



DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE *OLIGORYZOMYS FLAVESCENS* E *OLIGORYZOMYS NIGRIPES* (RODENTIA) UTILIZANDO MARCADORES RAPD E CARIOTIPAGEM.

Laura B. Slaviero

Cátia Marcia Golunski; Shana P. Miotto; Gabriela B. Kubiak; Camila A. Zanella; Lindomar. A. Lerin; Valdir Coppini; Jorge. R. Marinho; Altemir. J. Mossi; Rogério L. Cansian

1Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI-Campus de Erechim, Departamento de Ciências Biológicas, Avenida Sete de Setembro, nº 1621, 99700 - 000, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil. Telefone número: 55 54 3520 9000-catialab@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Pequenos mamíferos têm um importante papel em um ecossistema florestal; como presas, predadores e dispersores de sementes (2, 11, 12, 13). Os roedores, com 29 famílias, 426 gêneros e 1814 espécies, apresentam o maior número de gêneros e espécies do que qualquer outra ordem de mamíferos (13).

Os pequenos roedores e insetívoros são grupos de mamíferos que tem despertado o interesse de vários pesquisadores, não apenas em virtude de sua abundância e da ampla classe de adaptações ecológicas, mas também por serem importantes componentes de quase todos os ecossistemas terrestres existentes (10). Sabe-se que existem muitas semelhanças morfológicas entre espécies de pequenos mamíferos, em particular dos roedores, o que dificulta a distinção e correta identificação das espécies pertencentes a estes grupos.

O gênero *Oligoryzomys* apresenta espécies de pequeno porte e com coloração da pelagem que, muitas vezes pode ser um obstáculo para a identificação taxonômica, principalmente entre *O. flavescens* e *O. nigripes*. Apresentam cauda longa e delgada que é maior que o corpo e costumam serem encontrados em vários locais, ou seja, são generalistas com relação a microhabitats (14).

Por este e outros motivos, as características citogenéticas morfológicas e a análise de cariótipos têm sido empregadas como ferramentas para elucidar problemas taxonômicos por meio de cariótipos espécie - específicos (4, 14, 15). A citogenética de vertebrados tem desenvolvido pesquisas de forma contínua e publicado vários trabalhos referentes a citogenética de roedores. Com descrições cariotípicas de espécies novas, caracterização dos padrões de bandamento cromossômico, e entre outros, estudos citogenéticos comparativos de espécies afins para elucidação dos processos de evolução cromossômica (5). Mesmo assim, os pequenos mamíferos, entre eles roedores, estão ainda mal estudados, com poucas exceções. Além disso, existe uma ligação ainda

insipiente entre pesquisadores que estudam sistemática e/ou ecologia e aqueles que estudam a citogenética de mamíferos. Deste modo, mesmo quando há coleta, freqüentemente os espécimes não são cariotipados, o que poderia ser decisivo na correta identificação de vários grupos (18).

A técnica de RAPD baseia-se na amplificação de seqüências de DNA randômicas utilizando iniciadores pequenos de seqüências arbitrárias, que detectam polimorfismos, mesmo na ausência de informações da seqüência específica de nucleotídeos do DNA alvo. Os marcadores de RAPD são extremamente apropriados para realização de mapas genéticos, diferenciação de espécies animais e vegetais e para impressões de DNA, com especial utilidade nos estudos de genética de populações (3). Além disso, escolheu-se o marcador molecular RAPD por ser mais rápido e barato, e também por não requerer conhecimento prévio do genoma das espécies que se deseja estudar, assim como justificado por Lynch e Milligan (9).

OBJETIVOS

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo verificar se a técnica de marcadores moleculares baseada em RAPD consegue diferenciar geneticamente as espécies *O. nigripes* e *O. flavescens*, para garantir sua correta identificação e, futuramente, determinar possíveis padrões morfológicos específicos comparando-se suas características externas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os exemplares integrantes deste estudo são de populações de *Oligoryzomys* sp. e foram coletados em fragmentos florestais localizados na Região Norte do estado do Rio Grande do Sul, pertencentes aos domínios da Mata Atlântica. Oportunamente, também foram realizadas coletas na Floresta

Nacional de Passo Fundo e em fragmentos localizados ao sul de Santa Catarina, próximos ao rio Uruguai (Chapecó - SC). Foram utilizados também pedaços da orelha, coletados previamente e já catalogados, fazendo parte do acervo do Museu Regional do Alto Uruguai (MURAU) da URI Campus de Erechim.

