anterior às florestas Amazônica e Atlântica, há aproximadamente 5 milhões de anos (LEITE e PATTON, 2002). GALEWSKI et al. (2005), utilizando relógios moleculares, observaram que o tempo de divergência de gêneros amazônicos *Echimys* e *Dactylomys* e os de Mata Atlântica *Kannabateomys* e *Phyllomys* (10,3 a 3,1 Ma para o clado *Echimys* + *Phyllomys* e 9,5 a 3,1 Ma para o clado *Kannabateomys* + *Dactylomys* – Figura 1B) coincidem com a diminuição do nível das águas durante o final do Terciário (HAQ et al., 1987). Esta redução pode ter sido fruto de alterações climáticas responsáveis pela diminuição de áreas florestadas na região leste Sul-Americana (GALEWSKI et al., 2005). O corredor seco de áreas abertas na região central brasileira (Cerrado e Caatinga atuais) representou uma importante barreira à migração de espécies de Echimyidae entre a Amazônia e a Mata Atlântica (COSTA, 2003), sendo um possível evento de vicariância na diversificação de *K. amblyonyx*.

Os resultados aqui obtidos ampliaram o conhecimento citogenético de *Kannabateomys amblyonyx*, utilizando pela primeira vez técnicas de hibridização fluorescente *in situ* com DNAs microssatélites na família Echimyidae, permitindo comparações citogenéticas com grupos mais próximos. Para se ter uma compreensão real do que acontece com esta espécie, será necessário ampliar estas análises bem como a utilização de sondas teloméricas, para exemplares oriundos de localidades ao longo da sua distribuição geográfica. Tais resultados serão importantes para melhor entendimento taxonômico e evolutivo da espécie, com a descrição de possíveis citótipos e de padrões cariotípicos não apresentados no presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ACOSTA, M. J. et al. 2010. Characterization of the satellite DNA Msat-160 from species of *Terricola (Microtus)* and *Arvicola (Rodentia, Arvicolinae)*. **Genetica**, v. 138, p. 1085–1098.

AMARAL, P. J. S. et al. 2013. *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae): characterization and taxonomic considerations of a form with a very low diploid number and a multiple sex chromosome system. **BMC Genetics**, v. 14, p. 21.

AGUIAR, F. 2014. Estudo das variações intra e interpopulacional em caracteres cranianos de *Kannabateomys amblyonyx* (WAGNER, 1845) (Rodentia:Echimyidae). **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

AGUIAR, F; QUINTELA, F. M.; GONZÁLEZ, C. A. & LESSA, G. 2013. Redescoberta de *Kannabateomys amblyonyx* (Wagner, 1845) em sua localidade tipo e revisão sobre a distribuição geográfica. **Anais do XI Congresso de Ecologia do Brasil**, Porto Seguro, BA.

ANISKIN, V. M.1993. Three new karyotypes of prickly chinchillas of the family Echimyidae (Rodentia). **Genetika**, v. 29, p. 1500-1507.

ARAÚJO, N. P. DE et al. 2013. New karyotypes of Atlantic tree rats, genus *Phyllomys* (Echimyidae, Rodentia). **Genome**, v. 8, p. 1–8.

BARROS, M. C. et al. 2009. Molecular phylogenies, chromosomes and dispersion in Brazilian akodontines (Rodentia, Sigmodontinae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 99,p. 373–380.

BEZERRA, A. M. R. et al. 2012. A new karyotype for the spiny rat *Clyomys laticeps* (Thomas, 1909) (Rodentia, Echimyidae) from Central Brazil. **Comparative Cytogenetics**, v. 6,p. 153–161.

BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A DE. 2008. **Guia dos roedores do Brasil , com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS,v. 15, 120 p.

BONVICINO, C. R.; OTAZU, I. B.; D´ANDREA, P. S. 2002. Karyologic evidence of diversification of the genus *Thrichomys* (Rodentia, Echimyidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 97, p. 200–204.

BONVICINO, C. R.; MENEZES, A. R. E. A. N.; OLIVEIRA, J. A. 2003. Molecular and karyologic variation in the genus *Isothrix* (Rodentia, Echimyidae). **Hereditas**, v. 139, p. 206-211.

CIOFFI, M. B. et al. 2012. The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. **Molecular Cytogenetics**, v. 5, 7 p.

CIOFFI, M. B.; KEJNOVSKY, E.; BERTOLLO, L. A C. 2011. The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, p. 289–296.

