

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Polimorfismos e Herança das Regiões Organizadoras
de Nucléolos: analisando parentais e descendentes em
Akodon cursor (Rodentia)**

Débora De'nadai Dalvi

Vitória, ES
Junho, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Polimorfismos e Herança das Regiões Organizadoras
de Nucléolos: analisando parentais e descendentes em
Akodon cursor (Rodentia)**

Débora De'nadai Dalvi

Orientador(a): Valéria Fagundes

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade
Federal do Espírito Santo como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.**

Vitória, ES

Junho, 2017

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Valéria Fagundes que gentilmente me acolheu no Laboratório de Genética Animal, agradeço por todos os ensinamentos transmitidos ao longo desses cinco anos de convivência, com eles cresci como pessoa e pesquisadora. Obrigada por toda a paciência e dedicação. Você me mostrou que nem sempre os caminhos da ciência são fáceis, mas que é isso que os torna tão recompensantes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), pela bolsa de incentivo à pesquisa de mestrado, ao financiamento do projeto e ao suporte.

Aos professores da graduação e do PPGBAN que se dedicaram durante toda minha formação como ser-humano, cidadã e bióloga, em especial Albert, Marcelo, Yuri e Maria do Carmo aos quais guardo com carinho várias recordações.

À Prof^a Dr^a Roberta Paresque agradeço imensamente à disponibilidade, dedicação e carinho sempre a mim dispensados, abrindo a porta das análises estatísticas, inicialmente tão amedrontadoras e às discussões de grande valor que me fizeram reavaliar diversas vezes meus dados.

À Prof^a Dr^a Eliana Zondanade e seu corpo discente do Laboratório Estatística (LESTAT – UFES) pelo auxílio estatístico no momento de sufoco.

À Dr^a Cristina Dornelas de Andrade Nogueira Massariol, que sendo companheira de laboratório, chefe, amiga e mentora deste trabalho, sempre esteve ao meu lado, me ensinando, incentivando e ajudando. Espero tê-la orgulhado com o resultado do trabalho que você iniciou.

Ao Prof Dr. Fausto Foresti, da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus Botucatu, por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes para realização dos experimentos de Híbridação *in situ* Fluorescente.

À MSc Maria Lígia Marques de Oliveira pelo acolhimento, disponibilidade, disposição e carinho que teve em me ensinar e realizar comigo os experimentos de FISH que com sucesso renderam muitos resultados a este trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética Animal (LGA-UFES) com quem convivi ao longo da realização desse trabalho e durante toda minha vida acadêmica até então: Ana Heloísa de Carvalho, Ana Júlia do Santos Artem, Arturo Benincá Martinelli, Daniele Angeli, Eduardo Loyola Muhl, Fernanda Couto Zaidan, Leonardo Campana, Lorena Dinelli, Lucas Vianna, Mariana Xavier Machado, Marina Monjardim, Rosana Nunes, Thaís Volpi, Victor Hugo Colombi e Vivian Mainardi, pela troca de experiências, crescimento, trabalho, convívio e carinho durante toda essa caminhada. Em especial, à Fernanda por compartilhar comigo todo o processo, pelas

várias manhãs e tardes debruçadas sob a bancada, pelas discussões enriquecedoras, pelas muitas risadas e por sua amizade. À Aninha, pelas discussões sobre meus dados, pelos vários e vários testes experimentais, por sua amizade e carinho de todo dia. E ao Victor por me ensinar a citogenética, por desde a graduação pensar comigo todas as etapas, e principalmente por sua amizade.

Aos amigos que fiz durante todo esse período, ou aqueles que comigo caminha, a muito tempo, nossos momentos, descontrações, risadas e conversas foram estímulos para chegar até aqui.

Ao meu amigo Gabriel Bautz Dalbem, que segue comigo desde o início dessa jornada, agradeço pela significância que teve na realização desse projeto e que é em minha vida, pela amizade e por todos os momentos que guardo na lembrança com carinho. Chegar até aqui contigo é muito gratificante.

Ao meu companheiro de estrada, Iago, agradeço pela curva de seu ombro, na qual sempre encontro conforto, por ser meu apoio, meu incentivador e principalmente meu parceiro. Sem você este projeto não seria o mesmo.

E aos meus pais, àqueles a quem dedico esse trabalho, agradeço pela minha essência, pelos valores que carrego, pelo amor e carinho com que me criaram e que me fizeram chegar até aqui. Vocês são minha motivação de buscar ser melhor a cada dia, vocês que sempre me incentivaram, que me apoiaram incondicionalmente, e sempre estiveram ao meu lado a cada passo, esse trabalho é conquista nossa. Obrigada.

