

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**VARIAÇÃO CROMOSSÔMICA EM *CTENOMYS MINUTUS* AO LONGO DA  
SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA**

*Cristina Claumann Freygang*

*Orientador: Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de mestre

PORTO ALEGRE

FEVEREIRO/2002

*"A miúdo, a simples colocação de um problema é muito mais essencial que a sua solução, que pode ser apenas uma questão de habilidade matemática ou experimental. Fazer novas perguntas, suscitar novas possibilidades, ver velhos problemas, mas sob novo ângulo, são coisas que exigem imaginação criadora e possibilitam verdadeiros adiantamentos na ciência"*

**Albert Einstein**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Dr. Thales, por acreditar em meu potencial, compartilhando comigo este trabalho, parte de um trabalho muito maior e tão importante na sua vida, trazendo questões interessantes e novas idéias a quem só está começando na vida científica, e claro, por sua enorme paciência;

Ao Jorge R. Marinho Msc. e ao Ci, pela ajuda nas coletas;

A Vanina, por estar sempre pronta a ajudar, perdendo muitas horas ajudando no preparo dos animais ou então, pegando um cineminha;

A Prof. Margarete e a Jaque, pela troca de idéias e experiências no decorrer do trabalho e pela valiosa ajuda com o FISH;

Ao prof. Dr. Eduardo Diaz, pelo fornecimento da placa de hibridização e aos profs. Malabarba e Dillenburg pelos esclarecimentos ;

Ao prof. Sérgio L. Althoff Msc. e ao meu amigo Guilherme, pelo preparo das peles e crânios;

A Renata Freitas, pela ajuda com o inglês;

A Juliana pela revisão do trabalho;

Aos colegas: Adriana Gava, Camila Castilho, Camila Rocha, Elise, Gabriela, Leandro, Lígia, Lucas, Tati, Tarik, Vanessa, a todos colegas do lab. 108 e aos muitos amigos da Genética;

A Lúcia e ao Luciano por toda ajuda e bate-papo;

Ao Elmo por todos os galhos quebrados e pela enorme paciência ;

Ao CNPq, pelo fornecimento da bolsa, a PROPESQ, a FINEP e ao Projeto Tuco Tuco pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular,

A minha família por tudo;

Aos muitos que ajudaram e que não foram citados aqui, devido a caduquice de uma mente estressada;

E principalmente, aos tucos, que me mostraram novas formas de pensar sobre as coisas da vida ...

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>III</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM EVOLUÇÃO DE MAMÍFEROS.....	1
1.2. A FAUNA SUL-AMERICANA E O SURGIMENTO DO GÊNERO <i>CTENOMYS</i> .....	5
1.3. O GÊNERO <i>CTENOMYS</i> .....	7
1.4. <i>CTENOMYS MINUTUS</i> NEHRING, 1887.....	10
1.5. ZONAS DE HIBRIDAÇÃO E <i>CTENOMYS MINUTUS</i> .....	12
1.5. <i>CTENOMYS MINUTUS</i> E CONSERVAÇÃO.....	14
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>18</b>
3.1. <i>ÁREA DE ESTUDO</i> .....	18
3.2. <i>COLETA DE DADOS EM CAMPO</i> .....	19
3.3. <i>MÉTODOS CITOGENÉTICOS</i> .....	20
3.3.1. <i>Obtenção de cromossomos mitóticos</i> .....	20
3.3.2. <i>Obtenção de cromossomos meióticos</i> .....	21
3.4. <i>MARCAÇÕES CROMOSSÔMICAS</i> .....	21
3.4.1. <i>Bandamento C</i> .....	21
3.4.2. <i>Bandamento G</i> .....	22
3.4.3. <i>Bandamento NOR</i> .....	22
3.4.4. <i>Hibridização in Situ (FISH)</i> .....	23
3.5. <i>ANÁLISE DOS DADOS CITOGENÉTICOS</i> .....	25
3.6. <i>ANÁLISE FILOGENÉTICA</i> .....	25
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
4.1. <i>DESCRIÇÃO DOS CITÓTIPOS</i> .....	27
4.1.1. <i>Tavares (31°23'S51°09'W)</i> .....	28
4.1.2. <i>Tavares 2 (31°25'S51°10'W)</i> .....	28

4.1.3. <i>Bojuru</i> (31°38'S51°26'W).....	28
4.1.4. <i>Bojuru 2</i> (31°44'S51°34'W e 31°45'S51°35'W).....	29
4.1.5. <i>São José do Norte</i> (31°52'S51°53'W).....	29
4.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS CARIÓTIPOS DE <i>C. MINUTUS</i> .....	31
4.3. BANDAMENTO G E COMPARAÇÃO COM OS OUTROS CARIÓTIPOS JÁ DESCRITOS.....	31
4.4. BANDAMENTO C.....	32
4.5. BANDAMENTO NOR.....	37
4.6. MEIOSE.....	37
4.7. FLUORESCENCE <i>IN SITU</i> HIBRIDIZATION – FISH.....	37
4.8. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	41
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
5.1 BANDAMENTO G.....	44
5.2. ANÁLISE DA HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA (HC).....	44
5.3. REGIÃO ORGANIZADORA DE NUCLÉOLOS – NOR.....	47
5.4. MEIOSE.....	47
5.5. TÉCNICA DE FISH.....	49
5.6. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ZONAS HÍBRIDAS ENCONTRADAS.....	50
5.7. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	53
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Distribuição geográfica das quatro espécies de *Ctenomys* ocorrentes no estado do Rio Grande do Sul..... 9
- Figura 2: a) Espécime de *Ctenomys minutus*. b) Mesmo indivíduo, na entrada de sua toca .....11
- Figura 3: Foto do ponto localizado no município de São José do Norte – RS, mostrando as características de um campo habitado por *Ctenomys minutus*..... 19
- Figura 4: Planície costeira do estado do Rio Grande do Sul, com destaque para a região de estudo. Ponto 01: Tavares I, Ponto 02: Tavares II, Ponto 03: Bojuru I, Ponto 04: Bojuru II, 05: São José do Norte..... 27
- Figura 5: Cariótipos em coloração convencional. a)  $2n=46b$  b)  $2n=48b$  c)  $2n=50b$  d)  $2n=47b$  e)  $2n=49b$ . Os asteriscos em b e d indicam o par heterozigoto..... 30
- Figura 6: Variação cariotípica encontrada em *C. minutus* ao longo de sua distribuição geográfica .....31
- Figura 7: Bandamento G obtido para  $2n=50b$ ..... 33
- Figura 8: Comparação entre os cariótipos  $2n=50b$ ,  $48b$  e  $46b$ , encontrados entre Tavares e São José do Norte e os demais, já descritos para *Ctenomys minutus*.  $2n=50a$ ,  $48a$ ,  $46a$  e  $42$  foram retirados de FREITAS (1997).....34
- Figura 9: Comparação entre os híbridos encontrados por FREITAS (1990, 1999) e GAVA (1996). 1a)  $2n=47a$ . 1b)  $2n=47b$ . 2a)  $2n=49a$  2b)  $2n=49b$ .....35
- Figura 10: Bandamento C obtido para *Ctenomys minutus*. a) Macho de  $2n=50b$ . As setas indicam as marcações e o triângulo indica o cromossomo Y. Cabe ressaltar aqui que  $2n=48b$ , possui o mesmo padrão de  $50b$ . b) Fêmea de  $2n=46b$  .....36.
- Figura 11: a) Bandamento NOR obtido para  $2n=50b$ . b)  $2n=48b$ . O mesmo padrão foi observado em  $2n=46b$ .....38

Figura 12: Diacinese (meiose I) de machos de <i>C. minutus</i> a). 2n=47b b) 2n=49b. Os dados foram obtidos a partir dos indivíduos CF 058 e CF 053 respectivamente.....	39
Figura 13: Marcações teloméricas obtidas por meio da técnica de FISH em 2n=50b.....	40
Figura 14: Árvore de consenso obtida a partir dos dados de bandamento cromossômico de <i>C. minutus</i> , utilizando <i>C. lami</i> como grupo externo (não representado). Os quadrados pretos e vazados representam homologias e homoplasias respectivamente e os números entre parênteses representam o estado do caracter.....	42
Figura 15: Mapa da planície costeira do Rio Grande do Sul, com destaque para a região da Barra Falsa. Retirado de TOLDO Jr. <i>et al.</i> (1991). .....	52
Figura 16: Distribuição geográfica dos cariótipos analisados e suas respectivas relações filogenéticas.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Citótipos de <i>C. minutus</i> encontrados entre os municípios de Tavares e São José do Norte - RS e seus respectivos pontos.....	29
Tabela 2: Descrição dos caracteres obtidos com a análise dos bandamentos realizados em <i>C. minutus</i> .....	41
Tabela 3: Matriz codificada dos dados obtidos pelos bandamentos G e C em <i>C. minutus</i> .....	41

## RESUMO

Os roedores fossoriais do gênero *Ctenomys* formam um grande grupo com 56 espécies, sendo os mamíferos dominantes da exploração do nicho subterrâneo neste continente. Apresentam grande variação cariotípica, com o número diplóide variando entre 10 em *C. steinbachi* a 70 em *C. pearsoni*.

Dentre as espécies observadas no sul do Brasil, *C. minutus* é a que apresenta a distribuição mais ampla, ocorrendo desde o município de Jaguaruna, em Santa Catarina até São José do Norte no estado do Rio Grande do Sul. Sete números diplóides e oito citótipos eram descritos anteriormente para a espécie, sendo eles:  $2n=42$ , 45, 46a, 46b, 47, 48, 49, 50a, apresentando, inclusive, zonas de hibridação entre  $2n=46-48$  e  $2n=48$  e 42.

Com o objetivo de caracterizar, descrever e comparar os citótipos encontrados com os demais descritos para a espécie, analisando-os filogeneticamente, uma amostra de 51 espécimes de *Ctenomys minutus* Nehring, 1887, foi coletada ao longo região da Planície Costeira do RS, entre os municípios de Tavares ( $31^{\circ}23'S$ ;  $51^{\circ}09'N$ ) e São José do Norte ( $31^{\circ}52'S$ ;  $51^{\circ}54'N$ ). Foram definidos cinco pontos de coleta ao longo da área de estudo, sendo os mesmos, distanciados cerca de 20km entre si.

O material foi obtido a partir de medula óssea (FORD & HAMERTON, 1956) e analisado por meio das técnicas de coloração convencional, bandamento G (SEABRIGTH, 1971), bandamento C (SUMNER, 1972), NOR (HOWELL & BLACK 1980) e o material de meiose, segundo FORD & EVANS (1959). Para a realização da técnica de FISH, utilizou-se o kit de sondas “todos os telômeros humanos” (ONCOR). A homeologia dos caracteres entre os diversos citótipos foi estabelecida através de bandamento G e C e os caracteres foram definidos conforme MODI (1987) e ORTELLS (1995). Para a análise filogenética utilizou-se o método de “outgroup”, sendo escolhido *C. lami* como grupo externo, pois, segundo FREITAS (2001) mais antigo em relação a *C. minutus*

A distribuição geográfica da espécie foi ampliada em cerca de 90km, passando o limite sul, do município de Tavares para o município de São José do

Norte. Cinco números diplóides e três citótipos foram encontrados,  $2n = 46b$ ,  $47b$ ,  $48b$ ,  $49b$  e  $50b$ , sendo que, apenas  $46b$  era descrito para a espécie.

Em todos os citótipos estudados, o par sexual está representado, nos machos, por um cromossomo X submetacêntrico e um cromossomo Y acrocêntrico de tamanho similar ao braço longo de seu par e nas fêmeas, por um par X submetacêntrico.

Comparando-se os padrões de bandas G dos cariótipos de *C. minutus* pode-se notar que  $2n=50a$ , encontrado em Jaguaruna apresenta os cromossomos 20 e 17 e que esses estão fusionados na forma  $2n=50b$  de São José do Norte. O par 2 está fissionado em  $2n=50b$ , sendo que apresenta ainda uma inversão pericentromérica que o transforma em um metacêntrico. Os cromossomos 23 e 19 são mantidos entre as formas e o mesmo acontece entre os cromossomos 22, 24 e 16. Os citótipos  $2n=48a$  e  $2n=48b$  apresentam os mesmos cromossomos, com exceção do braço curto 2p de  $2n=48b$ , que se apresenta na forma metacêntrica.

No que se refere aos híbridos,  $2n=47b$  difere de  $2n=47a$  pelo par heterozigoto, formado pelos cromossomos 24 e 16 em  $2n=47b$  e pelo par 2 em  $2n=47a$ . Já em  $2n=49a$  e  $2n=49b$  a diferença não está no par heterozigoto, formado pelos cromossomos 23 e 19, mas sim, no par 2, que encontra-se fusionado em  $2n=49a$  e fissionado com inversão em  $2n=49b$  e nos cromossomos 20 e 17, que encontram-se fissionados em  $2n=49a$  e fusionados em  $2n=49b$ .

Pouca quantidade de heterocromatina constitutiva foi encontrada no bandamento C dos três citótipos analisados. Somente três autossomos apresentaram um bloco de heterocromatina constitutiva, que ocupou todo o braço curto em  $48b$  e  $50b$  e apenas um autossomo em  $46b$ . Também o cromossomo Y nos machos, independente de seu citótipo, é totalmente positivo.

Em relação a NOR, todos os citótipos analisados apresentaram marcação na constrição secundária do braço longo do par marcador.

No que se refere à meiose, a aparente ausência de trivalentes em ambos os heterozigotos, aliada ao fato de que, em algumas diacineses, em vez da presença do número esperado de bivalentes mais o trivalente, observar-se um cromossomo a mais, pode indicar a presença de um univalente.

A seqüência telomérica foi observada em todas as extremidades dos cromossomos. Não foram observadas bandas teloméricas etópicas em  $2n=50b$ . Em  $2n=46b$  e  $48b$ , a desnaturação das metáfases não possibilitou a análise.

Para a análise filogenética, apenas cinco caracteres puderam ser analisados. A árvore de consenso separou os citótipos em três grupos: o mais basal representado apenas por 50a, outro por 46a, 48a e 42 e o terceiro, possuindo as características mais apomórficas, representado por 46b, 48b e 50b. O índice de consistência obtido foi de 0.71 e o índice de retenção foi de 0.75.

O caracter 01 (fusão 20/17) foi o principal responsável pela separação de 50a do restante dos citótipos. O grupo formado por 46b, 48b e 50b é apoiado por duas sinapomorfias, a do caracter 02 (fusão 2p/2q) e 05 (presença de heterocromatina no par marcador). O caracter 04 (fusão 22/24/16) representou uma autapormofia para seus respectivos citótipos.

A formação do grupo basal pode ser explicada pela presença do Rio Araranguá, que atuaria como uma barreira geográfica. Quanto à separação dos outros dois grupos, duas hipóteses puderam ser formuladas. Uma, explicada por fatores extrínsecos e outra por fatores intrínsecos. Como nenhuma barreira geográfica que explique a separação foi encontrada, a explicação alternativa é que os dois rearranjos 02 e 05, que dão suporte a um dos grupos, poderiam ser responsáveis pelo surgimento de uma barreira reprodutiva. Para testar essas duas hipóteses, contudo, mais estudos devem ser realizados.

Os achados indicam também a existência de duas novas zonas híbridas para a espécie, com, pelo menos uma delas, resultante de um contato secundário, após regressão do nível do mar e fechamento da ligação existente entre a lagoa dos Patos e o oceano, na feição atualmente denominada de Barra Falsa, na localidade de Bojuru, à cerca de 2.300 anos. Mais coletas devem ser realizadas para confirmar a existência desta zona.

## ABSTRACT

The rodents of the genus *Ctenomys* form a large group of fifty-six species, being the dominating mammals occupying the subterranean niche in South America. Chromosome polymorphism among species ranges from  $2n=10$  to 70.

Among the species observed in southern Brazil, *C. minutus* is the one with the widest geographic distribution, inhabiting the sand fields and dunes that extend from Jaguaruna, in the State of Santa Catarina, to São José do Norte, in the state of Rio Grande do Sul. Seven diploid numbers and eight cytotypes were previously described for this species:  $2n=42$ , 45, 46a, 47, 48, 49, 50a, including the existence of hybrid zones between  $2n=46$  and 48, and  $2n=48$  and 42.

A sample of 51 specimens of *Ctenomys minutus* Nehring, 1887 was collected along the Coastal Plain of Rio Grande do Sul, between collection points Tavares ( $31^{\circ}23'S$   $51^{\circ}09'N$ ) and São José do Norte ( $31^{\circ}52'S$   $51^{\circ}54'N$ ). Five collection points were actually defined along this area, distancing each other by approximately 20km.

The geographic distribution of *C. minutus* was enlarged in 90km from Tavares to São José do Norte in south way. Three cytotypes and five karyotypes were found,  $2n = 46b$ , 47b, 48b, 49b and 50b, four of which, were not described for the specie.

The animals were captured with the use of Oneida Victor  $n^{\circ} 0$  traps. Chromosomes were obtained from bone marrow according to FORD and HAMERTON (1956) and analyzed through G (SEABRIGHT, 1971) and C band patterns (SUMNER, 1972). The characterization of nucleolus organizer regions (NOR) was done through techniques, developed by HOWELL and BLACK (1980). For the fluorescence *in situ* hybridization (FISH), the all-telomeric human probes (ONCOR) were used. The phylogenetic analysis was performed through the outgroup method using the TREE GARDENER 2.2 software, considering *C. lami* as outgroup, since it is ancient in relation to *C. minutus*, according to FREITAS (2001).

In all the cytotypes studied, the sex pair is represented by a submetacentric X chromosome and an acrocentric Y chromosome sized similarly to its pair's long arm in the males. In the females, it is represented by a submetacentric X pair.

Analyzing the G-band patterns found, and comparing them with those described by FREITAS (1997), it was observed that in cytotypes 50a and 50b, pairs 17 and 20 of the Jaguaruna cytotypes are fused in the São José do Norte karyotype, while pair 2 identified in  $2n=50$  from Jaguaruna is fissioned in São José do Norte. Cytotype  $2n=48b$  differs from  $2n=48a$  because of the presence of an inversion in chromosome 2p, which transforms it in a metacentric chromosome. Cytotype 47b's difference from 47a stems from the heterozygote pair, which is formed by a 24/16 rearrangement in the former, and by a 2p/2q rearrangement in latter. 49a and 49b differ not because of the heterozygote pair, but because of the 2p/2q rearrangement, which is fused in  $2n=49a$  and fissioned in  $2n=49b$ , and by rearrangement 20/17 fissioned in  $2n=49a$  and fused in  $2n=49b$ .

Constitutive heterochromatin was found in small quantity in the C banding for the three cytotypes analyzed. Only three autosomes presented it, occupying the entire length of the short arm in  $2n=48b$  and  $2n=50b$  and only one autosome in  $2n=46b$ . Chromosome Y in males, independent of its cytotype, also showed positive.

The nucleolus organizer region (NOR) was found to be located in the secondary constriction of the long arm of pair 8.

The probe hybridization was found in the telomeric regions of both short and long arms, of all chromosomes in the  $2n=50b$  cytotype. No etopic signs were detected around the centromeres. In both 48b and 46b the desnaturation of the chromosomes did not allow the analysis.

For the phylogenetic analysis, only five characters could undergo the analysis. The consense tree separated the karyotypes into three groups: the most basal one being represented only by 50a; 46a, 48a, and 42 formed another one; and the third group, represented by 46b, 48b and 50b, showing more apomorphic characteristics. The consistency index was 0.71 and the retention index, 0.75. Character 1 (fusion 20/17) was the main responsible for the separation of 50a from the remaining karyotypes. The group formed by 46b, 48b, and 50b was found to be supported by two synapomorphys, of character 2 (fusion 2p/2q) and character 05 (presence of heterochromatin in the marker pair). Character 4 (fusion 22/24/16) represented an autapomorphy for its respective cytotypes.

The formation of the basal group can be explained by the presence of the Araranguá River, which acts as a geographical barrier.

Regarding the other two groups' separation, two hypotheses could be formulated. The first can be explained by extrinsic factors; the other one could be due to intrinsic factors. As there are no geographic barriers that can account for the separation, the alternative explanation would be that rearrangements 2 and 5, which support one of the groups, could be responsible for the appearance of a reproductive barrier. However, more studies are required for to test of these hypotheses.