Por se tratar de um trabalho que visa verificar se o marcador molecular RAPD consegue diferenciar as espécies *O. nigripes* e *O. flavescens*, foram utilizados seis indivíduos pertencentes ao Horto Florestal Municipal de Erechim - RS, sendo quatro cariotipados, dois de Chapecó - SC, quatro de Rio dos Índios - RS (por terem se destacado geneticamente em trabalho semelhante anteriormente realizado) e um proveniente da Floresta Nacional de Passo Fundo - RS. Todos estes, com exceção dos quatro cariotipados, já haviam sido analisados pelo trabalho "Diferenciação genética em *Oligoryzomys* sp. (Rodentia) tendo o rio Uruguai como barreira geográfica", realizado anteriormente por Slaviero *et al.*, (17), cujo objetivo era verificar a influencia do Rio Uruguai como barreira geográfica para populações de *Oligoryzomys* nas quais estavam contidos os referidos indivíduos.

Os exemplares foram capturados por meio de armadilhas do tipo live trap, nas dimensões 10x10x22 cm de altura, largura e profundidade, respectivamente, que foram instaladas no solo, ao lado de troncos de árvores e outros ambientes onde possa ocorrer a circulação de pequenos roedores. As armadilhas foram iscadas com uma rodela de milho verde recoberta com pasta de amendoim.

As metáfases dos exemplares coletados foram obtidas a partir de preparações diretas de medula óssea com sacrifício dos animais, seguindo - se o método descrito por Ford; Hamerton (6) e Guerra; Souza (7), otimizado. Aproximadamente uma hora antes do sacrifício, foi injetada subcutaneamente uma solução de colchicina 0,01 %, diluída em água, na proporção de 1 mL por 100 g de peso do animal. Para o sacrifício, os animais foram colocados em um recipiente fechado contendo um algodão embebido em éter. Em seguida, foi feita a retirada dos fêmures com corte das epífises e retirada da medula por meio de lavagens repetidas do canal ósseo utilizando 5 mL de solução hipotônica (KCL 0,075 M) para cada animal (2,5 mL para cada fêmur). A suspensão de células obtidas no tubo de ensaio permaneceu na solução hipotônica por 30 minutos e, após foi centrifugada a 800 rpm durante 5 minutos, sendo que o sobrenadante sempre foi descartado. Então, ressuspendeu - se o material em fixador (metanol - ácido acético na proporção de 3:1) e, 24 horas depois, foi novamente centrifugado eliminando - se o sobrenadante. Este último procedimento foi repetido mais duas vezes. Por fim, o material foi ressuspendido em fixador fresco para a preparação das lâminas, pingando algumas gotas em lâmina limpa e conservada em etanol na geladeira e esta foi passada rapidamente sobre a chama de lamparina para evaporar o fixador. Este material foi corado em uma solução Tampão Fosfato - Geimsa, cuja proporção foi de 3:1, durante 10 minutos e depois, foi lavado com água destilada e deixado secar a temperatura ambiente.

O material genético foi extraído usando - se o protocolo descrito por MARINHO (10), testando - se diferentes alterações a fim de otimizá - lo. Colocou - se até 20 mg de tecido em um microtubo (1,5 mL) e em seguida, adicionou

- se tampão de lise (550 μ L) e proteinase K (11 μ L) e incubou - se overnight a 37^oC ou 2 horas a 60^oC para extrair o DNA. Terminada a incubação, adicionaram - se 350 μ L de NaCl 5M que atua na separação e precipitação do material genético. Neste momento, as amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 13000 rpm durante trinta minutos e, em seguida parte do sobrenadante (450 μ L) foi transferido a um novo ependorff e adicionou - se 900 μ L de etanol absoluto gelado, sendo esta mistura agitada delicadamente e incubada por duas horas a - 20^oC ou overnight a 4^oC. Decorrido esse tempo, foram realizadas duas lavagens com etanol 70% gelado para eliminar as impurezas associadas ao DNA. Por fim, após secar o material, adicionaram - se 100 μ L de 1X TE e incubou - se a 37^oC para depois ressuspender o pellet e conservou - se a 4^oC.

Para amplificação de RAPD foi utilizada a reação descrita por Levi (8), com algumas modificações: Tampão de reação (50 mM Tris - HCl pH 9,0; 50 mM KCl; 0,5% Triton - X 100), dNTPs (200 mM de cada), 0,2 mM de primer, 3 mM de MgCl₂, 40 ng de DNA e 1,5 U de Taq DNA polimerase. O processo de amplificação seguiu o seguinte procedimento: 3 min a 92^oC, 40 ciclos de 1 min a 92^oC, 1 min a 36^oC e 2 min a 72^oC. Após, 3 min a 72^oC e resfriamento a 4^oC até a retirada das amostras. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,4% em tampão TBE (trisma 0,089M, ácido bórico 0,089M e EDTA 0,008M) em cuba de eletroforese horizontal. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA de fago Lambda clivado com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI. Os fragmentos foram visualizados com brometo de etídio sob luz ultravioleta e os géis fotografados digitalmente.