CORRÊA, M. M. O. et al. 2005. The Karyotypes of *Trinomys moojeni* (Pessoa, Oliveira & Reis 1992) and the *Trinomys setosus elegans* (Lund, 1842) (Rodentia, Echimyidae) from Minas Gerais, eastern Brazil. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 63, p. 169–174.

COSTA, L.P., 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, v. 30, p. 71–86.

DUNNUM, J. L.; SALAZAR-BRAVO, J.; YATES, T. L. 2001. The Bolivian bamboo rat, *Dactylomys boliviensis* (Rodentia: Echimyidae), a new record for chromosome number in a mammal. **Mammalian Biology**, v. 66, p. 121-126.

SILVA, C. E. F. e et al. 2012. Karyological analysis of *Proechimys cuvieri* and *Proechimys guyannensis* (Rodentia, Echimyidae) from central Amazon. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 88–94.

FAGUNDES, V.; MENDES, S. L. ; YONENAGAYASSUDA, Y. 2001 .Descrição do cariótipo do rato da taquara (*Kannabateomys amblyonyx*) do Espírito Santo com 2n=98: o maior número diplóide de um roedor brasileiro. **Anais do 47 Congresso Nacional de Genética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, v. 1, p. 580-580.

FAGUNDES, V.; CAMACHO, J. P. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 2004. Are the dot-like chromosomes in *Trinomys iheringi* (Rodentia, Echimyidae) B chromosomes? **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 159–164.

FORD C.E.; HAMERTON J.L. 1956. The chromosomes of man. **Nature**. v. 178, p. 1020–1023.

GALEWSKI, T. et al. 2005. Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): A phylogenetic and chronological approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 34, p. 601–615.

GAO, H. et al. 2009. Discrepancy variation of dinucleotide microsatellite repeats in eukaryotic genomes. **Biological Research**, v. 42, p. 365–375.

GONZALEZ, S.; BRUMZORRILA, N. 1995. Karyological studies of the South-American rodent *Myocastor coypus* (Molina, 1782) (Rodentia, Myocastoridae). *Revista Chilena de História Natural*, v.68, p. 215-226.

GUERRA, M. 2005. Hibridização in situ: Princípios Básicos. **In: FISH, Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p 1-32.

HAQ, B.U., HARDENBOL, J., VAIL, P.R., 1987. Chronology of Xuctuating sea levels since the Triassic. **Science**, v. 235, p. 1156–1167.

HOFFMANN A. A.; RIESEBERG L. H. 2008. Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 39, p 21-42.

HOWELL W. M.; BLACK, D. A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 439, p. 1014-1015.

JENTINK, F. A. 1891. On *Dactylomys dactylinus* and *Kannabateomys amblyonyx*. **Notes from the Leyden Museum**, v. 8, p. 105-111.

KARAMYSHEVA, T. V et al. 2010. Comparative FISH analysis of C-positive blocks of centromeric chromosomal regions of pygmy wood mice *Sylvaemus uralensis* (Rodentia, Muridae). **Russian Journal of Genetics**, v. 46, p. 712–724.

KUBAT, Z. et al. 2008. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome / National Research Council Canada**, v. 51, p. 350–356.

LEITE, Y. L. R.; PATTON, J. L. 2002. Evolution of South American spiny rats (Rodentia, Echimyidae): the star-phylogeny hypothesis revisited. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, p. 455–464.

LEITE, Y. L. R.; CHRISTOFF, A. U.; FAGUNDES, V. 2008. A New Species of Atlantic Forest Tree Rat, Genus *Phyllomys* (Rodentia, Echimyidae) from Southern Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 89, p. 845–851.

LESSA, G. et al. 2013. Chromosomal differentiation in *Kerodonrupestris* (Rodentia: Caviidae) from the Brazilian semi-arid region. **Mastozoología Neotropical**, v. 20, p. 399–405.

LEVAN A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosome. **Hereditas**, v. 1, p. 201–220.

LIMA, J. F. S.; LANGGUTH, A.; SOUZA, L. C. 1998. The karyotype of *Makalata didelphoides* (Rodentia, Echimyidae). **Z Säugetierkunde**, v. 63, p. 315–318.

MACHADO, T. et al. 2005. Nine karyomorphs for spiny rats of the genus *Proechimys* (Echimyidae, Rodentia) from North and Central Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 682–692.

MONTEZ, L. B. 2010. Johann Natterer e a situação singular de seu legado textual: propostas para uma análise crítica e ideológica de seus discursos a cerca do homem brasileiro. **3 Congresso Nacional de Letras Artes & Culturas**, UFSJ, São João Del Rei, MG, p. 701-709.