The present findings also indicate the existence of two possible new hybrid zones for this species – one of them, at least, being the result of a secondary contact after the regression of the sea level and the closing of a connection between Patos Lagoon and the Atlantic Ocean, called Barra Falsa, in a location called Bojuru, approximately 2,300 years ago. More collects are also required to confirm this.

## INTRODUÇÃO

### 1.1. Estudos citogenéticos em evolução de mamíferos

Nas primeiras décadas da citogenética, muitos autores consideravam que o cariótipo não tinha qualquer significado evolutivo, pois os cromossomos não eram relevantes, e sim os genes que eles continham (BENAZZI, 1973).

A importância da citogenética na evolução foi levantada principalmente após a descoberta do efeito de posição, já que a mutação cromossômica pode, por exemplo, alterar relações de ligação dos genes dentro do genótipo, ou ainda, alterar a expressão pelo efeito de posição (BENGTSSON, 1980). Essa descoberta tornou claro o fato de que a base física da evolução é representada não somente por genes, mas também por cromossomos como entidades morfológicas bem definidas, caracterizadas por determinadas associações e seqüências gênicas, posições dos centrômeros e distribuição de eucromatina e heterocromatina (BENAZZI, 1973). Os cromossomos podem ainda trazer informações preciosas sobre a localização geográfica de zonas híbridas e freqüência de mudanças gênicas interraciais (BALLOUX *et al.*, 2000).

Essas descobertas podem ter inúmeras implicações nos estudos de evolução, podendo especialmente elucidar problemas de relações entre espécies, principalmente onde os dados morfológicos não levam a dados conclusivos (VANZOLINI, 1970; ALMEIDA *et al.*, 2001). Também se pode deduzir relações filogenéticas, pois, embora não se possa determinar diretamente o cariótipo da forma ancestral, pode-se fazer deduções razoáveis sobre estes e as mudanças cromossômicas que teriam levado ao arranjo cromossômico atual (SUMNER, 1990 *apud* NAGAMACHI, 1995).

Teoricamente, espera-se que rearranjos estruturais nos cromossomos possam gerar heteroses negativas, o que leva os pesquisadores a associar essas mudanças com especiação (PATTON & SHERWOOD, 1983; KING,

1993), pois neste caso há a possibilidade de redução da fertilidade causada por problemas na meiose, proporcionando eventos onde a seleção pode atuar (LANDE, 1979; GROOP, *et al.*, 1982; LANDE, 1985; NACHMAN, 1992).

Em animais, no entanto, nem sempre os rearranjos cromossômicos levam a redução da fertilidade, já que existem alguns mecanismos na meiose, como supressão parcial ou completa da recombinação, que diminuem os problemas de segregação. Além disso, diferentes tipos de rearranjos provocam diferentes efeitos no valor adaptativo. Assim, as translocações cêntricas e inversões possuem efeitos negativos enquanto as adições e deleções de heterocromatina são consideradas neutras (RIESEBERG, 2001). Obviamente, se uma variante em particular é neutra, degenerativa ou adaptativa depende de muitos fatores, como o ambiente, o tamanho da população, da composição genética da mesma, entre outros (HEDRICK, 2001).

Os polimorfismos podem manter-se na população, devido, em alguns casos, a heterozigidade aumentar o valor adaptativo em comparação com o homozigoto, podendo significar uma sobrevivência diferencial no subadulto em relação aos grupos de jovens ou adultos (BAKER *et al.*, 1987). Há também a possibilidade de ausência de uma forte seleção contra os heterozigotos para a variação cromossômica (NACHMAN, 1992). Alguns ainda, como RIESEBERG (2001) acreditam que, na verdade, os rearranjos reduzem o fluxo gênico mais freqüentemente pelos efeitos nos padrões de recombinação do que pelos efeitos no “fitness”.

A importância relativa das forças seletivas e não seletivas no processo evolutivo da especiação e adaptação, contudo, ainda não é clara (NEVO *et al.*, 1995). A forma mais comum de mudança cromossômica encontrada entre raças e citótipos envolve, freqüentemente, um único rearranjo cromossômico, e a maioria das diferenças fixadas encontradas entre as raças cromossômicas ou complexos de espécies fortemente relacionados envolve sistemas de fusões/fissões ou inversões pericêntricas (KING, 1982).

Para os mamíferos, os mecanismos de especiação cromossômica, incluindo os modelos alopátricos, parapátricos e estasiopátricos, costumam prevalecer (NEVO, 1979). Quanto à estabilidade cromossômica, algumas

ordens de mamíferos por exemplo, podem ser enquadradas em duas situações distintas: por um lado, especialmente em pinipédios, cetáceos e, menos evidentemente em felídeos, quirópteros e carnívoros existe alta estabilidade cromossômica, por outro lado, roedores e insetívoros apresentam grande variação em seus complementos cromossômicos, tanto ao nível inter, como intra-específico (BENGTSSON, 1980). Essa grande variação desempenha, no segundo grupo, importante função no processo de especiação (FREDGA, 1977).

Nos roedores subterrâneos em geral, os polimorfismos cromossômicos envolvem inversões, translocações ou adições/deleções de blocos de heterocromatina constitutiva, bem como as variações de número cromossômico, causadas por mudanças Robertsonianas, ou seja, fusões e fissões cêntricas (NEVO, 1979).

Para KING (1993), os estudos das mutações cromossômicas devem ser relacionados com os aspectos ecológicos da espécie. Sendo assim, a especiação rápida e explosiva em roedores fossoriais (espécies que gastam a maior parte da vida em tocas subterrâneas aparecendo na superfície apenas incidentalmente) é correlacionada com o rápido padrão de evolução cromossômica, e provavelmente também com as pequenas, subdivididas e semi-isoladas populações, e a forte territorialidade e baixa vagilidade (NEVO, 1979).

As ferramentas mais comuns para a citogenética comparativa, no que concerne à evolução e filogenia, são as marcações cromossômicas como as bandas C e, principalmente, as bandas G (QUIMISIYEH & BAKER, 1988). As diferenças encontradas quanto à quantidade e distribuição dos rearranjos cromossômicos entre diferentes táxons, bem como os diferentes padrões encontrados em determinados grupos podem ser traçados e utilizados para auxiliar na interpretação dos relacionamentos entre espécies (QUIMISIYEH & BAKER, 1988). Neste contexto, três técnicas podem ser utilizadas para a construção de filogenias.

A primeira, conhecida como “common equals primitive” assume que se um carácter é encontrado em muitas taxa dentro do grupo investigado, ele é o mais

primitivo. Outra maneira é assumir uma direção para a evolução cromossômica, ou seja, assumindo um decréscimo no número diplóide por fusão (sendo considerado o cariótipo mais primitivo o mais alto), ou vice-versa (QUIMISIYEH & BAKER, 1988). Uma terceira técnica, muito utilizada para a reconstrução filogenética baseada em dados morfológicos é o método “outgroup”. Este método assume, baseado em alguns dados independentes, que os taxa dentro do grupo, formam um grupo monofilético, utilizando-se para isto um grupo externo (QUIMISIYEH & BAKER, 1988).

Segundo BAKER *et al.* (1987), a comparação entre bandamentos G braço a braço cromossômico, é um dos melhores métodos para entender relações entre taxa e avaliar o padrão, quantidade e tipo de rearranjo cromossômico e como eles tem lugar na evolução cromossômica dos mamíferos.

Alguns exemplos são os estudos de KOOP *et al.* (1984), que utilizaram a análise de sequências de banda G para analisar um cariótipo ancestral para os Cricetidae. SBALQUEIRO (1989) e WÓJCIK (1993), que utilizaram bandamento G para inferir relações filogenéticas entre espécies de Akodontidae e raças cromossômicas do insetívoro *Sorex araneus*, respectivamente, já que a mutação cromossômica pode, por exemplo, alterar relações de ligação dos genes dentro do genótipo, ou ainda, alterar a expressão pelo efeito de posição (BENGTSSON, 1980). Ou ainda NASH & O'BRIEN (1982), que utilizaram a técnica para comparar homologias entre carnívoros e primatas, fazendo inferências sobre a evolução desses grupos.

Atualmente, técnicas moleculares como hibridização *in situ*, destacando-se a técnica de hibridização fluorescente *in situ* são utilizadas também para este fim (SESSIONS, 1996), transformando-se em ferramenta importante para a análise estrutural, funcional e evolucionária dos cromossomos (MANDRIOLI *et al.*, 1999). Neste contexto, destacam-se, no caso de estudos com animais, os trabalhos que enfocam a região telomérica, pois podem promover novas idéias sobre os mecanismos de origem, rearranjo e perda de regiões teloméricas e seu impacto na evolução cariotípica (SEÑA, *et al.*, 1995).

Essas ferramentas, no entanto, só são utilizadas porque homologies entre padrões de bandas podem ser observadas pela existência de segmentos conservados e são importantes porque são a expressão da organização genômica, refletindo a homologia gênica (BAKER *et al.*, 1987; FAGUNDES, *et al.*, 1997; BIELEC *et al.*, 1998).

É importante salientar, no caso da citogenética molecular, que a mesma deve ser aliada a padrões de bandamento da citogenética convencional ou a marcadores cromossômicos específicos, pois possui uma série de limitações com relação à identificação cromossômica (SESSIONS, 1996).

## **1.2. A fauna sul-americana e o surgimento do gênero *Ctenomys***

A fauna atual de mamíferos sul-americanos foi constituída por meio de longo processo de evolução, no qual participaram linhagens autóctones de história antiga no continente, representadas na fauna atual somente pelos marsupiais e pelos edentados possuindo, porém, uma ampla diversidade no passado geológico, e linhagens imigrantes, que povoaram o continente em tempos diferentes e que tiveram origens diferentes (REIG, 1981).

Os roedores, sem dúvida, pertencem a este último, uma vez que não formam parte dos antigos elencos faunísticos sul-americanos do Paleoceno e Eoceno, sendo a fauna da América do Sul, no Paleoceno, constituída principalmente de grandes herbívoros cursoriais (WEBB, 1978; AB'SABER, 1990). Roedores primitivos são encontrados, no entanto, nas faunas do Terciário antigo da América do Norte, Eurásia e África (REIG, 1984).

Três hipóteses sobre a origem geográfica da linhagem ancestral dos caviomorfos sul-americanos são propostas atualmente: A primeira seria de uma origem norte-americana, a segunda africana (HERSHKOVITZ, 1972; REIG, 1984; WYSS *et al.*, 1993), e uma terceira, proposta recentemente por HUCHON & DOUZERY (2001), baseados em dados moleculares, que sugerem

que a origem dos caviomorfos ocorreria na Ásia com uma rota de colonização vinda da Austrália e Antártida, há 12 milhões de anos, durante o Eoceno Médio e tardio.

Segundo VUCETICH *et al.* (1999), no início do Oligoceno, roedores Hystricognathi (grupo que inclui os Phiomorpha do velho mundo e os Caviomorpha do novo mundo) começaram a aparecer no registro fóssil tornando-se abundantes no final deste período. O isolamento da América do Sul de outras áreas biogeográficas durante o Cenozóico teve grande influência no modo de evolução e da radiação inicial dos Hystricognathi e sua história subsequente.

Dois eventos de radiação são detectados para estes roedores. O primeiro ocorre no limite do Eoceno-Oligoceno e o segundo no limite entre o Mioceno Médio - Tardio, onde muitos táxons são extintos (VUCETICH & VERZI, 1999) e novas famílias e subfamílias são originadas, marcando uma renovação na fauna Hystricognathi sul-americana. Fósseis deste grupo ocorrem na Patagônia do Oligoceno para o Mioceno Médio e no norte e centro da Argentina no fim do Mioceno, início do Pleistoceno (VUCETICH *et al.*, 1999), sendo que a composição taxonômica atual dos caviomorfos sul-americanos, foi basicamente estabelecida durante o segundo evento, no Pleistoceno (VUCETICH & VERZI, 1999).

No final do Mioceno, a família Octodontidae experimentou uma importante radiação (VERZI *et al.*, 1999). Neste período, os grupos Ctenomyidae e Octodontidae divergem (VERZI, 1999). Com a extinção dos grandes ungulados, devido ao aumento da aridez no Plio-Pleistoceno, ocorre um empobrecimento considerável nos níveis de consumidores primários (NEVO, 1979; REIG, 1981). Neste período inicia-se a moderna cladogênese de Ctenomyinae (VERZI *et al.*, 1999), que, segundo evidências podem ser descendentes das espécies do Octodontidae *Phthoramys*, do Huaqueriano (PATTERSON & PASCUAL, 1972), sendo *Actenomys*, um roedor caviomorfo do Plioceno, reconhecido como o mais antigo animal fossorial representante da subfamília Ctenomyinae (FERNANDEZ *et al.*, 2000). A maior radiação dos

Ctenomyinae começa, no entanto, no início do Pleistoceno, com *Paractenomys*, um subgênero de *Ctenomys* (REIG, 1989).

A origem do gênero *Ctenomys* pode ter ocorrido no planalto boliviano, a 1,9 milhões de anos, seguida de uma expansão progressiva do norte para sul ao longo dos altiplanos andinos. O desenvolvimento constante de formas derivadas, que sofreram um processo muito ativo de radiação, resultou na expansão dos alcances dessas formas às terras baixas orientais, às estepes da Patagonia e da Terra do Fogo e para o oeste das regiões andinas (JUSTO & CONTRERAS, 1999).

Na metade do Pleistoceno, mais de dez espécies fósseis de *Ctenomys* são conhecidas em depósitos da Argentina, Uruguai e Bolívia, antecipando a presença das mais de 50 espécies atuais (REIG, 1989).

### **1.3. O gênero *Ctenomys***

Os roedores fossoriais do gênero *Ctenomys* pertencem à família Ctenomyidae. Até pouco tempo atrás, esse gênero era classificado como pertencente à família Octodontidae, mas recentes estudos filogenéticos têm colocado esses dois grupos como clados irmãos (LESSA & COOK, 1998; KÖHLER *et al.*, 2000; HUCHON & DOUZERY, 2001).

Formam um grande grupo, com cerca de 56 espécies, poucas das quais simpátricas (REIG *et al.*, 1990, LACEY *et al.*, 2000), o que representa cerca de 30% do total de espécies de caviomorfos sul-americanos (VERZI, 1999) e cerca de 45% do total das espécies de roedores subterrâneos (GARCIA *et al.*, 2000b). Assim, é considerado um dos gêneros mais diversificados entre os mamíferos (MASCHERETTI *et al.*, 2000) e os animais dominantes da exploração do nicho subterrâneo neste continente (REIG *et al.*, 1992), constituindo um dos grupos mais importantes do elemento endêmico da mastofauna da América do Sul (COOK *et al.*, 1990).

Na Região Neotropical, habitam toda a sub-região da Patagônia, desde 15° até 55° de latitude sul (REIG *et al.*, 1966; PEARSON *et al.*, 1968). No Rio Grande do Sul, são popularmente conhecidos, devido ao som de sua vocalização, como tuque-tuques, na porção costeira do Sul do Estado e tuco-tucos nas outras regiões (TRAVI, 1983). Podem ser identificados em campo, pelos vários montículos de areia sobre a vegetação rasteira, caracterizando a existência de entradas para o sistema de túneis (GAVA, 1996).

As condições do ambiente subterrâneo, que exigem adaptações fisiológicas para condições de alta umidade do ar, constância de temperatura, baixa pressão de O<sub>2</sub> e alta de CO<sub>2</sub> acabaram por resultar em uma interessante convergência estrutural (NEVO, 1979; REIG, 1990), principalmente com os roedores fossoriais Geomyidae da América do Norte, com os Spalacidae da Europa e os Bathyergidae da África (NEVO, 1979).

Seu corpo é robusto e cilíndrico, a cabeça grande, a cauda curta e parcialmente coberta de pêlos e seus membros e pescoço são curtos. Os membros anteriores são, geralmente menores que os posteriores e todos os dígitos apresentam fortes garras, sendo as dianteiras normalmente maiores. Os olhos são pequenos, sendo, no entanto, maiores que o esperado para roedores fossoriais. As orelhas apresentam-se reduzidas, mas com bula timpânica muito alargada (NOWAK, 1999). Entre seus predadores naturais encontram-se as corujas, destacando-se *Bubo virginianus* (TREJO & GRISERA, 1998) e a coruja buraqueira *Speotyto cunicularia* (FREITAS, *comun. pess.*).

Como outros roedores fossoriais, são considerados como K-estrategistas, apresentando desenvolvimento relativamente lento, maturidade sexual tardia e longos períodos de gestação (MALIZIA & BUSCH, 1997).

Apresentam grande variação cariotípica, com o número diplóide variando entre 10 em *C. steinbachi* a 70 em *C. pearsoni* (KIBLINSKI *et al.*, 1977, ANDERSON *et al.*, 1987; ORTELLS *et al.*, 1990; FREITAS, 1994).

A taxonomia difícil e a diferenciação desse gênero em numerosas formas regionais trazem questões interessantes para o estudo da especiação (LANGGUTH & ABELLA, 1970). Como esta diferenciação ocorreu provavelmente durante o Pleistoceno, *Ctenomys* apresenta um dos mais

explosivos padrões de evolução cromossômica entre os mamíferos (REIG *et al.*, 1990). Esse fato ocorre devido ao seu poder de dispersão ser limitado, o que causa uma restrição do fluxo gênico (PEARSON *et al.*, 1968) e também, pelo fato de que, em pequenas populações, as mutações podem fixar-se mais facilmente (NEVO, 1979).

Quatro espécies são descritas no sul do Brasil (Fig. 1): *C. torquatus*, *C. flamarioni*, *C. lami* e *C. minutus* (FREITAS, 1995; FREITAS, 2001).

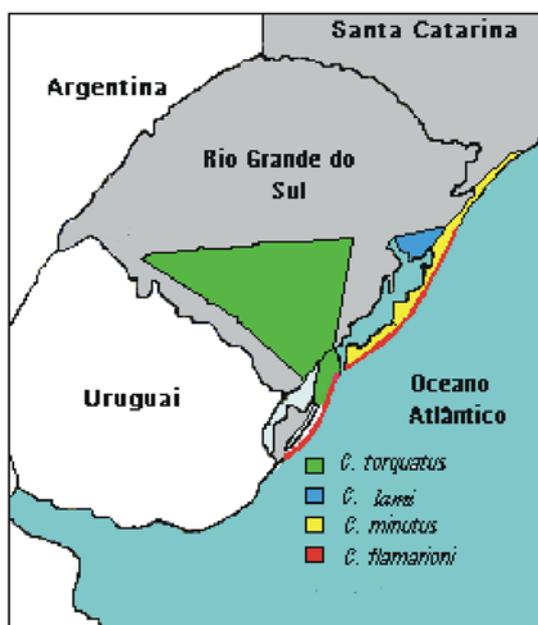


Figura 1: Distribuição geográfica das quatro espécies de *Ctenomys* ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul.

*Ctenomys torquatus* apresenta no Rio Grande do Sul, dois números diplóides diferentes:  $2n = 44$  e  $46$ , sendo a fissão do cromossomo 7 responsável pelas diferenças no cariótipo (FREITAS & LESSA, 1984). Caracteriza-se, morfológicamente pela presença de um colar branco. Habita principalmente os campos arenosos da região Sul do Estado (TRAVI, 1983).

*Ctenomys flamarioni*, apresenta um número diplóide  $2n = 48$ . Possui variações na quantidade de heterocromatina constitutiva ao longo de um gradiente norte-sul, sendo que o número de braços autossômicos também varia entre 50 e 78 ao longo deste gradiente (FREITAS, 1994). Habita em

ambos os lados da primeira linha de dunas, onde o grau de salinidade é alto e a cobertura vegetal é pobre (FREITAS, 1995). Distingui-se das outras espécies pelo tamanho maior e pela coloração da pelagem, que é esbranquiçada e uniformemente distribuída (TRAVI, 1983). Pertence ao grupo de espécies denominado *Mendocinus* (FREITAS, 1994), formado por *C. mendocinus*, *C. azarae*, *C. australis*, *C. chaquensis* e *C. pourteosi*, as quais ocorrem na Argentina e caracterizam-se por similaridades cromossômicas e cranianas, além de possuir espermatozoides do tipo assimétrico (MASSARINI *et al.*, 1991).