Para otimizar os trabalhos de amplificação por RAPD foi realizada uma seleção de primers pertencentes a sete kits da Operon Technologies, sendo estes analisados em duplicata e observando intensidade e reprodutibilidade de bandas.

Foi verificado que os primers OPA 19, OPB 8, OPF 3, OPF 11, OPF 12, OPF 14, OPW 1, OPW 9, OPW 17, OPW 19, OPY 6, OPY 16, OPY 19 e OPY 20 estão entre os que melhor amplificaram as amostras analisadas, sendo estes os utilizados para as reações de amplificação das populações. Os cariótipos foram determinados com base nos trabalhos de Andrades - Miranda *et al.*, (1), Paresque *et al.*, (14), Pereira; Geise (15) e Sbalqueiro (16).

Para avaliar - se a variabilidade genética, os dados obtidos através da determinação da presença ou ausência de 205 bandas formaram uma matriz que foi analisada com auxílio do programa computacional MVSP 3.1. Os dendrogramas de similaridade foram construídos pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), utilizando - se o coeficiente de Jaccard para cálculo de similaridade e o coeficiente de Nei & Li para o cálculo da distância genética. Os resultados genéticos foram avaliados considerando diferenças genéticas entre os indivíduos analisados, comparando - se principalmente os representante já cariotipados com os demais, a fim de responder aos objetivos deste trabalho.

RESULTADOS

Levando em consideração os 13 indivíduos estudados foi

identificado um total de 205 loci, sendo que destes, 180 (87,8%) mostraram - se polimórficos, sendo que o número de loci utilizados para análise foi bastante superior aos utilizados por Trott *et al.*, (2007) em espécies do gênero *Oligoryzomys* que utilizaram 75 loci polimórficos.

O coeficiente de similaridade de Jaccard variou de 0,36 a 0,74 para os exemplares analisadas. A análise de agrupamentos UPGMA e a Análise de Componentes Principais (PCA) permitiram separar dois grupos distintos. O primeiro grupo corresponde aos dois exemplares identificados cariotipicamente como *Oligoryzomys flavescens*, e o segundo grupo representado pelos demais indivíduos, incluindo os definidos como *O. nigripes* pela determinação cariotípica, não havendo agrupamento claro entre os componentes deste grupo com relação a área de coleta. Este resultado indica a capacidade dos marcadores RAPD em separar estas duas espécies, resultado também obtido por Trott *et al.*, (19), permitindo também identificar os indivíduos analisados por Slaviero (17). Além disso, houve uma nítida separação de um indivíduo não cariotipado que aparece de forma semelhante em trabalho realizado por Slaviero (17), que estudou a influência do Rio Uruguai como barreira de fluxo gênico entre populações de *Oligoryzomys* sp. Estes autores relatam que o referido indivíduo, coletado no Horto Florestal Municipal de Erechim - RS, pode tratar - se de uma espécie distinta, incluída equivocadamente na amostragem, em função de sua distância genética com os demais.

Trott *et al.*, (19), ao analisar com marcadores RAPD o gênero *Oligoryzomys* distribuído nos diferentes biomas do Brasil, utilizaram um total de 75 produtos polimórficos amplificados simultaneamente em 151 exemplares, e observaram que há uma grande variação genética entre os taxa de *Oligoryzomys* investigados. Porém, neste mesmo trabalho, observou - se que entre as espécies do gênero analisado, *O. nigripes* e *O. flavescens*, foram as que apresentaram a menor distância genética entre si, deixando pouco compreensível se a análise da distância genética de Nei's realmente separou estas duas espécies.

Trott (20) analisado um total de 193 exemplares pertencentes a seis espécies do gênero *Oligoryzomys* verificou que, de um modo geral, o emprego do marcador RAPD neste gênero foi satisfatório pois mostrou, conforme o esperado, que as espécies e as populações de *O. nigripes* e *O. flavescens* apresentam maior similaridade genética dentro das mesmas do que entre elas.

Embora a priori não haja uma hipótese de como se arranjam as espécies do gênero, os taxa investigados agruparam - se, aparentemente, por seus cariótipos e de certa forma, pelas áreas geográficas que ocupam. Mas, neste caso, apenas quando estas relações foram analisadas pelas distâncias euclidianas. Cabe ressaltar que agrupamentos por áreas de coleta não ficaram claros no presente trabalho em função do número de exemplares analisados, mas, da mesma forma, houve um separação entre os indivíduos que eram comprovadamente *O. flavescens* e *O. nigripes*, o que vem a concordar que os marcadores moleculares baseados em RAPD são capazes de separar geneticamente estas duas espécies.