PARESQUE, R.; SOUZA, W. P.; MENDES, S. L.; 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**, v. 17, p. 5-33.

PESSÓA, L. M.; DE OLIVEIRA, J. A.; LOPES, M. O. G. 2004. Karyological and morphometric variation in the genus *Thrichomys* (Rodentia: Echimyidae). **Mammalian Biology**, v. 69, p. 258–269.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 2934–2938.

POKORNÁ, M.; KRATOCHVÍL, L.; KEJNOVSKÝ, E. 2011. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). **BMC Genetics**, v. 12, p. 1–7.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A. & LIMA, I. P. 2011. **Mamíferos do Brasil**. 2 ed, Londrina: Nélío R. dos Reis, 441 p.

SARTI, P. T.; SILVA, R. B.; VIEIRA, E. M. 2012. Daily activity patterns of the Atlantic bamboo rat (*Kannabateomys amblyonyx*) in southern Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 7, p. 108–113.

SILVA, F. A. DA et al. 2012. Distribuição e conservação do rato-do-bambu *Kannabateomys amblyonyx* (Rodentia, Echimyidae) no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 7, p. 21–25.

SILVA, R. B.; VIEIRA, E. M.; IZAR, P. 2008. Social monogamy and biparental care of the neotropical southern bamboo rat (*Kannabateomys amblyonyx*). **Journal of Mammalogy**, v. 89, p. 1464–1472.

STEFANSSON H. et al. 2005. A common inversion under selection in Europeans. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p 129–137.

SUÁREZ-VILLOTA, E. Y. et al. 2014. Homomorphic Sex Chromosomes and the Intriguing Y Chromosome of *Ctenomys* Rodent Species (Rodentia, Ctenomyidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 143, p. 232–240.

SUMNER A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 604-306.

SUPIWONG, W.; LIEHR, T.; CIOFFI, M. B. 2013. Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). **Cytogenetics**, v. 6, p. 1-7.

VANZELA, A. L. L. et al. 2002. Differential distribution of (GA)₉ + C Microsatellite on Chromosomes of Some Animal and Plant Species. **Cytologia**, v. 67, p. 9-13.

VANZOLINI, P. E. 1993. As viagens de Johann Natterer no Brasil, 1817-1835. **Papeis Avulso de Zoologia**, v. 38, p. 17-60.

VENTURA, K. et al. 2008. Karyotypic analyses and morphological comments on the endemic and endangered Brazilian painted tree rat *Callistomys pictus* (Rodentia, Echimyidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 697-703.

VILELA, R. V et al. 2009. The taxonomic status of the endangered thin-spined porcupine, *Chaetomys subspinosus* (Olfers, 1818), based on molecular and karyologic data. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p. 1-17.

YONENAGA-YASSUDA, Y. 2005. Contribuição da FISH à citogenética de mamíferos e répteis. **In: FISH, Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p 89-114.

ZAPPES, I.; PORTELLA, A.; LESSA, G. 2014. Description of Karyotype of *Kerodonacrobata*, an endemic rodent in Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, p. 251-256.

5. CONCLUSÕES GERAIS:

1. Exemplares de *Thrichomys apereoides* provenientes de Lagoa Santa (MG) apresentaram padrões citogenéticos similares (número diplóide, fundamental, fórmula cromossômica e regiões de Ag-NOR) aos já descritos em estudos anteriores para outras localidades;
2. A caracterização das regiões heterocromáticas obtidas em exemplares oriundos da localidade tipo de *T. apereoides* indicaram resultados similares aos da literatura, porém uma análise mais detalhada dos animais de Lagoa Santa mostrou a ausência de heterocromatina na região pericentromérica do cromossomo X;
3. A partir da hibridização *in situ* (FISH), regiões de acúmulo de diferentes tipos de DNAs microssatélite foram demonstradas em exemplares provenientes de Lagoa Santa (MG), fato que contribui para incrementar a descrição citogenética da espécie;
4. Após um longo tempo, novos dados citogenéticos de *Kannabateomys amblyonyx* são apresentados, complementando estudos anteriores;
5. Pela primeira vez, estudos de DNAs microssatélite são realizados em *K. amblyonyx*, ampliando o conhecimento cariotípico destes mamíferos;
6. Devido à raridade de estudos com DNAs microssatélites mono, di e trinucleotídicos em mamíferos, estudos utilizando os mesmos se tornam importantes para a descrição de padrões espécie-específicos de distribuição de sequências repetitivas.