*Ctenomys lami*, também é morfologicamente muito similar a *C. minutus*, contudo sua distribuição geográfica e análises morfológicas mais detalhadas do crânio demonstram diferenças específicas. Possui  $2n= 54, 55, 56, 57$  e  $58$ . (FREITAS, 2001). Ocorre em uma estreita faixa geográfica conhecida como Coxilha das Lombas, a mais antiga linha de dunas da costa, que se estende do norte do Rio Guaíba, até aproximadamente 78km em direção ao noroeste dos bancos de areia da Lagoa Barros (FREITAS, 1995).

As duas espécies, *C. lami* e *C. minutus*, apresentam um alto coeficiente de similaridade genética (MOREIRA *et al.*, 1991), e uma distribuição geográfica espacialmente paralela, com uma região de simpatria (FREITAS, 1995).

Evidências sugerem que *C. minutus* é derivado de *C. lami* por um processo de especiação por meio de diferenças cromossômicas (FREITAS, 2001).

#### **1.4. *Ctenomys minutus* Nehring, 1887**

Esta espécie (Fig. 2) habita campos arenosos ou dunas do sudeste do Rio Grande do Sul até o sudeste de Santa Catarina (FREITAS, 1990; FREITAS, 1995).



Figura 2: a) Espécime de *Ctenomys minutus*. b) Mesmo indivíduo, na entrada de sua toca

O limite norte ocorre nas proximidades do farol de Santa Marta, município de Jaguaruna (FREITAS, 1990), não ocorrendo mais ao norte devido ao relevo acentuado que existe a partir do município de Laguna (CIMARDI, 1996). Ao sul, seu ponto de coleta mais extremo situa-se no município de São José do Norte – RS (FREYGANG *et al.*, 2000).

Habita, de Santa Catarina até as margens do Rio Mampituba, a porção oeste da primeira linha de dunas e as regiões de pastagem que ocorrem no interior, mais próximas à costa. A partir do Mampituba não são encontrados mais em região de dunas, mas somente nas áreas de campo, interiorizando-se por uma faixa de, no máximo, 2km da costa, sendo, dentre as espécies brasileiras, a que apresenta distribuição mais ampla (FREITAS, 1990). Essa distribuição representa, na planície costeira, a barreira originada no Pleistoceno Médio (FREITAS, 1997).

Apresenta preferência por solos secos, não compactados e não inundáveis habitando, geralmente, taludes de estradas ou encostas de dunas (RUI & GASTAL, 1997), permanecendo a maior parte do tempo no interior do

sistema de túneis e alimentando-se basicamente de raízes e talos subterrâneos, ou de porções de vegetais vizinhos às aberturas de seus túneis, sendo suas populações constituídas por indivíduos solitários (GASTAL, 1994).

RUI & GASTAL (1997) analisando a estrutura do sistema de túneis de uma população de Torres – RS, constaram que seus sistemas de túneis são constituídos de um túnel principal, de onde partem várias ramificações secundárias mais curtas. Os túneis são circulares e construídos predominantemente no plano horizontal, sendo encontrados em seu interior, câmaras de repouso, obstruções de porções de túneis, restos de vegetais cortados, fezes e palha seca.

Apresentam dimorfismo sexual, com os machos sendo significativamente maiores que as fêmeas (RUI & GASTAL, 1997; MARINHO & FREITAS, 2000). A razão sexual observada em *C. minutus* apresentou uma tendência a um maior número de fêmeas, o que estaria provavelmente relacionado a uma maior mortalidade e maior deslocamento dos machos para fixação de território e procura de fêmeas no período de acasalamento (MARINHO, 1997). O período de reprodução aparentemente corresponde aos meses de setembro e outubro (GASTAL, 1994).

Sete números diplóides e oito cariótipos são descritos nesta espécie ( $2n=42, 45, 46a, 46b, 48, 49$  e  $50$ ) (FREITAS, 1997), inclusive com formas híbridas entre  $2n=46-48$  e  $2n= 42-48$  (GAVA & FREITAS, *in press*), exibindo tanto politipia (variação entre populações) quanto polimorfismo (variação dentro da população). O par sexual está representado por um cromossomo X submetacêntrico e um cromossomo Y acrocêntrico em todos os cariótipos. As variações cromossômicas observadas nessa espécie devem-se a rearranjos Robertsonianos e fusões em tandem (FREITAS, 1997).

### **1.5. Zonas de hibridação e *Ctenomys minutus***

Zonas de hibridação são interessantes porque podem oferecer o material para o estudo de características e processos envolvidos na divergência e

especiação (HEWITT, 1988; HARRISON, 1993). Por isso, são consideradas testemunhas do processo de especiação em ação (CORTI *et al.*, 1990), além de auxiliar na mensuração da difusão de genes entre taxa divergentes e no entendimento de como adaptações alternativas se espalham nas populações (BARTON & HEWITT, 1989; JIGGINS *et al.*, 1996). Podem ser definidas, de uma maneira simples, como uma área geográfica onde duas raças fazem contato e intercruzam, com conseqüente produção de híbridos (SEARLE & WÓJCIK, 1998).

A hibridação pode influenciar a evolução dos grupos de duas maneiras principais: 1- Se os híbridos são menos adaptados, a distribuição geográfica das populações divergentes pode ser limitada e o isolamento reprodutivo pré-zigótico pode ser reforçado. 2- Se alguns híbridos são mais adaptados que um ou ambos os parentais, pelo menos em algum ambiente, a hibridação pode ter conseqüências positivas para os híbridos formados (BARTON, 2001).

Além disso, o estudo de zonas híbridas é importante atualmente, pois as modificações provocadas pelo homem no ambiente, causam alterações na distribuição geográfica e restringem o habitat de espécies, subespécies, raças geográficas ou cromossômicas que podem levar a situações de hibridação em zonas de contato. Como é impossível prever os efeitos da divergência sofrida por essas populações ou espécies, além da viabilidade das mesmas, entender seus processos torna-se fundamental (GAVA, 1996).

Zonas de hibridação ou contato são freqüentemente reconhecidas por meio da morfologia, diferenças cromossômicas, etológicas e moleculares, ou ainda, por meio da combinação desses aspectos. Podem ser formadas como resultado de contato primário ou secundário. No primeiro caso, acontece diferenciação gradual, ao longo da distribuição de uma determinada espécie como resposta à seleção diferencial entre locais. No segundo caso, o contato ocorre após a diferenciação em alopatria (HEWITT, 1988).

Acredita-se que uma zona híbrida mantenha-se por um balanço entre manutenção (reforço) e quebra (introgressão) da coesão da espécie (REED *et al.*, 1995), ou, mais especificamente, entre seleção e dispersão. É importante salientar que existe diferença entre seleção com adaptação ao ambiente

externo, em que as formas parentais são favorecidas em diferentes ambientes e seleção contra os híbridos, pois essa distinção determina como a zona híbrida pode se mover. Se os alelos são selecionados para seus habitats nativos, a zona híbrida ocorrerá em um ponto do gradiente ambiental. Se, por outro lado, a seleção é contra os híbridos, a zona pode mover-se de um local para outro, sendo chamada de Zona de Tensão (BARTON & GALE, 1993).

Quanto à largura e estrutura, essas podem ser classificadas, segundo PATTON (1993) em três grupos distintos:

1 - Zonas estreitas e relacionadas com um ecótono. Nessas zonas as formas diferenciadas se distribuem de modo contínuo, cada qual ao longo de sua própria área. A zona híbrida neste caso, não apresenta uma mistura de genótipos, mas apenas os indivíduos intermediários (HEANEY & TIMM, 1985).

2 - Zonas estreitas e descontínuas, devido a fragmentação do habitat ou a barreiras topográficas.

3 - Zonas largas, que podem apresentar mais de 200km.

A zona de hibridação melhor descrita para *C. minutus*, ocorre entre as formas  $2n=46$  e  $48$ , localiza-se próxima a uma região de alagamento intermitente, o banhado da Cidreira, que se acredita, representa uma barreira permeável a colonização e dispersão dos indivíduos, sendo possível que seja resultado de um contato secundário após diferenciação durante um período interglacial, sendo este contato estimado em 3.500 anos. Apresenta-se como uma zona do tipo 2 (GAVA, 1996, GAVA & FREITAS, *in press*).

### **1.5. *Ctenomys minutus* e conservação**

Segundo o decreto legislativo 2-94/artigo 2º da Convenção sobre Biodiversidade, Diversidade Biológica é definida como “a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentro outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os

complexos ecológicos que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas (DIAS, 2001).

Neste contexto, informações como a determinação ou ampliação da distribuição de espécies, bem como o resgate de informações biológicas, são fundamentais para a elaboração de propostas de manejo, constituindo-se a base para uma intervenção antrópica adequada no meio ambiente (WILSON,1992). Assim, quanto mais se conhece sobre os recursos naturais, melhor se poderá manter, conservar e administrar, originando uma base mais segura para apoiar o manejo e melhorar sua proteção (SILVA *et al.*, 1990). Nesse sentido, uma análise cromossômica é indispensável para a caracterização das espécies e representa um auxílio valioso quando considerada em conjunto com dados morfológicos (anatômicos), biogeográficos e moleculares (ALMEIDA *et al.*, 2001).

Outra das metas da biologia da conservação é preservar a diversidade genética e também os processos evolucionários (AVISE, 1994; BOWEN,1999). Como diversidade genética, entendemos toda a diversidade de espécies, alelos, freqüências alélicas dentro e entre populações e pela combinação das espécies com suas respectivas variações alélicas (SCHONEWALD-COX,1983).

Nesse contexto, hibridação, introgressão e especiação são exemplos da dinâmica e do processo evolucionário, que exerce grande influência na maneira em que a diversidade genética se organiza (AVISE, 1994). Sendo assim, existem boas razões para se utilizar tuco-tucos como sistemas para o estudo de evolução, particularmente com respeito à diversificação cromossômica, especiação e socialidade (LESSA & COOK, 1998).

Apesar de não estar tão ameaçada pelas atividades antropogênicas quanto outras espécies brasileiras, *C. minutus* merece atenção especial em estudos sobre conservação por diversas razões. Uma delas é que espécies que naturalmente ocorrem em baixas densidades e que apresentam baixa capacidade de dispersão e exploração de nichos alterados, são mais vulneráveis a extinção (LAURENCE, 1990) Também por sua distribuição coincidir com a de reservas de carvão, ainda não exploradas no Rio Grande do

Sul, podendo trazer problemas para a espécie caso esses venham a ser utilizados (FREITAS, 1995).

Ainda é importante ressaltar que a ampla variação cariotípica, com a existência inclusive, de zonas de hibridação nessa espécie sugerem, comparando-se com a geografia da região, que a espécie está passando por um processo de especiação devido ao isolamento geográfico (FREITAS, 1997).

## OBJETIVOS

Conforme comentado na introdução, a espécie *C. minutus* apresenta uma ampla variação cariotípica, com a existência inclusive, de zonas de hibridação.

Visando contribuir para o conhecimento dessa grande variação, este trabalho teve por objetivos:

- Caracterizar, citogeneticamente, os roedores da espécie *C. minutus* na porção sul de sua distribuição geográfica;
- Determinar os padrões de bandamento cromossômico C, G e NOR e de marcação telomérica com FISH para os citótipos encontrados;
- Comparar os diferentes padrões observados com os já descritos para a espécie;
- Analisar filogeneticamente todos os citótipos encontrados em *C. minutus* através dos bandamentos realizados.

## METODOLOGIA

### 3.1. Área de estudo

A área de estudo compreende uma região de cerca de 90 km, localizada na Planície Costeira do Estado do Rio Grande do Sul, entre os municípios de Tavares (31°23'S51°09'W) e São José do Norte (31°52'S51°53'W) e engloba o Complexo de Múltiplas Barreiras e o Sistema da Lagoa dos Patos – Mirim, sendo esta região caracterizada por planícies de emersão, ambientes lacustres e de laguna e aluviões (VIEIRA & RANGEL, 1988).

Essa região é caracterizada por VILWOCK (1989) e CORRÊA (1996), como um grupo de elementos geológicos tectônicos, estruturais, sedimentários e morfológicos, característicos da margem continental brasileira, localizada entre os paralelos 28° 40'S (barra do Rio Mampituba) e 33° 45'S (arroio Chuí), correspondendo a cerca de 620km de extensão.

Esses sistemas de lagoas atuais não existiam no Plioceno, e quatro eventos principais de transgressão-regressão coincidem com a formação das quatro barreiras que constituem o sistema de lagoas da costa. A primeira barreira, Coxilha das Lombas aparece no início do Pleistoceno. O segundo evento deu origem à outra barreira que começa a isolar as lagoas dos Patos e Mirim, no Pleistoceno Médio. No Pleistoceno Superior, outro evento de transgressão regressão aumenta a planície costeira. Finalmente, um último evento, no início do Holoceno origina a quarta barreira, formada pelas dunas recentes. Sendo assim, esta região é caracterizada por deposição marinha e recobertura através de depósitos éolicos (VILLWOCK *et al.*, 1986).

O clima da região é considerado, dentro da classificação de Köppen, como mesotérmico brando (Cfa), com temperatura média das máximas superior a 22 °C e média das mínimas variando entre -3° e 18°C (VIEIRA & RANGEL, 1988)

Quanto à vegetação, predominam, na planície costeira, as comunidades herbáceas, campestres e pioneiras. As comunidades arbustivas geralmente constituem estágios secundários, com dominância monoespecífica. As formações

florestais normalmente apresentam matas insulares (capões), associadas a depósitos arenosos ou turfáceos, ou então, matas ciliares relacionadas a depósitos fluviais e deltáticos (WAECHTER, 1990).

Segundo GAVA (1996), o solo das regiões de campo em que *C. minutus* habita é relativamente duro e seco, sendo sua cobertura vegetal baixa formada essencialmente por gramíneas e ciperáceas (Fig. 3)



Figura 3: Foto do ponto localizado no município de São José do Norte – RS, mostrando as características de um campo habitado por *Ctenomys minutus*.

### **3.2. Coleta de dados em campo**

Foram definidos cinco pontos de coleta ao longo da área de estudo, sendo coletados, a princípio, 10 animais por ponto ao longo do período.

Cada ponto de coleta foi marcado com auxílio de um GPS (Global Position System), para posterior mapeamento dos pontos.

Os exemplares foram coletados vivos, utilizando-se armadilhas para roedores fossoriais do tipo Oneida Victor nº 0, sendo então encaminhados para o laboratório de Citogenética Animal e Evolução do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a análise citogenética.

Para cada animal foram anotados data e hora da coleta, bem como os seguintes dados: peso, sexo, tamanho do corpo, tamanho da cauda, incisivo, pé posterior com unha, pé posterior sem unha, estado reprodutivo das fêmeas, sendo este classificado em: não perfurada, perfurada e cicatrizada. Para machos, roedores caviomorfos aparentemente não apresentam indicativos de período reprodutivo (WEIR, 1974 *apud* GASTAL, 1994).

A coleta foi realizada com autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos), processo 02001.003006/94-53. Após a preparação citogenética, os animais coletados foram enviados para o Laboratório de Zoologia e Taxidermia da Universidade Regional de Blumenau – FURB para preparo de peles e crânios, sendo então incorporados, parte à coleção do laboratório de Citogenética Animal e Evolução, parte à coleção de mamíferos da Universidade Regional de Blumenau.

### **3.3. Métodos citogenéticos**

#### 3.3.1. Obtenção de cromossomos mitóticos

A técnica utilizada foi a de FORD & HAMERTON (1956), com modificações. Cada animal coletado foi pesado, sendo em seguida injetada, intraperitonealmente, uma solução de colchicina a 0,1%, na proporção de 1ml para cada 100g de peso do animal.

Após uma hora o animal era sacrificado e seus dados anotados, sendo então o mesmo submetido a seguinte preparação citológica:

- Os fêmures foram retirados e suas epífises cortadas;
- Retirou-se a medula com auxílio de uma seringa com agulha, contendo 5ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M), passando direto para um tubo de centrífuga;
- Homogeneizou-se o conteúdo deste tubo com auxílio de pipeta Pasteur;
- Deixou-se 15 minutos em repouso;
- Centrifugou-se o material, por 5 minutos à cerca de 1000 rpm;
- Fixou-se o material em solução Carnoy (metanol com ácido acético na proporção de 3:1);

- O material fixado foi centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos. Em seguida retirar-se o sobrenadante, sendo o fixador trocado por, no mínimo, três vezes.

- Para a montagem, foram gotejadas cerca de duas gotas do material previamente ressuspendido em lâminas lavadas e conservadas em álcool absoluto.

- Em seguida as mesmas foram expostas ao fogo para secagem. Incubou-se então a lâmina por 5 a 10 minutos em solução de tampão fosfato – pH 6,8 com corante Giemsa a 5% e lava-se rapidamente em água corrente.

### 3.3.2. Obtenção de cromossomos meióticos

Para obtenção de cromossomos meióticos utilizou-se a técnica de FORD & EVANS (1959).

- Retiraram-se os testículos (ou a túnica vaginal) e em seguida, os túbulos seminíferos;

- Cortaram-se e romperam-se os túbulos em placa de petri;

- Acrescentou-se 5ml de KCL (0,075M) à 37 ° C, ressuspendendo fortemente.

- Colocou-se em tubo de centrífuga e acrescentar mais 5ml de KCL por 20 minutos;

- Centrifugou-se, retirou-se o sobrenadante e acrescentou-se o fixador;

- Trocou-se o fixador 3x e efetuou-se o preparo das lâminas;

- Pode-se separar o material em dois tubos, para que em um seja aplicado formalina (1%) e, posteriormente, nitrato de prata (técnica de banda NOR), propiciando melhor visualização do complexo sinaptonêmico.

## **3.4. Marcações cromossômicas**

### 3.4.1. Bandamento C

Para esse bandamento, a técnica utilizada foi a de SUMNER (1972), com modificações.

- Mergulhou-se as lâminas envelhecidas por uma semana, em uma cubeta com solução de Bário em banho-maria a 60 ° C, durante aproximadamente 2 minutos e 20 segundos;

- Lavou-se em água destilada;
- Colocou-se as lâminas em solução 2xSSC, durante uma hora;
- Lavou-se em água destilada;
- Corou-se em Giemsa.

### 3.4.2. Bandamento G

Para o bandamento G utilizou-se a técnica de SEABRIGTH (1971), com modificações.

- Incubou-se as lâminas envelhecidas (1 semana), 5 minutos em tampão fosfato a temperatura ambiente;

- Mergulhou-se em solução de 0.025% de tripsina (0.02g de tripsina em 75ml de tampão fosfato) a 37 °C, por 30 segundos;

- Enxaguou-se rapidamente em H<sub>2</sub>O destilada, álcool absoluto e H<sub>2</sub>O destilada;

- Incubou-se novamente em tampão fosfato por mais 2 minutos

- Corou-se com Giemsa tamponado a 2% por 5 a 7 minutos, em temperatura ambiente.

### 3.4.3. Bandamento NOR

A técnica utilizada baseou-se em HOWELL & BLACK (1980), com algumas modificações:

- Incubou-se as lâminas previamente envelhecidas em tampão borato pH 9,0-9,2, em temperatura ambiente, entre um a quatro minutos;

- Lavou-se em água destilada e deixou-se secar ao ar livre;

- Colocou-se sobre material uma parte de solução coloidal a 5% (gelatina Ótker) para duas de nitrato de prata a 50%, adicionando 0,5ml de ácido fórmico para cada ml de prata;
- Misturou-se bem e cobriu-se com lamínula;
- Acondicionou-se em câmara úmida, mantida a 70 °C;
- Deixou-se incubando por cerca de 8 a 15 minutos, até surgir uma coloração castanho-dourada;
- Lavou-se rapidamente em água destilada;
- Corou-se com Giemsa tamponado a 2% por 30 segundos, em temperatura ambiente.