CONCLUSÃO

Ao analisar - se geneticamente as espécies *O. flavescens* e *O. nigripes*, ficou comprovado que as técnicas de marcadores moleculares com base em RAPD conseguem diferenciar estas espécies e que, a maioria dos exemplares analisados e não cariotipados apresentaram uma forte tendência a serem *O. nigripes*, com exceção de um indivíduo que não foi similar a nenhuma das espécies avaliadas. Não foi observado agrupamento claro relacionado a região de coleta, talvez em função do número de exemplares analisados.

REFERÊNCIAS

- 1 - Andrades - Miranda, J.; Zanchin, N. I. T.; Oliveira, L. F. B.; Langguth, A. R.; Mattevi, M. S. Cytogenetic studies in nine taxa of the genus *Oryzomys* (Rodentia, Sigmodontinae) from Brazil. *Mammalia*, 65: 461 - 472, 2001.
- 2 - Bayne, E. M.; Hobson, K. A.; Fargey, P. Predation artificial nests in relation to forest type: contrasting the use of quail and plasticine eggs. *Ecography*, 20: 233 - 239, 1997.
- 3 - Borges, É. C.; Romanha, A. J.; Diotaiuti, L. Uso do Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) no estudo populacional do *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 16(2): 97 - 100, 2000.
- 4 - Bonvicino, C.; Geise, L. Taxonomic status of *Delomys dorsalis collinus* Thomas, 1917 (Rodentia, Cricetidae) and description of a new karyotype. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 60: 124 - 127, 1995.
- 5 - Fagundes, V.; Christoff, A. U.; Scalzi - Martin, J.; Hozier, J.; Moreira - Filho, C. A.; Yonenaga - Yassuda, Y. X;Y translocation revealed by chromosome microdissection and FISH in fertile XY females in the Brazilian rodent *Akodon montensis*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 88(1 - 2): 124 - 129, 2000.
- 6 - Ford, C. E.; Hamerton, J. L. A colchicines hypotonic citrate aquash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technology*, 3: 247 - 251, 1956.
- 7 - Guerra, M.; Souza, M. J. de. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC - Editora, 2002.
- 8 - Levi, A., L.J. Rowland; J.S. Hartung. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of wood plants. *HortScience*, 28: 1188 - 1190, 1993.
- 9 - Lynch, M.; Milligan, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3: 91 - 99, 1994.
- 10 - Marinho, J.R. Estudo da comunidade e do fluxo gênico de roedores silvestres em um gradiente altitudinal de mata atlântica na área de influência da RST 453/RS - 486 Rota - do - Sol. 2003. 119f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2003.
- 11 - Martell, A. M. Demography of southern red - backed voles (*Clethrionomys gapperi*) and deer mice (*Peromyscus maniculatus*) after logging in north - central Ontario. *Canadian Journal of Zoology*, 6: 958 - 969, 1983.

- 12 - Maxson, S. J.; Oring, L. W. Mice as a source of egg loss among ground - nesting birds. *The Auk*, 95: 582 - 584, 1978.
- 13 - Nowak, R. M. *Walker's mammals of the world*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1991. 1629 p.
- 14-Paresque, R.; Souza, W. P. de; Mendes, S. L.; Fagundes, V. Composição cariotípica da fauna de roedores e marsupiais de duas áreas de Mata Atlântica do Espírito Santo, Brasil. Vitória, 2004.
- 15 - Pereira, L. G.; Geise, L. Karyotype composition of some rodents and marsupials from Chapada Diamantina (Bahia, Brazil). *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, 67(3), 2007.
- 16 - Sbalqueiro, I. J. Análises cromossômicas e filogenéticas em algumas espécies de roedores da região Sul do Brasil. 1989. 297 f. Tese (Doutorado em Genética)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 1989.
- 17 - Slaviero, L. B. Diferenciação genética em *Oligoryzomys* sp. (Rodentia) tendo o rio Uruguai como barreira geográfica. Monografia (Iniciação Científica - PIBIC/CNPq), Curso de Ciências Biológicas, URI - Campus de Erechim, Erechim - RS, 2009.
- 18 - Vivo, M. de. Diversidade de mamíferos do Estado de São Paulo. In: CORRÊA; CASTRO, R.M.(Orgs.). Biodiversidade do Estado de São Paulo, São Paulo: FAPESP, 6: 53 - 66, 1998.
- 19 - Trott, A. Callegari - Jacques, S. M.; Oliveira, L. F. B.C.; Langguth, A.; Mattevi, M.S. Genetic diversity and relatedness within and between species of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia; Sigmodontinae). *Brazilian Journal of Biology*, 67(1): 153 - 160, 2007.
- 20 - Trott, A. Relações entre populações e espécies de roedores do gênero *Oligoryzomys* analisados por RAPD. 2000, 100f. Mestrado (Genética E Biologia Molecular) - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 1v, 2000.