#### 3.4.4. Hibridização *in Situ* (FISH)

Para a técnica de hibridização *in Situ* – FISH, escolheu-se a seqüência (TTAGGG)<sub>n</sub>, que é a seqüência conservada nos telômeros de, predominantemente, todos os mamíferos (MEYNE *et al.*, 1990). Para isso, utilizou-se o kit de sondas “todos os telômeros humanos” (ONCOR), seguindo o protocolo que segue-se:

##### 3.4.4.1. Desnaturação

- Pré aqueceu-se 40 ml de solução desnaturante (pH 7,0) em uma cubeta a 70°C;
- Deixou-se as lâminas imersas na solução de desnaturação por 2 minutos. Não agitar;
- Desidratou-se as lâminas em cubetas sucessivas, com etanol 70%, 80% e 95%, deixando 2 minutos em cada. O etanol deve estar a –20°C;

##### 3.4.4.2. Hibridização

- Pré-aqueceu-se a sonda a 37°C por 5 minutos;
- Misturou-se gentilmente e centrifugar por 2-3 segundos;

- Colocou-se 3 µl da solução da sonda em um tubo de microcentrífuga e desnaturar por 5 minutos em banho-maria a 70°C
- Resfriou-se rapidamente em banho de gelo (4°C)
- Centrifugou-se 2-3 segundos
- Colocou-se 30 µl da solução da sonda em cada lâmina e cobrir com lamínula de vidro;
- Incubou-se a 37°C overnight em câmara úmida e escura

#### *3.4.4.3. Lavagem Pós-hibridização*

- Retirou-se gentilmente a lamínula;
- Lavou-se em 2xSSC (pH 7,0) por 5 minutos a 68 °C;
- Transferiu-se as lâminas para uma cubeta contendo 1x PBD por, no mínimo, 2 minutos;

#### *3.4.4.4. Detecção*

- Removeu-se as lâminas do 1xPBD e retirou-se o excesso de líquido da superfície;
- Aplicou-se 60ul de detector fluorescente em cada lâmina (FITC/Anti-digoxigenin);
- Colocou-se uma lamínula plástica sobre a solução. Incubar por 15 minutos em câmara úmida a 37°C;
- Removeu-se e descartar a lamínula plástica;
- Lavou-se as lâminas três vezes em 40ml de 1xPBD novo, a temperatura ambiente por 2 minutos cada lavagem, com agitação intermitente.

#### *3.4.4.5. Contracoloração*

- Corou-se os cromossomos adicionando 18µl de Iodeto de Propídio em cada lâmina;
- Cobriu-se com lâminas de vidro e colocou-se papel toalha sobre a lamínula para retirar o excesso de fluido;

- Observou-se em microscópio de fluorescência, com os filtros, no caso, da Zeiss, nº 09 (450-490, FT-510, LP-520) para análise das metáfases e o nº 15 (BP-546, FT-580, LP-590) para a fotografia.

### ***3.5. Análise dos dados citogenéticos***

Foram analisadas, na coloração convencional, dez metáfases por exemplar para estabelecimento do número diplóide, sendo fotografadas as três melhores para montagem do cariótipo.

Nas bandas cromossômicas, foram selecionadas e fotografadas, as três melhores metáfases de cada animal analisado, utilizando-se para isso, filme asa 25 e microscópio Axiophot da Zeiss.

Para o estabelecimento do NA, considerou-se apenas o número de braços autossômicos. Os pareamentos foram feitos seguindo a classificação cromossômica quanto à forma, classificando-os posteriormente pelo tamanho (GARDNER & PATTON, 1976).

As metáfases analisadas pela técnica de FISH foram fotografadas em filme Kodak asa 400.

### ***3.6. Análise filogenética***

A homeologia dos caracteres entre os diversos citótipos foi estabelecida através de bandamento G e C e os caracteres foram definidos conforme MODI (1987) e ORTELLS (1995).

Os cariótipos híbridos não foram colocados na análise, pois são, na verdade, uma mistura de dois cariótipos diferentes.

Para a análise filogenética foi utilizado o programa TREE GARDENER 2.2, com interface em HENNIG 86. Os caracteres foram todos considerados como não

ordenados. Para o cálculo da árvore utilizou-se o comando *ie*. O critério de otimização foi definido *a posteriori*.

O grupo externo escolhido foi *C. lami*. A escolha baseou-se em dois critérios: o trabalho de FREITAS (2001) que coloca essa espécie como mais antiga em relação a *C. minutus* e também ao fato dessa ser a única espécie que apresenta caracteres comparáveis a *C. minutus*.

## RESULTADOS

Foram analisados, no total 51 indivíduos de *Ctenomys minutus*, distribuídos em cinco pontos de coleta distintos (Fig. 4).



Figura 4: Planície costeira do estado do Rio Grande do Sul, com destaque para a região de estudo. Ponto 01: Tavares I, Ponto 02: Tavares II, Ponto 03: Bojuru I, Ponto 04: Bojuru II, 05: São José do Norte.

A distribuição da espécie foi ampliada em cerca de 90km, passando o limite sul, do município de Tavares para o município de São José do Norte

Três citótipos e cinco números diplóides foram encontrados, sendo eles:  $2n_s = 46b, 47b, 48b, 49b$  e  $50b$ . Com exceção de  $46b$ , os demais ainda não eram descritos para a espécie. Os  $2n = 47b$  e  $49b$  são, supostamente, híbridos de  $46b$  com  $48b$  e  $50b$  com  $48b$  respectivamente.

### 4.1. Descrição dos citótipos:

Em todos os citótipos estudados, o par sexual está representado, nos machos, por um cromossomo X submetacêntrico e um cromossomo Y acrocêntrico

de tamanho similar ao braço longo de seu par, e nas fêmeas, por um par X submetacêntrico. Além disso, como nos outros citótipos já descritos para a espécie, destaca-se o primeiro par, um grande e alongado submetacêntrico, o segundo par, um metacêntrico de tamanho similar ao cromossomo X e um par marcador, (no. 8), que apresenta uma constrição secundária no seu braço longo.

Para a descrição dos citótipos, eles serão, a partir de agora, denominados pelo nome de suas localidades e os rearranjos serão classificados conforme FREITAS (1997).

#### **4.1.1. Tavares 1 (31°23'S51°09'W):**

Neste ponto, o mais ao sul em que se havia descrito a presença de *C. minutus* antes desse trabalho, foram coletados 13 indivíduos, todos apresentando  $2n = 46b$  (Fig. 5a), já descrito por FREITAS (1990). O complemento autossômico desse citótipo é de 32 pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e 12 pares de cromossomos acrocêntricos.

#### **4.1.2. Tavares 2 (31°25'S51°10'W):**

A população de Tavares 2 foi polimórfica. Cinco indivíduos no total foram coletados neste ponto, sendo três indivíduos com  $2n = 47b$  (Fig. 5b) e dois com  $2n = 46b$ , sendo  $2n = 47b$ , híbrido entre  $2n=46b$  e  $48b$

#### **4.1.3. Bojuru 1 (31°38'S51°26'W):**

Na localidade de Bojuru, foram analisados 11 animais, sendo encontrado  $2n = 48b$  (Fig. 5c). Esta população também apresentou-se polimórfica para número de braços autossômicos, sendo encontrados oito animais com  $NA = 76$  e três com  $NA = 78$ . O complemento autossômico do citótipo mais freqüente constituiu-se de 15 pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e 8 pares de cromossomos acrocêntricos. A variação no NA foi devida a uma inversão no par 17.

#### **4.1.4. Bojuru 2 (31°44'S51°34'W e 31°45'S51°35'W):**

Esta população também foi polimórfica. Foram encontrados neste ponto, cinco indivíduos com  $2n = 49b$  (Fig. 5d) e três com  $2n = 50b$ , sendo  $2n=49b$ , híbrido entre  $48b$  e  $50b$ . O par heterozigoto é, neste caso, formado pelo rearranjo 24/16.

#### **4.1.5. São José do Norte (31°52'S51°53'W):**

Neste ponto foram coletados, 13 animais, sendo que esta população apresentou-se polimórfica. O citótipo mais freqüente foi denominado de  $2n=50b$  (Fig. 5e), e seu  $NA = 76$ . O complemento autossômico desse cariótipo foi de 14 pares de cromossomos metacêntricos e submentacêntricos, mais 10 pares de cromossomos acrocêntricos. Dois indivíduos apresentaram uma inversão no par 17, resultando em um  $NA= 77$ .

Resumidamente, os dados obtidos para as cinco populações estudadas encontram-se sumarizadas na Tabela 1:

Tabela 1: Total de fêmeas e machos encontrados por ponto, número autossômico e número diplóide no presente estudo.

Local	2n	NA	No. de Metacêntricos	No. de Acrocêntricos	Número de Fêmeas	Número de Machos	Total
Tavares -1	46b	76	32	12	10	3	13
Tavares - 2	47b	76	31	14	2	1	3
Tavares - 2	46b	76	32	12	2	0	2
Bojuru -1	48b	76	30	16	5	3	8
Bojuru - 1	48b	78	32	14	1	2	3
Bojuru - 2	49b	76	29	18	3	1	4
Bojuru - 2	49b	77	30	17	1	0	1
Bojuru - 2	50b	76	28	20	3	0	3
São José do Norte	50b	76	28	20	9	3	12
São José do Norte	50b	77	29	19	1	1	2
Total					36	15	51

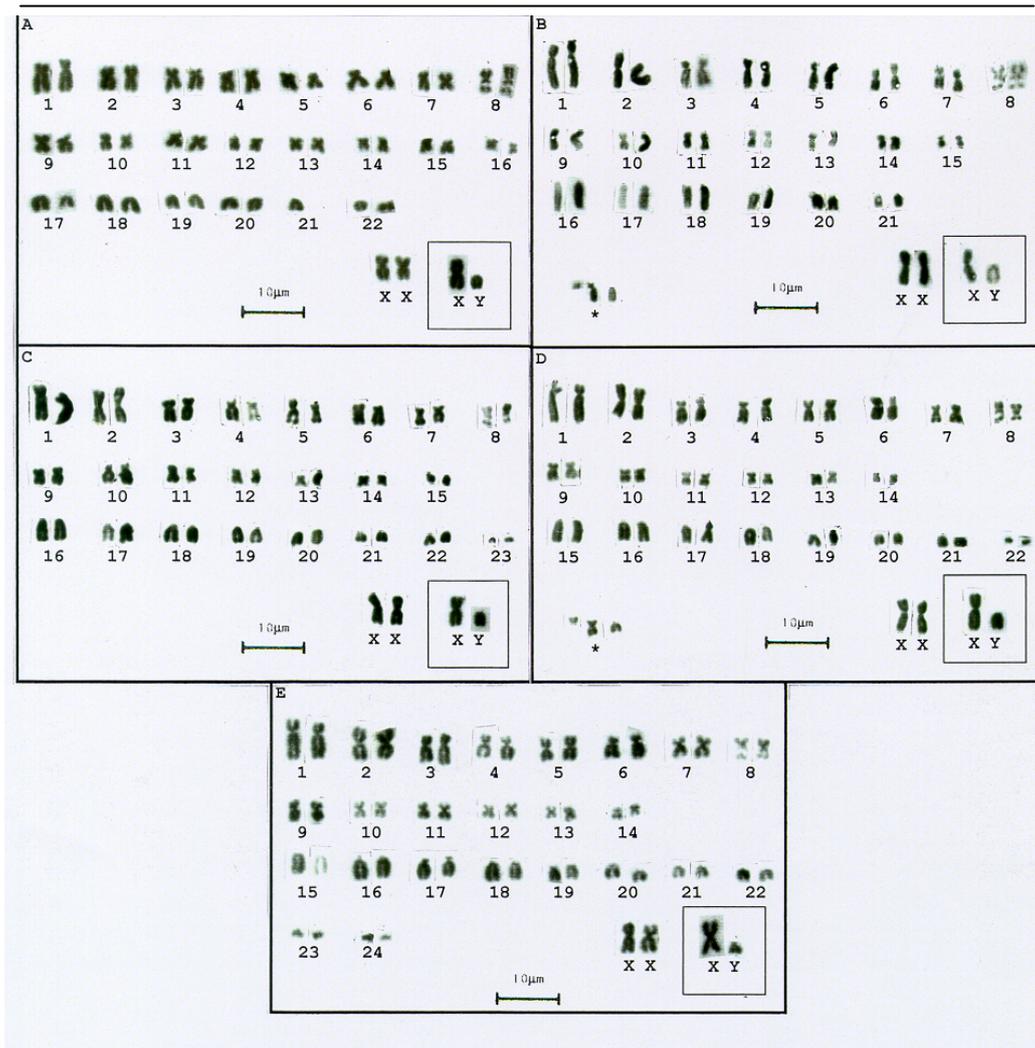


Figura 5: Cariótipos em coloração convencional. a)  $2n=46$  b)  $2n=47$  c)  $2n=48$  d)  $2n=49$  e)  $2n=50$ . Os asteriscos em b e d indicam o par heterozigoto.

## 4.2. Distribuição geográfica dos cariótipos de *Ctenomys minutus*

*Ctenomys minutus* apresenta na sua totalidade,  $2n=50a$  e  $b$ ;  $49a$  e  $b$ ;  $48a$  e  $b$ ;  $47a$  e  $b$ ;  $46a$  e  $b$  e  $42$  (Fig.6). Assim, são descritos ao longo da distribuição geográfica 11 formas cariotípicas diferentes. É importante ressaltar o padrão de distribuição geográfica destes cariótipos. FREITAS (1997) descreveu, do norte para o sul, deste Jaguaruna (SC) até Tavares (RS) a seguinte série:  $2n=50a$ ;  $46a$ ;  $48a$  e  $42$ . Continuando-se para o sul, temos agora,  $2n=46b$ ;  $48b$  e  $50b$ . Chama a atenção à peculiaridade que em ambos os extremos são encontrados  $2n=50$  e que, através de rearranjos cromossômicos reduz para o  $2n=42$ , situado mais ou menos no centro da distribuição geográfica. Pode-se então sugerir que tal distribuição só ocorre devido à forma da Planície Costeira do sul do Brasil, que se caracteriza por ser estreita.

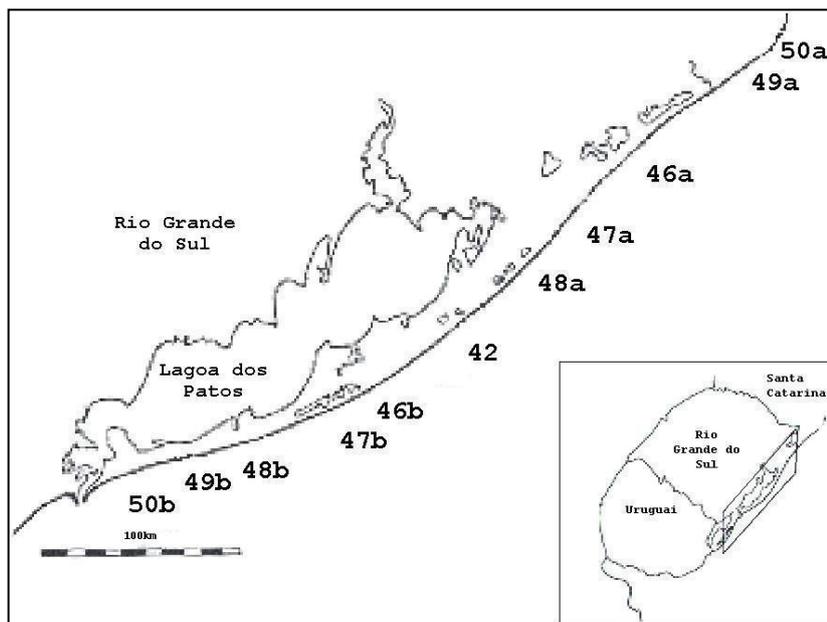


Figura 6: Variação cariotípica encontrada em *C. minutus* ao longo de sua distribuição geográfica.

## 4.3. Bandamento G e comparação com os outros cariótipos já descritos

O padrão de bandamento G obtido pode ser observado na Figura 7. Comparando-se com demais padrões de bandas G dos cariótipos de *C. minutus* (Fig. 8), pode-se notar que  $2n=50a$  apresenta os cromossomos 20 e 17 e que esses

estão fusionados na forma  $2n=50b$ . O par 2 está fissionado em  $2n=50b$ , sendo que apresenta ainda uma inversão pericentromérica que o transforma em um metacêntrico. Os cromossomos 23 e 19 são mantidos iguais entre as formas e o mesmo acontece entre os cromossomos 22, 24 e 16.

Os cariótipos  $2n=48a$  e  $2n=48b$  apresentam os mesmos cromossomos, com exceção do braço curto 2p de  $2n=48b$ , que se apresenta na forma metacêntrica.

Os citótipos  $2n=46a$  e  $46b$  se diferenciam pela presença do cromossomo 2 em  $2n=46a$  e pelo cromossomo metacêntrico referente ao braço curto. Os pares 23 e 19 são iguais, mas os cromossomos 22, 24 e 16 de  $NA=46a$  estão representados pela fusão em tandem de 24 e 16, com o par 22 livre. Já o  $2n=42$  possui todos os cromossomos dos arranjos em questão, fusionados (meta-submetacêntricos) conforme descrito por FREITAS (1997).

No que se refere aos híbridos, as diferenças encontram-se resumidas na Figura 9.

O  $2n=47b$  difere de  $2n=47a$  (Fig. 9.1) pelo par heterozigoto, formado pelos cromossomos 24 e 16 em  $2n=47b$  e pelo par 2 em  $2n=47a$ . Já em  $2n=49a$  e  $2n=49b$  a diferença não está no par heterozigoto, formado pelos cromossomos 23 e 19 (Fig. 9.2), mas sim, no par 2, que se encontra fusionado em  $2n=49a$  e fissionado com inversão em  $2n=49b$  e nos cromossomos 20 e 17, que se encontram fissionados em  $2n=49a$  e fusionados em  $2n=49b$ .

#### **4.4. Bandamento C**

Pouca quantidade de heterocromatina constitutiva foi encontrada no bandamento C dos três citótipos analisados. Três cromossomos apresentaram um bloco de heterocromatina constitutiva, que ocupou todo o braço curto em  $48b$  e  $50b$  e apenas um autossomo em  $46b$  (Fig.10). Também o cromossomo Y nos machos, independente de seu citótipo, é totalmente HC positivo.

Optou-se por não descrever o padrão de bandamento C de  $2n=47b$  e  $49b$  porque os mesmos apresentaram os padrões dos parentais.

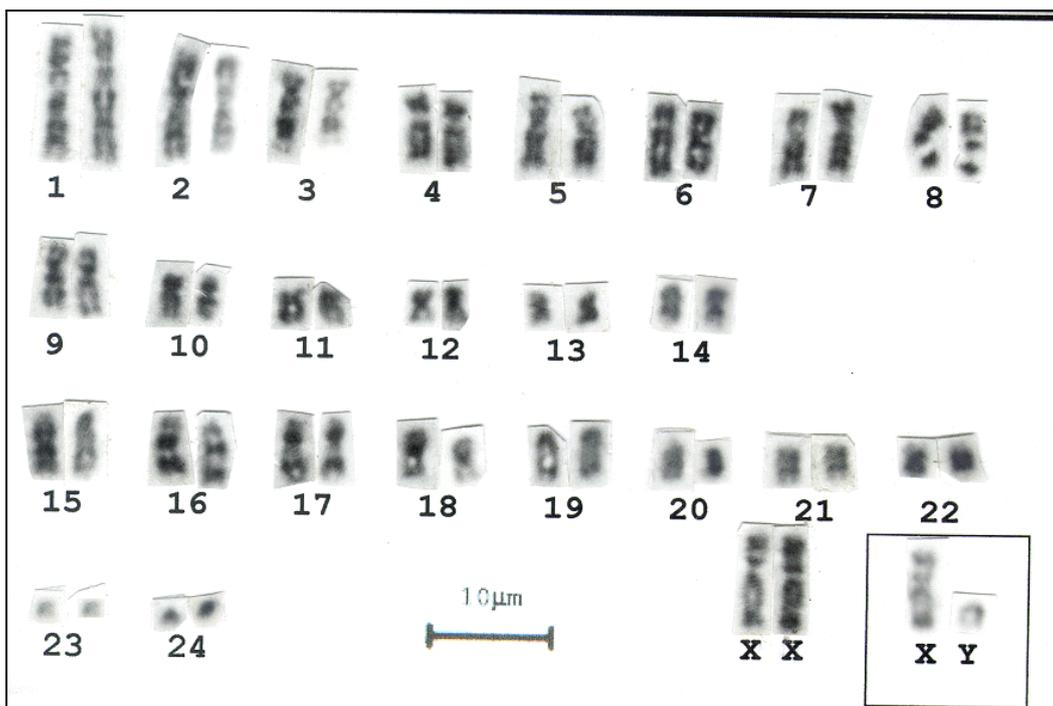


Figura 7: Bandamento G obtido para 2n=50b.

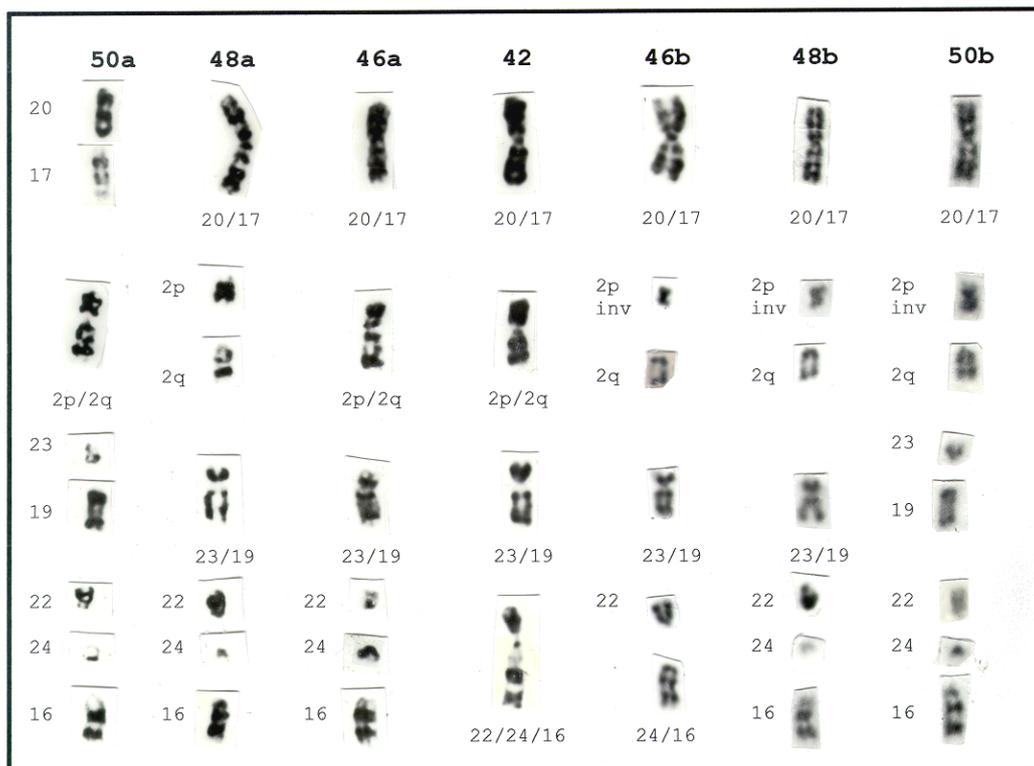


Figura 8: Comparação entre os citótipos  $2n=50b$ ,  $48b$  e  $46b$ , encontrados entre Tavares e São José do Norte e os demais, já descritos para *Ctenomys minutus*.  $2n=50a, 48a, 46a$  e  $42$  foram retirados de FREITAS (1997).



Figura 9: Comparação entre os híbridos encontrados por FREITAS (1990, 1997) e GAVA (1996) e os demais encontrados neste estudo. 1a)  $2n=47a$ . 1b)  $2n=47b$ . 2a)  $2n=49a$ . 2b)  $2n=49b$ .

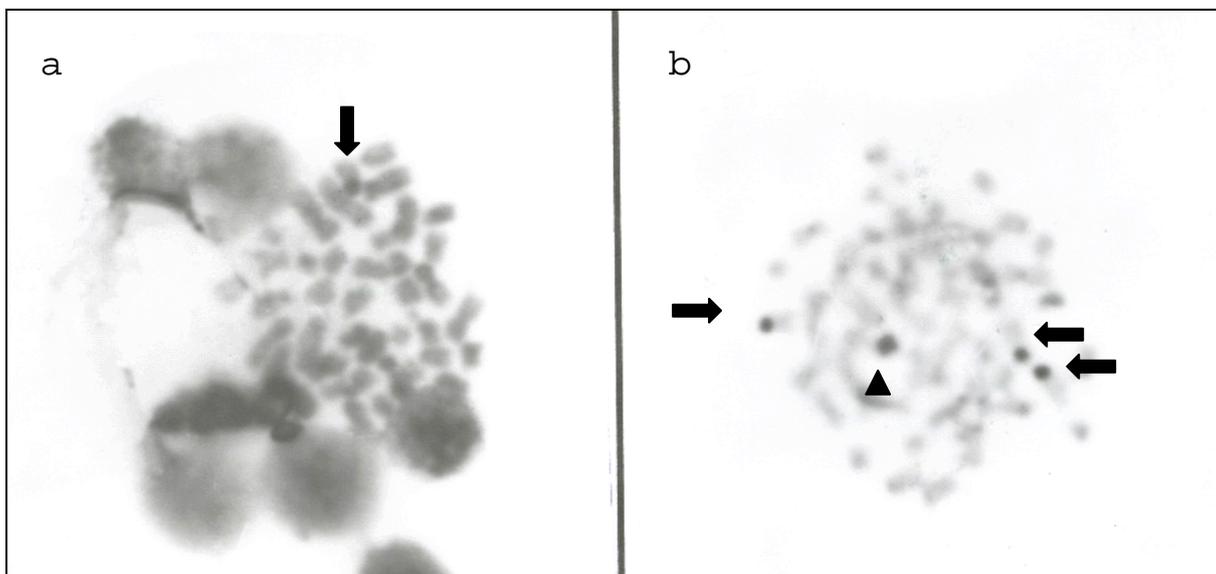


Figura 10: Bandamento C obtido para *Ctenomys minutus*. a) Macho de  $2n=50b$ . As setas indicam as marcações e o triângulo indica o cromossomo Y. Cabe ressaltar aqui que  $2n=48b$ , possui o mesmo padrão de  $50b$ . b) Fêmea de  $2n=46b$ .

#### **4.5. Bandamento NOR:**

Todos os citótipos analisados possuem uma marcação fraca na constrição secundária do braço longo do par marcador (Fig.11), o que poderia indicar pouca atividade da região organizadora de nucléolos.

#### **4.6. Meiose:**

Para analisar o comportamento dos híbridos para rearranjos robertsonianos durante a meiose, foram analisadas lâminas para a observação do pareamento cromossômico durante a diacinese dos machos  $2n=47b$  e  $2n=49b$ .

Apenas um macho  $2n=47b$  e um  $2n=49b$  foram coletados. Das diacineses analisadas (Fig.12), não foi observada a presença de trivalentes. Em algumas, foram inclusive observados, em vez da presença do número esperado de bivalentes mais o trivalente, um bivalente e um cromossomo a mais, o que poderia indicar a presença de um univalente.

#### **4.7. Fluorescence *in situ* hybridization - FISH:**

Como forma de avaliar os rearranjos encontrados, se realizou, além dos bandamentos convencionais, a técnica de FISH, para verificar se houve a preservação de seqüências teloméricas nas fusões observadas pelo bandamento G.

A seqüência telomérica foi observada em todas as extremidades dos cromossomos. Não foram observadas bandas teloméricas pericentroméricas em  $2n=50b$  (fig.13). Em  $2n=46b$  e  $48b$ , o grau de desnaturação das metáfases não possibilitou a análise.

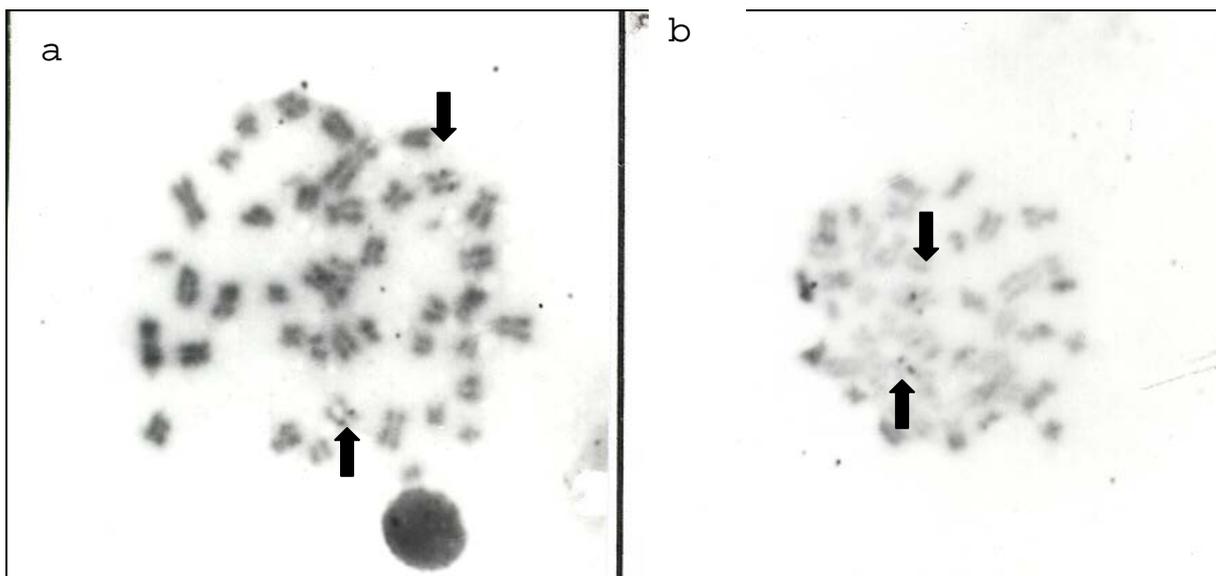


Figura 11: a) Bandamento NOR obtido para  $2n=50b$ . b)  $2n=48b$ . O mesmo padrão foi observado em  $2n=46b$ .

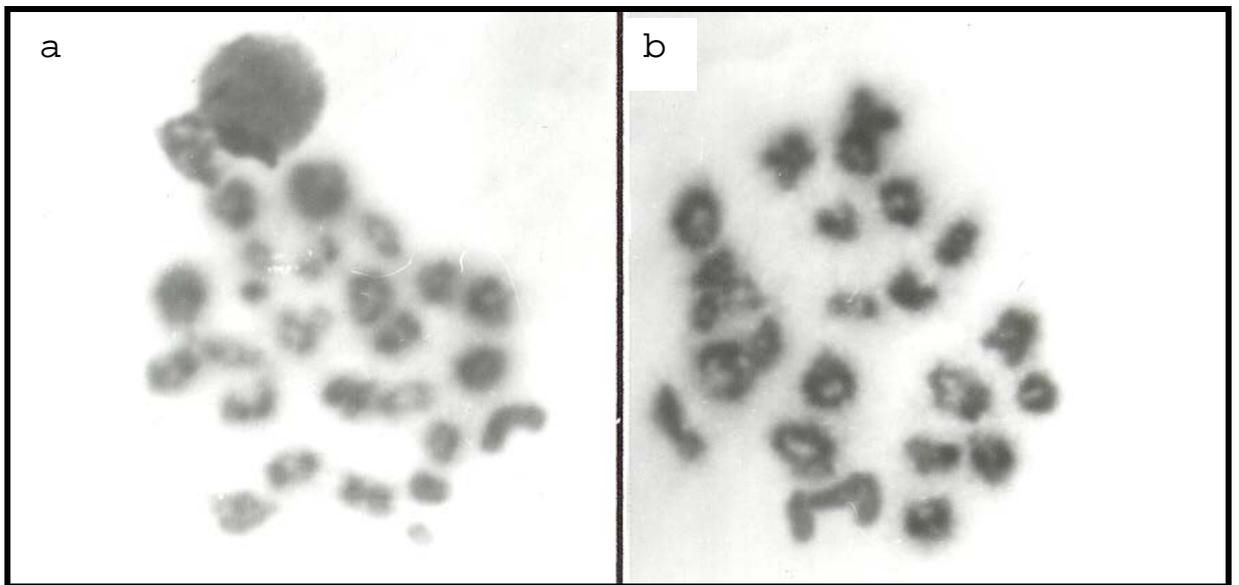


Figura 12: Diacinese (meiose I) de machos de *C. minutus* a).  $2n=47$  b)  $2n=49$ . Os dados foram obtidos a partir dos indivíduos CF 058 e CF 053 respectivamente

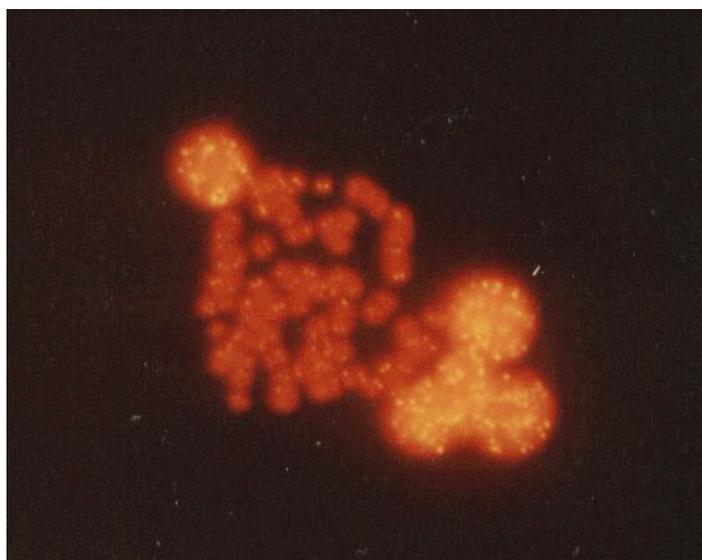


Figura 13: Marcações teloméricas obtidas por meio da técnica de FISH em 2n=50b.

#### 4.8. Análise Filogenética:

Da análise dos bandamentos realizados, obtiveram-se os seguintes caracteres, resumidos na tabela 2:

Tabela 2: Descrição dos caracteres obtidos com a análise dos bandamentos realizados em *C.minutus*.

<b>Caracter</b>	<b>Estado 0</b>	<b>Estado 1</b>	<b>Estado 2</b>
1- Fusão 20/17	ausente	presente	/
2- Fusão 2p/2q	ausente	presente	Ausente c/ inversão
3- Fusão 23/19	ausente	presente	/
4- Fusão 22/24/16	ausente	presente com todos os três fusionados	parcialmente presente (24 e 16 fusionados, 22 livre)
5- Presença de heterocromatina no par marcador	presente	ausente	/

Construiu-se então, a matriz codificada (Tabela: 03)

Tabela 3: Matriz codificada dos dados obtidos pelos bandamentos G e C em *C. minutus*.

Citótipo \ caracter	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>L58</b>	0	0	0	0	0
<b>M50a</b>	0	1	0	0	0
<b>M48a</b>	1	0	1	0	0
<b>M46a</b>	1	1	1	0	0
<b>M42</b>	1	1	1	1	0
<b>M46b</b>	1	2	1	2	1
<b>M48b</b>	1	2	1	0	1
<b>M50b</b>	1	2	0	0	1

\* L = *C. lami* M = *C. minutus*

A partir dessa matriz, realizou-se a análise filogenética. Oito árvores foram obtidas e a árvore de consenso encontra-se representada na figura 14.

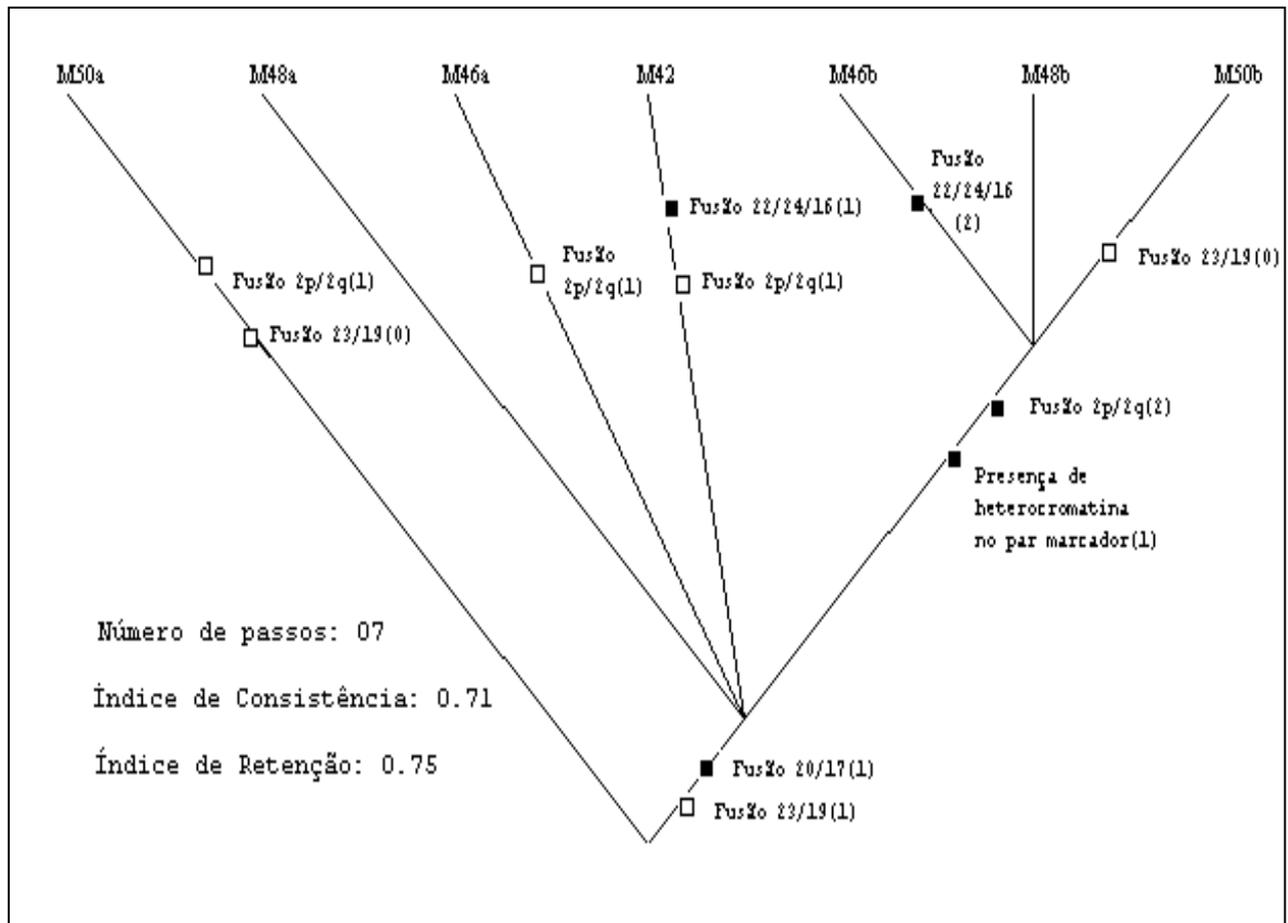


Figura 14: Árvore de consenso obtida a partir dos dados de bandamento cromossômico de *C. minutus*, utilizando *C. lami* como grupo externo (não representado). Os quadrados pretos e vazados representam homologias e homoplasias respectivamente e os números entre parênteses representam o estado do carácter.

O índice de consistência foi de 0.71 e o índice de retenção de 0.75.

O carácter 1 (fusão 20/17) foi o principal responsável pela separação de 50a do restante dos citótipos.

O grupo formado por 46b, 48b e 50b é apoiado por duas sinapomorfias, a do carácter 2 (fusão 2p/2q) e 5 (presença de heterocromatina no par marcador).

O caracter 4 (fusão 22/24/16) foi descartado para o cálculo do índice de consistência, pois, representou uma autapormofia para seus respectivos citótipos.

## DISCUSSÃO

Os novos citótipos encontrados entre Tavares e São José do Norte, apresentam as características básicas dos citótipos descritos por FREITAS (1990), FREITAS (1995) e GAVA (1996). Também os rearranjos observados aqui, são conseqüências de rearranjos Robertsonianos e fusões em tandem, como nos demais citótipos.

### 5.1. Bandamento G

O bandamento G é uma das técnicas mais usadas em cariólogia de mamíferos pois permite a identificação de todos os braços cromossômicos e baseia-se no fato de que a interação DNA-proteína, sendo diferente, produz locais preferenciais de ataque para a enzima tripsina no cromossomo. Estes locais preferenciais obedecem a um padrão relativamente uniforme, o que permite identificar pelas bandas resultantes, quais os pares de cromossomos que são homólogos (MACGREGOR, 1993).

Neste trabalho, o bandamento G foi utilizado tanto para o pareamento dos cromossomos conforme a Figura 7 como para o estabelecimento das homeologias e da maioria dos caracteres utilizados para a análise filogenética. Cabe salientar aqui, que os rearranjos detectados para  $2n= 46b$ ,  $47b$ ,  $48b$ ,  $49b$ , e  $50b$  encontram-se nos mesmos cromossomos dos já descritos por FREITAS (1997).

### 5.2. Análise da heterocromatina constitutiva (HC)

Além da diferença no número cromossômico, outros rearranjos cromossômicos podem ser encontrados nas populações, dentre eles, adições e deleções de heterocromatina (SEARLE, 1993). Esses rearranjos são um dos responsáveis, por exemplo pelas poucas diferenças encontradas entre os tuco-tucos

do grupo de espécies denominado de *Mendocinus* (MASSARINI *et al.*,1991) ou ainda, pelas diferenças encontradas em *C. flamarioni* (FREITAS,1994).

A heterocromatina é formada basicamente por seqüências de DNA satélite (VERMA, 1988), freqüentemente seqüências simples ou moderadamente repetitivas, com homologia para elementos transponíveis (EISSENBURG & HILLIKER, 2000). Esse fato foi comprovado para *Ctenomys* por ROSSI *et al.* (1995), através de comparações entre bandas C e hibridização *in situ*, sendo essas seqüências formadas, em *C. flamarioni* por blocos marcadores tanto com ligações A-T quanto C-G, além de bandas heterogêneas formadas pelos dois tipos de ligação (BITTENCOURT *et al.*,2000).

GAVA (1996) também observou, utilizando diferentes enzimas de restrição para observar o comportamento das regiões heterocromáticas, que a HC encontrada associada à região da NOR em *C. minutus*, possui características distintas da HC encontrada no cromossomo Y, por exemplo.

Segundo KING (1991), três processos evolucionários são propostos para a variação da heterocromatina:

- 1- A adição de heterocromatina em locais particulares do cromossomo;
- 2- A transformação de eucromatina em heterocromatina constitutiva;
- 3- Evolução em concerto de múltiplos locais de heterocromatina.

No primeiro caso, a adição de heterocromatina resulta da amplificação de seqüências de DNA repetitivo que provavelmente levam ao aumento no comprimento do cromossomo, sendo que, no segundo caso, essas alterações não são observadas. A evolução em concerto com modificação de uma família de DNA repetitivo leva a um comportamento homogêneo dos mesmos. Este último processo é mais fácil de ocorrer dentro de uma espécie do que entre espécies (KING,1991).

Para o gênero *Ctenomys* diferentes padrões de banda C, com diferentes quantidades de heterocromatina podem ser observados. REIG *et al.* (1990) classificou as espécies desse gênero em três grupos:

- 1- Bandas C negativas na maioria dos cromossomos, encontrando-se, quando presentes, próximas ao centrômero envolvendo, no máximo, 20% dos

cromossomos. Como é o caso de *C. perrensis*, *C. dorbignyi*, *C. torquatus* e *C. roigi*, sendo esse caráter considerado plesiomórfico para o gênero;

2- Bandas C positivas na região centromérica de cerca de pelo menos, 50% dos cromossomos. Neste grupo estão, por exemplo, *C. steinbachi*, *C. occultus*, *C. opimus* entre outros;

3- Fortes bandas C nas regiões de braços curtos e regiões centroméricas dos cromossomos. Aqui são classificadas todas as espécies pertencentes ao grupo 'Mendocinus'.

Em *C. minutus*, FREITAS (1997) encontrou diferenças na quantidade de heterocromatina constitutiva no norte em relação ao sul da distribuição, com grande quantidade no norte e pequena no sul. Este padrão parece manter-se nos citótipos descritos no presente trabalho, pois pouca quantidade de heterocromatina foi encontrada nos cariótipos do sul, apesar de um pequeno aumento no  $2n=48b$  e  $2n=50b$  em relação ao  $46b$ .

No entanto, segundo GALLARDO (1991) e GARCIA *et al.* (2000a), aparentemente tendências de aumento ou diminuição do número cromossômico e mudanças na eucromatina são independentes das mudanças na quantidade de heterocromatina.

Além disso, estudos têm demonstrado que as características da heterocromatina não são tão conservadas nos homólogos quanto são as bandas G (GARCIA *et al.*, 2000a), o que poderia explicar a presença das mesmas em número ímpar.

Quanto à pequena quantidade de heterocromatina encontrada, a mesma deve estar relacionada com o fato de que, em citótipos muito rearranjados, a mesma é gradativamente perdida.

Vale a pena ressaltar também, que a marcação encontrada na região centromérica do para marcador em outros citótipos, não foi encontrada em nenhum dos novos citótipos.

### 5.3. Região organizadora de nucléolos – NOR

É postulado que a coloração com prata da região NOR representa a atividade transcricional prévia dos genes ribossômicos (PATHAK & HSU, 1979; CLARK & WALL, 1996), já que a prata liga-se especificamente à grupos sulfidril e disulfidril das duas ou três proteínas ácidas identificadas como proteínas das NOR e que estariam relacionadas com a transcrição ou processamento de RNA pré-ribossomal em vez de ligar-se ao DNA ou RNA (HOWELL, 1977).

Além disso, o tamanho da banda NOR pode variar entre indivíduos de uma determinada espécie devido a diferenças no número de cópias do gene ribossômico, provavelmente por um processo de duplicação ou deleção (BUSIN *et al.*, 2001).

A localização das bandas NOR encontradas nesse estudo é a mesma das encontradas para os outros citótipos descritos por FREITAS (1990) para a espécie, ou seja, na constrição secundária do braço longo do par marcador. A marcação fraca encontrada pode indicar que as células analisadas encontravam-se pouco ativas.

### 5.4. Meiose

Paralelamente aos estudos dos cromossomos mitóticos, é importante a análise da meiose para analisar a segregação cromossômica. Isto é particularmente relevante quando encontramos organismos com características intermediárias entre duas populações geograficamente contíguas, porém cariotipicamente diferentes. (ALMEIDA *et al.*, 2001).

A fecundidade dos heterozigotos para um rearranjo Robertsoniano depende de, pelo menos dois aspectos:

- 1- Formação de um trivalente.
- 2- Orientação do mesmo no fuso da primeira divisão meiótica.

Para uma segregação balanceada, é necessário que os braços do cromossomo metacêntrico pareiem com seus homólogos dissociados.

As fibras do fuso acromático podem se associar de duas formas para orientar o ao trivalente:

1- Linearmente, levando á formação de gametas aneuplóides;

2- Alternadamente (em zigue-zague), fazendo com que os acrocêntricos vão para um dos lados, e o metacêntrico para outro (WHITE,1978).

Muitos estudos têm demonstrado que, apesar dos problemas que podem surgir na meiose, aparentemente em alguns casos, a fertilidade do híbrido não é afetada. Um exemplo é o trabalho de ROGATCHEVA *et al.*(1997), com hibridação em laboratório de dois citótipos distintos do insetívoro *Suncus murinus*, que demonstram que a fertilidade da F1 não foi afetada.

WALLACE *et al.* (1992) observaram freqüências de não disjunção na anáfase de híbridos naturais de *Mus domesticus* e concluíram que esta não difere da taxa que ocorre naturalmente em animais homozigotos, sendo que a única diferença encontrada foi uma maior taxa de morte de células germinativas nos heterozigotos, o que, não chega a ter um efeito perturbador sobre a fertilidade dos mesmos. Já BRITTON-DAVIDIAN *et al.* (2000) e PIÁLEK *et al.* (2001), também estudando o gênero *Mus*, observaram um nível considerável de esterilidade nos híbridos, o que, para eles, pode ser a um eficiente mecanismo de isolamento. Outros ainda defendem que a esterilidade estaria ligada ao sexo do híbrido (regra de Haldane), pois, espermatócitos parecem ser mais sensíveis que oócitos a presença de configurações meióticas anômalas (PIÁLEK *et al.*, 2001)

Independente desses estudos, autores como RIESEBERG (2001) defendem que, mesmo que o rearranjo cause pequeno ou nenhum efeito sobre o “fitness”, já que existem mecanismos para diminuir os problemas de pareamento, ainda assim haverá redução do fluxo gênico pela supressão da recombinação, o que, de um modo ou de outro, levará a uma diferenciação.

GAVA (1996) e GAVA & FREITAS (*in press*) observaram a formação de trivalentes em híbridos de *C. minutus*, entre  $2n=46a$  e  $48a$ , além disso, cortes histológicos das gônadas de um indivíduo híbrido constataram a presença de espermatozóides na luz dos túbulos testiculares, o que, não informa sobre o nível de fertilidade do indivíduo mas, indica que não houve aparente mudança no processo de espermiogênese (GAVA, 1996).

No presente trabalho, apenas dois híbridos, um de cada citótipo, foram analisados. A aparente ausência de trivalentes em ambos os heterozigotos, aliado ao fato de, em algumas diacineses, em vez da presença do número esperado de

bivalentes mais o trivalente, observar-se um cromossomo a mais, pode indicar a presença de um univalente. Para confirmar esse fato, e, para podermos discutir melhor como isso pode influenciar na fertilidade dos híbridos, deve-se, contudo, aumentar o tamanho amostral.

## 5.5. Técnica de FISH

A hibridação *in situ* é uma metodologia utilizada para a visualização de seqüências definidas de ácidos nucléicos através da hibridação de seqüências complementares, chamadas sondas (ROGATTO & RAINHO, 2000).

A seqüência escolhida neste trabalho foi a telomérica, pois telômeros são entidades importantes na replicação e estabilidade das extremidades cromossômicas dos eucariotos (MEYNE *et al.*, 1990; FRIEBE *et al.*, 2001), sendo encontrados, inclusive, nas extremidades de cromossomos B (PEPPERS *et al.*, 1997).

A conservação dessa seqüência em amostras de vários grupos de vertebrados a torna a ferramenta ideal para estudos de evolução, podendo indicar inclusive, eventos de fusão cromossômica (MEYNE *et al.*, 1990), como é, por exemplo, o caso dos resultados encontrados para *Gracilinanus microtarsus*, *Micoreus demerarae*, *Monodelphis sp.*, *M. domestica*, *M. kungsi* e *M. brevicaudata* (CARVALHO & MATTEVI, 2000) e para *Oryzomys subflavus* (MIRANDA *et al.*, *in press*). No caso de rearranjos como inversões, no entanto, a técnica é pouco informativa (STANYON *et al.*, 2001).

O citótipo  $2n=50b$  não apresentou marcação pericentromérica da seqüência acima citada. GARAGNA, *et al.* (1995) e METCALFE *et al.* (1998) afirmam que, no entanto, que nem sempre essa seqüência é retida durante os eventos de fusão. Uma maneira de testar se a ausência de sinais na região centromérica de cromossomos metacêntricos envolvidos em fusões é devida a perda das seqüências teloméricas ou a inabilidade de detectar a seqüência  $(T_2AG_3)_n$  seria utilizar uma sonda de mini satélite, que é considerada mais sensível (GARAGNA, *et al.* 1995).

## 5.6. Considerações sobre as zonas híbridas encontradas

Quando uma determinada raça cromossômica definida por um particular metacêntrico faz contato com a raça cromossômica acrocêntrica complementar, três tipos de indivíduos são esperados: 1- Homozigotos metacêntricos, 2- Heterozigotos, 3- Homozigotos com os dois acrocêntricos complementares ao acrocêntrico .

Como não foram encontrados indivíduos  $2n=48b$  tanto em Tavares 02 quanto em Bojuru 02, duas hipóteses podem ser formuladas. A primeira é que se tratam de duas zonas híbridas e a segunda é a de que as configurações encontradas são apenas polimorfismos de cada uma das populações.

No entanto, como os pares heterozigotos de  $2N=47b$  e  $49b$  serem os esperados para híbridos  $2n=46b \times 2n=48b$  e  $2n=48b \times 2n=50b$  respectivamente, aliado a localização dos mesmos, que, encontram-se justamente separadas por uma população de  $2n=48b$  e também ao número amostral reduzido, passaremos a considerar que as duas populações são híbridas, mesmo porque, muitas zonas híbridas são caracterizadas por manchas de cariótipos diferentes (PATTON,1993), como acontece com a zona híbrida descrita para *C. minutus* por GAVA, 1996 e GAVA & FREITAS (*in press*) o que pode ter levado a ausência de um dos parentais na amostra.

Zonas híbridas, tanto intra, quanto interespecíficas, são muito difundidas entre mamíferos eutérios (SEARLE, 1993). Alguns exemplos são os estudos realizados com *Sorex araneus* (WÓJCIK,1993; SEARLE & WÓJCIK, 1998); *Spalax ehrenbergi* (WAHRMAM *et al.*,1985), *Uroderma bilobatum* (BAKER,1981), ou para os gêneros *Thomomys* (PATTON, 1973; PATTON *et al.* 1979; PATTON,1993), *Geomys* (PEMBLETON & BAKER, 1978; BAKER *et al.* 1989; PATTON, 1993) e *Mus* (CAPPANA, 1985; CORTI *et al.*, 1990; WALLACE *et al.*,1992).

A zona híbrida melhor descrita em *C. minutus* apresenta-se com cerca de 10 km e caracteriza-se por apresentar as formas diferenciadas distribuídas ao longo de suas áreas de um modo não contínuo. A aparência no interior da zona é a de uma série de pequenas manchas formadas por indivíduos homozigotos e heterozigotos (GAVA,1996; GAVA & FREITAS, *in press*). Análises craniométricas das populações que contém as formas híbridas sugerem algum grau de divergência morfológica entre citótipos (MARINHO & FREITAS, 2000).

A largura absoluta de uma zona híbrida pode ser definida como a distância mínima entre uma raça parental e outra, sendo, no entanto, melhor considerar apenas as áreas de maior densidade de híbridos, podendo também calculá-la por meio da frequência do metacêntrico, quando as raças são caracterizadas por apenas um metacêntrico que é encontrado em uma delas e que não é encontrado em outra (SEARLE & WÓJCIK, 1998). Como este experimento foi delineado com coletas ocorrendo de 20 em 20km, não se pode estimar qual seria a largura exata das zonas encontradas, podendo-se afirmar, apenas, que são inferiores a 40km, já que esta é a distância entre os parentais. Futuramente, mais coletas devem ser realizadas para melhor caracterizar essas zonas.

Como muitas zonas híbridas podem ser explicadas invocando as contrações e expansões do Pleistoceno e Pós- Pleistoceno (HARRISON, 1993), e, analisando-se a formação da Planície Costeira do Rio Grande do Sul, podemos notar que, o último período glacial (Wiscosiano), há 20.000 anos provocou uma regressão do nível do mar em cerca de 100m, o que fez com que a planície costeira se alargasse até 120-130km mar adentro. Durante o período após a glacial, entre 17.500 anos a 16.000 anos atrás, o nível do mar começa a subir, continuando a subir, com três fases distintas de estabilização, até que, a 6.500 anos, passa a, no mínimo, duas vezes o nível atual (URIEN *et al.*, 1980; AB'SABER, 1990; CORRÊA, 1996). Essa elevação do nível do mar causou a abertura de uma saída para o oceano no local denominado atualmente de Barra Falsa (fig. 15).

A feição denominada Barra Falsa está localizada sobre a barreira arenosa III (31°35'S; 51°28'W), a 87km ao norte do canal atual de comunicação da laguna dos Patos com o oceano. A Barra Falsa ocupa uma extensão superficial da ordem de 15km<sup>2</sup>, com profundidade média inferior a 1m e comprimento aproximado, no sentido oeste-leste, de 8km, e pode representar um paleocanal de comunicação entre a laguna e o oceano Atlântico, que se manteve ativo no período de 2.080 e 2.450 anos A.P. (TOLDO Jr. *et al.*, 1991), quando o nível do mar começa a descer até o atual.



## 5.7. Análise filogenética

Filogenia nada mais é que a indicação das relações de ancestralidade supostas para um conjunto de espécies e envolve o uso de relações genealógicas entre grupos, em conjunto com outros caracteres para investigar questões relacionadas à seqüência de origem do carácter, seus padrões de divergência e os processos envolvidos nessa divergência (BROOKS *et al.*,1995).

Entre os diversos critérios auxiliares para o reconhecimento das homologias, o de comparação com um grupo externo é o que tem sido o mais usado e melhor justificado com base na metodologia da parcimônia (MADDISON *et al.*,1984; SWOFFORD *et al.*; 1996), sendo por isso, adaptado para os dados citogenéticos utilizados para a formulação de nossa hipótese filogenética.

No que se refere ao gênero *Ctenomys*, ORTELLS (1995) construiu uma filogenia para as espécies do gênero baseado em bandas G, obtendo um cladograma que indicou que baixos números diplóides e fundamentais são características plesiomórficas para o gênero. Além disso, GARCIA *et al.* (2000a) utilizaram bandas G e C, para estabelecer relações entre as espécies *C. talarum*, *C. rionegrensis*, *C. pearsoni* e *C. dorbignyi*.

Em nossa análise, inicialmente os caracteres foram considerados como não ordenados, pois, em nossa série de transformação, apesar de, aparentemente podermos considerar nossas condições derivadas como sucessivamente apomórficas, para não haver nenhuma subjetividade, deixou-se que o grupo externo polarizasse os caracteres, estabelecendo a direção das modificações evolutivas. Uma análise considerando-se os caracteres como ordenados foi também realizada, resultando na mesma topologia de árvore.

Além disso, o critério de otimização dos caracteres foi definido *a posteriori*, sendo escolhido DELTRAN , optando-se pelo surgimento independente, apesar de que, segundo MADDISON *et al.* (1984), o mais parcimonioso é optar pela reversão, em alguns casos esse critério pode forçar a análise. Para PATTON (1969), é mais parcimonioso acreditar que fusões ocorram independentemente, do que um carácter que sofreu fusão, reverta para uma fissão (pois para tanto, muitas estruturas cromossômicas deveriam ser criadas).

Como, basicamente os rearranjos foram formados por fissões e fusões, os dados basearam-se apenas neste critério, pois, o estabelecimento de caracteres baseados em braços cromossômicos, neste caso, tornar-se-ia redundante.

A árvore de consenso resultante apresentou duas politomias. Inicialmente, politomias foram observadas por LARA *et al.* (1996), em roedores equimídeos, o que foi confirmado em seguida para *Ctenomys* por LESSA & COOK (1998) e MASCHERETTI *et al.* (2000), que observaram que várias relações basais entre espécies do gênero estão pobremente resolvidas e sugerem a possibilidade de uma grande politomia devido a uma potencial radiação simultânea, com maioria das linhagens sendo formada nesta época. Essa afirmação vale também para a variação intraespecífica.

Como os índices de consistência e de retenção, que expressam, respectivamente, a relação entre o número total de caracteres apomórficos com o número efetivo de passos ocorridos e a diferença entre o número efetivo de passos e o número máximo de passos possíveis (AMORIN, 1997), foram próximos a um, o que significa que houveram poucas homoplasias e um maior número de caracteres sinapomórficos não autopomórficos também pequeno, e a intenção dessa análise era apenas estabelecer relações, não se realizou nenhuma análise com índices de apoio a consistência do ramo (como *bootstrap*, por exemplo).

O citótipo 2n=50a pode ser considerado mais basal, enquanto 2n=46b, 48b e 50b apresentam as características mais derivadas (apomorfias).

Ao compararmos árvore obtida com a sua localização geográfica (fig. 16), 2n=50a é o que se encontra mais isolado devido à presença do Rio Araranguá, formado a pelo menos entre 15 e 13 milhões de anos (DILLENBURG, *comun. pess.*), o que, além de estar de acordo com o grupamento formado, também está de acordo com o bloco norte descrito por FREITAS (1990) e FREITAS (1997).

Quanto à separação dos grupos 46a, 48a, 42 e 46b, 48b, 50b, duas hipóteses podem ser levantadas. A primeira é de que existiram fatores extrínsecos que levaram a separação desses grupos, ou seja, uma barreira geográfica. A segunda é que os dois rearranjos que dão suporte ao segundo grupo tenham formado uma barreira reprodutiva entre eles. No último caso, segundo FREITAS (*comun. pess.*), essa seria a primeira vez que isso ocorreria para o gênero *Ctenomys*.

Analisando os dados geológicos disponíveis, nenhuma barreira geográfica pôde ser encontrada dividindo esses grupos, já que a barreira mais próxima, é recente e encontra-se na região que separa  $2n=46a$  e  $2n=42$ , o que explica a zona híbrida encontrada ali. Além disso, dados sobre híbridos entre  $2n=42$  e  $2n=46b$  também não se encontram disponíveis, o que reforçaria a segunda hipótese.

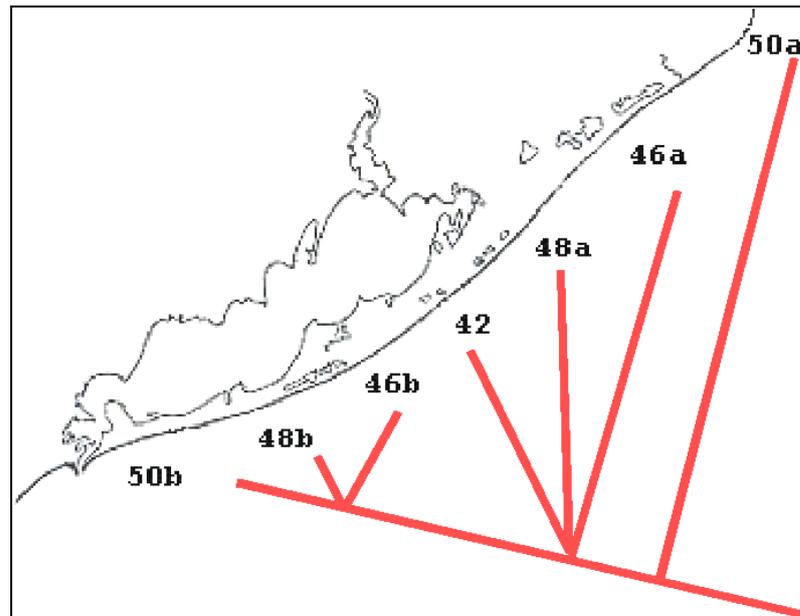


Figura 16: Distribuição geográfica dos cariótipos analisados e suas respectivas relações filogenéticas

## CONCLUSÃO:

Dados citogenéticos, principalmente de rearranjos cromossômicos, são críticos para testar modelos e idéias sobre evolução cromossômica, tais como: especiação estasiopátrica; efeito da estrutura social; função do tamanho da deme; processo em cadeia; modelo de canalização; megaevolução cariotípica; efeito do tamanho do corpo e especiação por fusão cêntrica (SITES & MORITZ, 1987; BAKER *et al*, 1988). Sendo assim, o estudo dos polimorfismos encontrados em *C. minutus* pode ajudar, no futuro, a elucidar como essa enorme variabilidade cariotípica está atuando na diferenciação dessas formas.

Particularmente nesse trabalho foram descritos quatro novos números diplóides para a espécie *C. minutus*, sendo eles  $2n=47b$ ,  $2n=48b$ ,  $2n=49b$  e  $2n=50b$ . O outro número diplóide encontrado  $2n=46b$ , já era descrito para a localidade por FREITAS (1997).

Os achados indicam também a existência de duas prováveis novas zonas híbridas para a espécie, com, pelo menos uma delas, resultante de um contato secundário, após regressão do nível do mar e fechamento ligação existente entre a lagoa dos Patos e o oceano, na feição atualmente denominada de Barra Falsa, na localidade de Bojuru, a cerca de 2.300 anos. Contudo, mais coletas para a comprovação dessa hipótese devem ainda ser realizadas.

Pouca heterocromatina constitutiva foi encontrada nos novos citótipos, assim como pouca atividade foi observada na região da NOR.

A aparente ausência de trivalentes em ambos os heterozigotos, a possível presença de um univalente, e como isso afeta a fertilidade dos híbridos, deve ainda ser melhor investigada. Para tanto, deve-se aumentar o tamanho amostral na região das zonas híbridas.

Na técnica de FISH, não foram observadas marcações etópicas da seqüência telomérica  $(T_2AG_3)_n$  em  $2n=50b$ . Nos demais citótipos, devido desnaturação dos cromossomos, não foi possível chegar a uma conclusão.

Apesar dos bandamentos terem revelado poucos caracteres informativos para a análise filogenética, pôde-se observar a formação de três grupos, sendo o mais basal representado por 50a e o mais derivado, por 46b, 48b e 50b. A formação do

grupo basal pode ser explicada pela presença do Rio Araranguá, que atuaria como uma barreira geográfica.

Quando a separação dos outros dois grupos, duas hipóteses puderam ser formuladas. Uma, explicada por fatores extrínsecos e outra por fatores intrínsecos. Como nenhuma barreira geográfica que explique a separação foi encontrada, a explicação alternativa é que os dois rearranjos 2 e 5, que dão suporte a um dos grupos, poderiam ser responsáveis pelo surgimento de uma barreira reprodutiva. Contudo, mais estudos devem ser realizados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, A.N. 1990. Paleoclimas Quaternários e Pré-história da América tropical I. **Revista Brasileira de Biologia**,50(4):805-820.
- ALMEIDA, C.A.S.; BONVICINO, C.R.; LACHTERMACHER, M.; MOREIRA, M.A.M.; OLÍCIO, R. & SEUÁNEZ, H.N. 2001. Técnicas de Avaliação da Diversidade Genética. In GARAY, I & DIAS,B. 2001. **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais**. Petrópolis: Vozes.430p.
- AMORIN, D.S. 1997. **Elementos Básicos de Sistemática Filogenética**. 2<sup>a</sup> ed. Holos Editora: Ribeirão Preto.
- ANDERSON, S; YATES, T.L. & COOK, J.A. 1987. Notes on Bolivian mammals. 4: The Genus *Ctenomys* (Rodentia - Ctenomyidae) in Eastern Lowlands. **American Museum Novitates**. 2891:1-20.
- AVISE, J.C. 1994. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall.511p.
- BAKER, R.J. 1981. Chromosome flow between chromosomally characterized taxa of a volant mammal: *Uroderma bilobatum* (Chiroptera; Phyllostomatidae). **Evolution**,35:296-305.
- BAKER, R.J. QUMISYEH, M.B. & HOOD, C.S. 1987. **Role of chromosomal banding patterns in understanding mammalian evolution**. In: GENOWAYS, H.H. Current Mammalogy,1:67-89.
- BAKER, R.J. QUMISYEH, M.B. & RAUTENBACH, I.L. 1988. Evidence for eight tandem and five centric fusions in the evolution of the karyotype of *Aethomys namaquensis* A. Smith (Rodentia: Muridae). **Genetica**,76:161-169.
- BAKER, R.J.; DAVIS, S.K.; BRADLEY, R.D.; HAMILTON, M.J. & VAN DEN BUSSCHE, R.A. 1989. Ribosomal-DNA, mitochondrial-DNA, and allozymic studies on a contact zone in the pocket gopher, *Geomys*. **Evolution**,43:63-75.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. & HAUSSER, J. 2000. Estimating gene flow across hybrid zones: how reliable are microsatellites. **Acta Theriologica**,45(1):93-101.

- BARTON, N.H. & HEWITT, G.M. 1989. Adaptation, speciation and hybrid zones. **Nature**,**341**:497-503.
- BARTON, N.H. & GALE, K.S. 1993. Genetic Analysis of Hybrid Zones. In: HARRISON, R.G. **Hybrid Zones and the Evolutionary Process**. Oxford University Press: Oxford.13-45.
- BARTON, N.H. 2001. The role of hybridization in evolution. **Molecular Ecology**,**10**:551-568.
- BENAZZI, M, 1973. Cytotaxonomy and Evolution: General Remarks. In: CHIARELLI, A.B. & CAPANNA, E. **Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution**. Academic Press Inc: London. 3-14.
- BENGTSSON, B.O. 1980. Rates of karyotype evolution in placental mammals. **Hereditas**,**92**:37-47.
- BIELEC, P.E.; GALLAGHER, D.S.; WOMACK, J.E. & BUSBEE, D.L. 1998. Homologies between human and dolphins chromosome detected by chromosome painting. **Cytogenetics and Cell Genetics**,**81**:18-25.
- BITTENCOURT, F.; FERNÁNDEZ,G; SILVA., J.; EL JUNDI, T. & FREITAS, T.R.O. 2000. Caracterização da heterocromatina constitutiva de *Ctenomys flamarioni* – Rodentia, Octodontidae. In: **46º Congresso Brasileiro de Genética**. Águas de Lindóia –SP. Anais.
- BRITTON-DAVIDIAN, J.CATALAN, J.RAMALHINHO, M.G.; GANEM,G.; AUFRAY, J.C.; CAPELA,R.; BISCOITO, M.; SEARLE, J.B. & MATHIAS, M.L. 2000. Rapid chromosomal evolution in island mice. **Nature**,**403**:158.
- BOWEN, B.W.1999. Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. **Molecular Ecology**,**8**:s5-s10.
- BROOKS, D.R.; McLENNAN, D.A.; CARPENTER, J.M.; WELLER, S.G. & CODDINGTON, J.A. 1995. Systematics, Ecology, and Behaviour: Integrating phylogenetic patterns and evolutionary mechanisms. **BioScience**,**45(10)**:687-696.
- BUSIN, C.S.; VINCIPROVA, G. & RECCO-PIMENTEL, S.M. 2001. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). **Genetica**,**110**:131-141.

- CARVALHO, B. de A. & MATTEVI, M.S. 2000.  $(T_2AG_3)_n$  telomeric sequence hybridization suggestive of centric fusion in karyotype marsupials evolution. **Genetica**,**108**:205-210.
- CAPANNA, E. 1985. Karyotype variability and chromosome translocation in rodents: The case of the genus *Mus*. In: LUCKETT & HARTENBERGER (eds) . 1985. **Evolutionary relationships among rodents. A multidisciplinary analysis**. Plenum Press: New York. p. 643-670.
- CLARK, M.S. & WALL, W.J. 1996. **Chromosomes: The complex code**. Chapman & Hall: London. 345p.
- CIMARDI, A.V. 1996. **Mamíferos de Santa Catarina**. Florianópolis: FATMA. 302p.
- COOK, J.A.; ANDERSON, S. & YATES, T.L. 1990. Notes on Bolivian Mammals 6. The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the Highlands. **American Museum Novitates** **2980**:1-27.
- CORRÊA, I.C.S. 1996. Les variations du niveau de la mer durant les derniers 17.500 ans BP: l'exemple de la plate-forme continentale du Rio Grande do Sul - Brésil. **Marine Geology**,**130**:163-178.
- CORTI, M.; CIABATTI, C.M. & CAPANNA, E. 1990. Parapatric hybridization in the chromosomal speciation of the house mouse. **Biological Journal of the Linnean Society**,**41**:203-214.
- DIAS, B.F. de S. 2001. Demandas governamentais para o monitoramento da Diversidade Biológica Brasileira. In GARAY, I & DIAS, B. 2001. **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais**. Petrópolis: Vozes.430p.
- EISSENBERG, J.C. & HILLIKER, A. 2000. Versatility of conviction: heterochromatin as both a repressor and an activator of transcription. **Genetica**,**109**:19-24.
- FAGUNDES, V.; SCALZI-MARTIN, J.M.; SIMS, K.; HOZIER, J. & YONENAGA – YASSUDA, Y. 1997. Zoo-FISH of a microdissection DNA library and G – banding patterns reveal the homeology between the Brazilian rodents *Akodon cursor* and *Akodon montensis*. **Cytogenetics and Cell Genetics**,**78**:224-228.
- FERNANDEZ, M.E.; VASSALLO A.I. & ZARATE M. 2000. Functional morphology and palaeobiology of the pliocene rodent *Actenomys* (Caviomorpha: Octodontidae): the evolution to a subterranean mode of life. **Biological Journal of The Linnean Society**, **71**: (1): 71-90.

- FORD, C.E. & HAMERTON, J.L. 1956. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. **Stain Technology**,**31**:247-251.
- FORD, C.E. & EVANS, E.P. 1969. Meiotic preparation from mammalian testis. **Comparative Mammalian Cytogenetics**,461-464.
- FREDGA, K. 1977. Chromosomal changes in vertebrate evolution. **Proceedings Royal Society of London**,**199**:377-397
- FREITAS, T.R.O. & LESSA, E.P. 1984. Cytogenetics and morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Octodontidae). **Journal of Mammalogy**,**65**:637-642.
- FREITAS, T.R.O. 1990. Estudos citogenéticos e craniométricos de três espécies do gênero *Ctenomys*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 235p.
- FREITAS, T.R.O. 1994. Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia - Octodontidae) and cytogenetic relationships with other species of the genus. **Cytogenetics and Cell Genetics**,**67**:193-198.
- FREITAS, T.R.O. 1995. Geographic distribution and conservation of four species of the Genus *Ctenomys* in Southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**,**30**(1):53-59.
- FREITAS, T.R.O. 1997. Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia – Octodontidae). **Revista Brasileira de Genética**,**20**(1):1-7.
- FREITAS, T.R.O. 2001. Tuco-tucos (Rodentia, Octodontidae) in southern Brazil: *Ctenomys lami* Spec. Nov. separated from *C. minutus* Nehring 1887. **Studies on Neotropical Fauna and Environmental**. 36(1):1-8.
- FREYANG, C.C.; MARINHO, J.R. e FREITAS, T.R.O. 2000. Novo cariótipo e ampliação da distribuição geográfica de *Ctenomys minutus* (Rodentia – Octodontidae) no sul do Brasil. In: **46º Congresso Brasileiro de Genética**. Águas de Lindóia –SP. Anais.
- FRIEBE, B.; KYNAST, R.G.; ZHANG, P.; QI, L.; DHAR,M. & GILL, B.S. 2001. Chromosome healing by addition of telomeric repeats in wheat occurs during the first mitotic divisions of the sporophyte and is a gradual process. **Chromosome Research**,**9**:137-146.
- GALLARDO, M.H. 1991. Karyotypic evolution in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae). **Journal of Mammalogy**,**72**(1):11-21.

- GARAGNA, S.; BROCCOLI, D.; REDI, C.A.; SEARLE, J.B.; COOKE, H.J. & CAPANNA, E. 1995. Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequence but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. **Chromosoma**,**103**(685-692).
- GARCÍA, L.; PONSÀ, M.; EGOZCUE, J. & GARCIA, M. 2000a. Comparative chromosomal analysis and phylogeny in four *Ctenomys* species (Rodentia, Octodontidae). **Biological Journal of the Linnean Society**,**69**:103-120.
- GARCÍA, L.; PONSÀ, M.; EGOZCUE, J. & GARCIA, M. 2000b. Cytogenetic variation in *Ctenomys perrensis* (Rodentia, Octodontidae). **Biological Journal of the Linnean Society**,**71**:615-624.
- GARDNER, A.L. & PATTON, J.L. 1976. Karyotypic variation in Oryzomyine rodents (Cricetinae) with comments on chromosomal evolution in the neotropical cricetine complex. **Occasional Papers of the Museum Zoology**,**49**:1-47.
- GASTAL, M.L. de. 1994. Sistemas de túneis e área de vida de *Ctenomys minutus* NEHRING,1887. (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). **Iheringia-Série Zoológica**,**(77)**:35-44.
- GAVA, A. 1996. Uma zona de hibridação em *C. minutus* (Rodentia: Octodontidae): abordagem citogenética. **Dissertação de Mestrado**. UFRGS. Porto Alegre. 93p
- GAVA, A & FREITAS, T.R.O. *in press*. Characterization of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* (Rodentia; Ctenomyidae). **Journal of Mammalogy**
- GROOP, A.; WINKING, H. & REDI, C. 1982. **Consequences of Robertsonian heterozygosity segregational impairment of fertility versus male-limited sterility**. Serono Clinical Coll. on Reprod. 3 Genetic Control of Gamete production and Function (eds.: P.G. Crosignani *et al.*) pp.115-134. Academic Press (Grune & Stratton,1982).
- HARRISON, R.G. 1993. Hybrids and Hybrid Zones: Historical Perspective. In: HARRISON, R.G. 1993. **Hybrid Zones and the Evolutionary Process**. Oxford University Press: Oxford. 3-12.
- HEANEY, L.R. & TIMM, R.M. 1985. Morphology, genetics and ecology of pocket gophers (Genus *Geomys*) in a narrow hybrid zone. **Biological Journal of Linnean Society**,**23**:301-317.

- HEDRICK, P.W. 2001. Conservation genetics: where are we now?. **Trends in Ecology and Evolution**,16(11):629-636.
- HERSHKOVITZ, P. 1972. Neotropical recent mammals. In: KEAST, A. ERK, F.C. & GLASS, B. 1972. **Evolution, mammals and southern continents**. State University of New York Press. New York. 543p.
- HEWITT, G.M. 1988. Hybrid zones – natural laboratories for evolutionary studies. **Tree**,3:158-167.
- HOWELL,W.M. 1977. Visualization of ribosomes gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**,62:361-367.
- HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer – a 1 step method. **Experientia**,36:1014-1015.
- HUCHON, D & DOUZERY, E.J.P. 2001. From the Old World to the New World: A Molecular Chronicle of the Phylogeny and Biogeography of Hystricognath Rodents. **Molecular Phylogenetics and Evolution**,20(2):238-251.
- JIGGINS, C.D.; McMILLAN, W.O.; NEUKIRCHEN, W. & MALLETT, J. 1996. What can hybrid zones tell us about speciation? The case of *Heliconius erato* and *H. himera* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Biological Journal of Linnean Society**,59:221-242.
- JUSTO, E.R. & CONTRERAS, J.R. 1999. Chromosomes and zoogeography of fossorial rodents of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha) from the South American lowlands east of the Andes. **Folia Zoologica**, 48: 23-28, Suppl. 1.
- KIBLINSKI, P.; BRUM-ZORRILLA, N.; PEREZ, G. & SAEZ, F.A. 1977. Variabilidad cromosomica entre diversas poblaciones uruguayas del roedor cavador del género *Ctenomys* (Rodentia - Octodontidae). **Mendeliana**,2(2):85-93.
- KING, M. 1982. A case for simultaneous multiple chromosome rearrangements. **Genetica**,59:53-60.
- KING, M. 1993. **Species evolution: The role of chromosome change**. Cambridge University Press: Cambridge.

- KING, M. 1991. The evolution of the amphibian genome . In: GREEN, M.D. & SESSIONS, S.K. (eds.). 1991. **Amphibian cytogenetics and Evolution**. Academic Press: San Diego. 359-391.
- KÖHLER, N.; GALLARDO, M.H.; CONTRERAS, L.C. & TORRES-MURA, J.C. 2000. Allozymic and systematic relationships of the Octodontidae and allied taxa (Mammalia, Rodentia). **Journal of Zoology**, **252**:243-250.
- KOOP, B.F.; BAKER, R.J.; HAIDUK, M.W. & ENGSTROM, M.D. 1984. Cladistical analysis of primitive G-band sequences for the karyotypes of the ancestor of the Cricetidae complex of rodents. **Genetica**, **64**:199-208.
- LACEY, E.A.; PATTON, J.L. & CAMERON, G.N. 2000. **Life undergroundof: The biology of subterranean rodents**. Chicago: University of Chicago Press. 449p.
- LANDE, R. 1979. Effective deme sizes during long-term evolution estimated from rates of chromosomal rearrangement. **Evolution**, **33**(1):243-251.
- LANDE, R. 1985. The fixation of chromosomal rearrangement in a subdivided population with local extinction and colonization. **Heredity**, **54**:323-332.
- LANGGUTH, A & ABELLA, A. 1970. Sobre una poblacion de tuco-tucos melanicos (Rodentia - Octodontidae). **Acta Zoologica Lillioana**, **27**:101-108.
- LARA, M.C.; PATTON, J.P. & SILVA, M.N.F. 1996. The simultaneous diversification of South American Echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **5**(2):403-413.
- LAURENCE, F.W. 1990. Edge effects in tropical forest fragments: application of a model for design of nature reserves. **Biological Conservation**, **71**:641-653.
- LESSA, E.P. & COOK, J.A. 1998. The molecular Phylogenetics of Tuco-Tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **9**(1):88-99.
- MACGREGOR, H.C. **An introduction to animal cytogenetics**. Chapman & Hall: Oxford. 238p.
- MADDISON, W.P.; DONOGHUE, M.J. & MADDISON, D.R. 1984. Outgroup analysis and parsimony. **Sistematics Zoology**, **33**(1):83-103.
- MALIZIA AI, BUSCH, C. 1997. Breeding biology of the fossorial rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). **Journal of Zoology**, **242**: 463-471.

- MANDRIOLI, M.; BIZZARRO, D.; MANICARDI, G.C.; GIONGHI, D.; BASSOLI, L. & BIANCHI, U. 1999. Cytogenetic and molecular characterization of a highly repeated DNA sequence in the peach potato *Myzus persicae*. **Chromosoma**, **108**(7):426-435.
- MARINHO, J.R. 1997. Estrutura populacional e variação craniométrica intraespecífica em uma zona de hibridação de *C. minutus* Nehring, 1887. **Dissertação de Mestrado**. UFRGS. Porto Alegre. 98p.
- MARINHO, J.R. & FREITAS, T.R.O. 2000. Intraespecific craniometric variation in chromosomal hybrid zone of *Ctenomys minutus* (Rodentia – Hystricognathi) **Zeitschrift Fur Säugetierkunde-International Journal of Mammalian Biology**, **65**:226-231.
- MASCHERETTI, S. MIROL, P.M, GIMÉNEZ, M. D. BIDAU, C J. CONTRERAS, J.R. & SEARLE, J.B. 2000. Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys* (Ctenomyidae, Octodontoidea), based on mitochondrial cytochrome *b* sequences. **Biological Journal of Linnean Society**, **70**:361-376.
- MASSARINI, A.; BARROS, M.A.; ORTELLS, M.O. & REIG, O.A. 1991. Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina (Rodentia: Octodontidae). **Genetica** **83**:131-144.
- METCALFE, C.J.; ELDRIDGE, M.D.B.; TODER, R. & JOHNSTON, P.G. 1998. Mapping the distribution of the telomeric sequence  $(T_2AG_3)_n$  in the Macropoidoidea (Marsupialia), by fluorescence *in situ* hybridization. I. The swamp wallaby, *Wallabia bicolor*. **Chromosome Research**, **6**:603-610.
- MEYNE, J.; BAKER, R.J.; HOBART, H.H.; HSU, T.C.; RYDER, O.A.; WARD, O.G.; WILEY, J.E.; WUSTER-HILL, D.H.; YATES, T.L. & MOYSIS, R.K. 1990. Distribution of non-telomeric sequences in vertebrates chromosomes. **Chromosoma**, **99**:3-10.
- MIRANDA, J. A.; ZANCHIN, N.I.T.; OLIVEIRA, L.F.B.; LANGUGTH, A.R. & MATTEVI, M.S. *in press*.  $(T_2AG_3)_n$  telomeric sequence hybridization indicating centric fusion rearrangements in the karyotype of the rodent *Oryzomys subflavus*. **Genetica**.

- MIYAKI, C.Y.; RUSSO, C.A.M. & PEREIRA, S.L. 2001. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S.R. (ed.). 2001. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos editora. 202p.
- MODI, W.S. 1987. Phylogenetic analyses of chromosomal banding patterns among the nearctic arvicolidae (Mammalia: Rodentia). **Systematics Zoology**, **36**(2):109-136.
- MOREIRA, D.M.; FRANCO, M.H.; FREITAS, T.R.O. & WEIMER, T.A. 1991. Biochemical polymorphisms and phenetic relationships in rodents of the genus *Ctenomys* from southern Brazil. **Biochemical Genetics**, **29**:601-615.
- NACHMAN, M.W. 1992. Meiotic studies of Robertsonian polymorphisms in the South American marsh rat, *Holichilus brasiliensis*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, **61**:17-24.
- NASH, W.G. & O'BRIEN, S. 1982. Conserved regions of homologous G-banded chromosomes between orders in mammalian evolution: Carnivores and primates. **Proceedings National Academic of Sciences. USA**, **79**: 6631-35.
- NEVO, E. 1979. Adaptative convergence and divergence of subterranean mammals. **Annual Review in Ecology and Systematics**, **10**:269-308.
- NEVO, E.; FILIPPUCCI, M.C.; REDI, C.; SIMSON, S.; HETH, G. & BEILES, A. 1995. Karyotype and genetic evolution of subterranean mole rats of the genus *Spalax* in Turkey. **Biological Journal of Linnean Society**, **54**:203-229.
- NOWAK, R.M. 1999. **Walkers Mammals of the World**. 6<sup>a</sup> ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press. 1936p. p. 1678-1681.
- ORTELLS, M.O. 1995. Phylogenetic analysis of G-banded karyotypes among the South American subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae), with special reference to chromosomal evolution and speciation. **Biological Journal of the Linnean Society**, **54**:43-70.
- ORTELLS, M.O.; CONTRERAS, J.R. & REIG, O.A. 1990. New *Ctenomys* karyotypes (Rodentia, Octodontidae) from North-eastern Argentina and from Paraguay confirm the extreme chromosomal multiformity of the genus. **Genetica**, **82**:189-201.
- PATHAK, S. & HSU, T.C. 1979. Silver-stained structures in mammalian meiotic prophase. **Chromosoma**, **70**:195-203.

- PATTERSON, B. & PASCUAL, R. 1972. South american fossil mammals. In: KEAST, A. ERK, F.C. & GLASS, B. 1972. **Evolution, mammals and southern continents**. State University of New York Press. New York. 543p.
- PATTON, J.L. 1969. Chromosome evolution in the pocket mouse *Perognathus goldmani* OSGOOD. **Evolution**,**23**: 645-662.
- PATTON, J.L. 1973. An analysis of natural hybridization between the pocket gopher *Thomomys bottae* and *Thomomys umbrinus* in Arizona. **Journal of Mammalogy**,**54**(3):561-558.
- PATTON, J.L.; HAFNER, J.C.; HAFNER, M.S. & SMITH, M.F. 1979. Hybrid zones in *Thomomys bottae* pocket gophers: genetic, phenetic and ecology concordance patterns. **Evolution**,**33**:860-876.
- PATTON, J.L. & SHERWOOD, S.W. 1983. Chromosome evolution and speciation in rodents. **Annual Review in Ecology and Systematics**,**14**:139-158.
- PATTON, J.L. 1993. Hybridization and hybrid zones in Pocket gophers (Rodentia, Geomyidae). In: HARRISON, R.G. 1993. **Hybrid Zones and the Evolutionary Process**. Oxford University Press: Oxford. 364p.
- PEARSON, O. BINSZTEIN, N. BOYRI, L.; BUSCH, C. DIPACE, M.; GALLOPIN, G. PENCHSZADEH, P. & PIANTANIDA, M. 1968. Estructura, social distribucion espacial y comparacion por edades de una poblacion de tuco-tucos (*Ctenomys talarum*). **Investigaciones Zoológicas Chilenas**,**13**:47-80.
- PEMBLETON, E.F. & BAKER, R.J. 1978. Studies of a contact zone between chromosomally characterized populations of *Geomys bursarius*. **Journal of Mammalogy**,**59**:233-242.
- PEPPERS, J.A.; WIGGINS, L.E. & BAKER, R.J. 1997. Nature of B chromosomes in the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Chromosome Research**,**5**:475-479.
- PIÁLEK, J.; HAUFFE, H.C.; RODRÍGUEZ-CLARK, K.M. SEARLE, J.B. 2001. Racialization and speciation in house mice from the Alps: the role of chromosomes. **Molecular Ecology**,**10**:613-625.
- QUMSIYEH, M.B. & BAKER, R.J. 1988. Comparative cytogenetics and the determination of primitive karyotypes. **Cytogenetics and Cell Genetics**,**47**:100-103.

- REED, K.M.; GREENBAUM, I.F. & SITES, J.W. 1995. Dynamics of a novel chromosomal polymorphism within a hybrid zone between two chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Sauria, Phrynosomatidae). **Evolution**,**49**(1):48-60.
- REIG, O.A.; CONTRERAS, J.R. & PIANTANIDA, M. 1966. Contribucion a la elucidacion de la sistematica de las entidades del genero *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) – I. Relaciones de parentesco entre muestras de ocho poblaciones de tuco-tucos inferidas del estudio estadístico de variables del fenotipo y su correlación con las características del cariotipo. **Contribuciones Científicas – Serie Zoología**,**2**(6):301-352.
- REIG, O.A. 1981. Teoria del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de America del Sur. **Monographiae Nature Museo Municipal de Ciencias Naturales. “Lorenzo Scaglia”**,(1)162 pp.
- REIG, O.A. 1984. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sul-americanos (Cricetidae: Sigmodontinae). **Revista Brasileira de Genética**,**9**:333-365.
- REIG, O.A. 1989. Karyotypic repatterning as one triggering factor in cases of explosive speciation. In: FONTDEVILA, A. 1989. **Evolutionary Biology of transient unstable populations**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Germany.246-289.
- REIG, O.A., BUSCH, C. ORTELLS, M.O. & CONTRERAS, J.R. 1990. An overview of evolution, systematics, population and speciation in *Ctenomys*. In: NEVO,E. ; REIG, O.A. & LISS, A.R. (eds.).1990. **Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels**. New York.71-96.
- REIG, O.A.; MASSARINI, A.I.; ORTELLS, M.O.; BARROS, M.A.; TIRANTI, S.I. & DYZENCHAUZ, F.D. 1992. New karyotypes and C-banding patterns of subterranean rodents of genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. **Mammalia**,**54**(4):603-623.
- RIESEBERG, L.H. 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends in Ecology and Evolution**,**16**(7): 351-356.
- ROGATCHEVA, M.B., BORODIN,P.M., ODA, S.I. & SEARLE, J.B. 1997. Robertsonian chromosomal variation in the house musk shrew (*Suncus*

- murinus*, Insectivora: Soricidae) and the colonization history of the species. **Genome**, **40**:18-24
- ROGATTO, S.R. & RAINHO, C.A. 2000. Citogenética Molecular. In: ROGATTO, S.R. 2000. **Citogenética sem risco: Biossegurança e Garantia de Qualidade**. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP. 170p.
- ROSSI, M.S.; REDI, C.A.; VIALE, G.; MASSARINI, A.I. & CAPANNA, E. 1995. Chromosomal distribution of the major satellite DNA of South America rodents of the genus *Ctenomys*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, **69**:179-184.
- RUI, A.M. & GASTAL, M.L. de A. 1997. Estrutura de sistemas de túneis e distribuição espacial de *Ctenomys minutus* NEHRING, 1887 (Rodentia, Ctenomyidae) em área de restinga, Torres, RS, Brasil. **Biociências**, **5**(2):33-44.
- SBALQUEIRO, I.J. 1989. Análises cromossômicas e filogenéticas em algumas espécies de roedores da região Sul do Brasil. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 297p.
- SCHONEWALD-COX, C.M. 1983. Preface. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M. & MACBRYDE, L.T. (eds.). 1983. **Genetics and Conservation: A reference for managing wild animal and plant populations**. The Benjamin/ Cumming Publishing Company, Inc. USA.
- SEABRIGHT, M. 1971. A rapid banding technique for human chromosome. **Lancet**. **ii**: 971-972.
- SEARLE, J.B. 1993. Chromosomal hybrid zones in eutherian mammals. In: HARRISON, R.G. 1993. **Hybrid Zones and the Evolutionary Process**. Oxford University Press: Oxford. 3-12.
- SEARLE, J.B. & WÓJCIK, J.M. 1998. Chromosomal evolution; The case of *Sorex araneus* In: WÓJCIK, J.M. & WOLSAN, M. (eds.) 1998. **Evolution of Shrews**. Mammal Research Institute Polish Academy of Sciences: Białowieża.
- SEÑA, C. de la; CHOWDHARY, B.P. & GUSTAVSSON, I. 1995. Localization of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in chromosomes of some domestic animals by fluorescence in situ hybridization. **Hereditas**, **123**:269-274.
- SESSIONS, S.K. 1996. Chromosomes: Molecular Cytogenetics. In: HILLIS, D.M., MORITZ, C. & MABLE, B.K. (eds.). 1996. **Molecular Systematics 2<sup>a</sup> ed.** Sinauer Associates Inc.: Massachusetts. 665p. In: HILLIS, D.M., MORITZ, C. &

- MABLE, B.K. (eds.). 1996. *Molecular Systematics* 2<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates Inc.: Massachusetts. 665p.
- SILVA, C. E. F. da; SANTIAGO, C. de M.; DESCIO, F.; MARINHO, L. 1990. Levantamento preliminar das mamíferos, aves e reptéis do Parque Estadual da Cantareira-SP. In: **6º Congresso Florestal Brasileiro**. Campos do Jordão-RJ. Anais. p. 794 - 798.
- SITES, J.W. & MORITZ, C. 1987. Chromosomal evolution and speciation revisited. **Systematics Zoology**,**36**(2):153-174.
- STANYON, R.; CONSIGLIERE, S.; BIGONI, F. FERGUSON-SMITH, M.; O'BRIEN, P.C.M.; & WIENBERG, J. 2001. Reciprocal chromosome painting between a New world primate, the woolly monkey, and humans. **Chromosome Research**,**9**:97-106.
- SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Experimental Cell Research**, **75**:304-306.
- SUMNER, A.T. 1990. **Chromosome banding**. Unwin Hyman Inc.: London. 434p.
- apud NAGAMACHI, C.Y. 1995. Relações cromossômicas e análise filogenética e de agrupamento na família Callitrichidae (Platyrrhini, Primates). **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 167p.
- SWOFFORD, D.L.; GARY, J.O.; WADDELL, P.J. & HILLIS, D.M. 1996. Phylogenetic Inference. In: HILLIS, D.M., MORITZ, C. & MABLE, B.K. (eds.). 1996. **Molecular Systematics** 2<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates Inc.: Massachusetts. 665p.
- TOLDO Jr., E.E.; AYUP-ZOUAIN, R.N.; CORRÊA, I.C.S. & DILLENBURG, S.R. 1991. Barra Falsa: Hipótese de uma paleocanal holocênico de comunicação entre a laguna dos Patos e Oceano Atlântico. **Pesquisas**,**18**(2):99-103.
- TRAVI, V.H. 1983. Etologia de *C. torquatus* Lischetenstein, 1830 (Rodentia, Ctenomyidae) na Estação Ecológica do Taim, Rio Grande do Sul, Brasil. **Dissertação de Mestrado**. UFRGS. Porto Alegre. 75p.
- TREJO, A. & GRIGERA, D. 1998. Food habits of the Great Horned Owl (*Bubo virginianus*) in a Patagonian steppe in Argentina. **Journal of Raptor Research**,**32**: (4) 306-311.
- URIEN, C.M.; MARTINS, L.R. & MARTINS, I.R. 1980. **Evolução geológica do Quaternário do Litoral Atlântico Uruguaio, Plataforma Continental e**

- Regiões Vizinhas.** Porto Alegre: Centro de Estudos de Geologia Costeira e Oceânica - CECO - UFRGS.43p.
- VANZOLINI, P.E. 1970. **Zoologia Sistemática, geografia e a origem das espécies. Série Teses e Monografias no. 3.** São Paulo: Universidade de São Paulo. 57p.
- VERMA, R.S. 1988. Heterochromatin: early results and future prospects. In: VERMA, R.S. (ed.) 1988. **Heterocromatin, Molecular and structural aspects.** Cambridge University press: Cambridge. 301p.
- VERZI, D.H. 1999. The dental evidence on the differentiation of the ctenomyine rodents (Caviomorpha, Octodontidae, Ctenomyinae). **Acta Theriologica, 44(3):263-282.**
- VERZI, D.H.; MONTALVO, C.I. & VUCETICH, M.G. 1999. Afinidades y significado evolutivo de *Neophanomys biplicatus* (Rodentia, Octodontidae) del Mioceno tardío-Plioceno temprano de Argentina. **Ameghiniana,36(1):83-90.**
- VIEIRA, E.F. & RANGEL, S.S. 1988. **Planície costeira do Rio Grande do Sul: Geografia física, vegetação e dinâmica sócio-demográfica.** Porto Alegre: Sagra. 252p.
- VILWOCK, J.A., TOMAZELLI, L.J., LOSS, E.L. DEHNHARDT, E.A., HORN FILHO, N.O., BACHI, F.A. & DEHNHARDT, B.A. 1986. Geology of the Rio Grande do Sul coastal province. Quaternary of South America and Antarctic Peninsula. In: RABASSA, J. & BALKENMAN, A.A. (eds.). Rotterdam.
- VILWOCK, J.A.1989. A summary of the geology of the coastal province of Rio Grande do Sul. **Proceedings of the international symposium on utilization of coastal ecosystems: planning, pollution and productivity, 2:475-484**
- VUCETICH, M.G.; VERZI, D.H. & HARTENBERGER, J-L. 1999. Review and analysis of the radiation of American Hystricognathi (Mammalia, Rodentia). **C.R. Académie des Sciences - Paris, Sciences de la terre et des planètes/ Earth & Planetary Sciences, 329:763-369.**
- VUCETICH, M.G. & VERZI, D.H. 1999. Changes diversity and distribution of the caviomorph rodents during the late cenozoic in Southern South America. In: RABASSA, J. & SALEMME,M. **Quaternary of South America and Antarctic Peninsula.** A.A. Balkema – Rotterdam.

- WAECHTER, J.L. 1990. Comunidades vegetais das restingas do Rio Grande do Sul. In: **Simpósio de Ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira**, 2. Águas de Lindóia, 1990. Estrutura, função e manejo. São Paulo: ACIESP. 3:228-248. Publicação ACIESP n.71-3).
- WALLACE, B.M.N.; SEARLE, J.B. & EVERETT, C.A. 1992. Male meiosis and gametogenesis in wild house mice (*Mus musculus domesticus*) from a chromosomal hybrid zone; a comparison between "simple" Robertsonian heterozygotes and homozygotes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 61:211-220.
- WAHRMAN, J.; RICHELER, C.; GAMPERL, R. & NEVO, E. 1985. Revisiting Spalax: Mitotic and meiotic chromosome variability. **Israel Journal Zoology**, 33:15-38.
- WEBB, S.D. 1978. A History of savanna vertebrates in the new world. Part II: South America and the Great Interchange. **Annual Review in Ecology and Systematics**, 9:393-426.
- WEIR, B.J. 1974. Reproductive characteristics of hystricomorph rodents. **Symposium of Zoology Society of London**, 34:265-301 *apud* GASTAL, M.L. de. 1994. Sistemas de túneis e área de vida de *Ctenomys minutus* NEHRING, 1887. (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). **Iheringia-Série Zoológica**, (77):35-44.
- WHITE, M.J.D. 1978. **Modes of speciation**. Freeman; São Francisco. 455p.
- WILSON, E.O. 1992. A estratégia de conservação da biodiversidade. In: **A estratégia Global da Biodiversidade**. Fundação Biodiversitas.
- WYSS, A.R., FLYNN, J. NORELL, M.A. SWISHER, C.C., CHARRIER, R., NOVACEK, M.J.E. & MCKENNA, M.C. 1993. South America's earliest rodent and recognition of a new interval of mammalian evolution. **Nature**, 365:435-436.
- WÓJCIK, J.M. 1993. Chromosome races of the common shrew *Sorex araneus* in Poland: a model of karyotype evolution. **Acta Theriologica**, 38(3):315-338.