“ Assim como as casas são feitas de pedras, a ciência é feita de fatos. Mas uma pilha de pedras não é uma casa e uma coleção de fatos não é, necessariamente, ciência. ”

Jules Henri Poincare

“O vento é o mesmo; mas sua resposta é diferente em cada folha. ”

Cecília Meireles

SUMÁRIO

RESUMO	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
INTRODUÇÃO	10
MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	18
DISCUSSÃO	31
CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	50

RESUMO

No presente trabalho avaliamos o grau de polimorfismo das regiões organizadoras de nucléolos marcadas pela prata (Ag-RONs) em 65 indivíduos de Akodon cursor, provenientes de quatro populações brasileiras (São Paulo, Espírito Santo, Bahia e Pernambuco). Análises de hibridação in situ com sonda ribossomal confirmaram presença do gene em quatro sítios cromossômicos na espécie: 1pT, 1+3i, 4qT e 5qT. Por outro lado, dois sítios mencionados na literatura como portadores de Ag-RONs (6pT e XpT), embora marcados pela prata, não apresentam genes ribossomais, mostrando que a marcação de prata nesses sítios não é devido à atividade do gene ribossomal, mas à presença de heterocromatina constitutiva, pondo em xeque a viabilidade da técnica em identificar regiões de RON. Também foi observado que ausência de marcação pela prata em sítios confirmados de RON podem indicar inatividade gênica, devido à confirmação da presença do gene pela FISH, ou ainda, ausência do gene ribossomal nos sítios 1pT e 1+3i. Foi verificado: não conservadorismo intertecidual, onde o padrão de frequência de marcação de Ag-RON nos sítios portadores entre os tecidos baço e medula de mesmo indivíduo foram significativamente diferentes; conservadorismo sexual, não sendo encontrada variação significativa entre as frequências de atividade ribossomal por sítio entre machos e fêmeas de mesmas populações; que não há relação entre atividade ribossomal e o par cromossômico ou ainda com sua morfologia, uma vez que testes de correlação não mostraram-se significativos. Entretanto foi observada grande variação interindividuais numa mesma população, o que não impossibilitou a existência de padrões de frequência de atividade ribossomal diferenciáveis entre as populações da Bahia, Espírito Santo e São Paulo, mostrando-se um bom marcador populacional. A análise de indivíduos gerados de cruzamentos experimentais intrapopulacionais indica manutenção do padrão de atividade da população parental na prole, e em cruzamentos interpopulacionais, foi observada dominância do padrão de atividade ribossomal de uma população parental sobre outra, independente do sexo deste parental, mostrando que apesar do padrão de frequência de atividade ribossomal ser um caráter herdável, sua herança não segue um padrão mendeliano.

Palavras chaves: Ag-RON, FISH, polimorfismo de presença gênica, marcador populacional, herança.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostra de indivíduos coletados na natureza. Número de indivíduos de <i>Akodon cursor</i> por localidade (n), e população (nt) analisados.....	15
Tabela 2: Amostra de indivíduos nascidos em cativeiro, considerando a localidade de origem dos parentais (Bahia, BA e Espírito Santo, ES) e sexo, em cruzamentos intrapopulacionais (INTRA) e interpopulacionais (INTER)	15
Tabela 3 – Frequência de marcação pela prata por sítio de indivíduos submetidos ao mapeamento físico dos genes ribossomais pela FISH com sonda 18S.....	23
Tabela 4 – Marcações dos sítios portadores de RONS pela prata e pela hibridação <i>in situ</i> com sonda 18S dos indivíduos analisados. + = presença; - = ausência.....	23
Tabela 5: Estatísticas sumárias das frequências de marcação de Ag-RON por sítio entre tecidos baço e medula.....	24
Tabela 6: Estatísticas sumárias dos dados de frequência de marcação de Ag-RON por sítio cromossômico pela variável localidade, diferenças significativas são identificadas em negrito..	26
Tabela 7: Teste Dunn-Bonferroni e T pareado entre populações nos sítios 4qT, e 5qT, diferenças significativas são identificadas em negrito.....	26
Tabela 8: Estatísticas sumárias dos dados de frequência de marcação de Ag-RON por sítio cromossômico pelas variáveis cativeiro e natureza das populações da Bahia e Espírito Santo.....	27
Tabela 9: Estatísticas sumárias dos dados de frequência de marcação de Ag-RON por sítio cromossômico pelas variáveis populacionais, Bahia, Espírito Santo, híbridos interpopulacionais F1, F2 e F3.....	27
Tabela 10: Teste <i>post hoc</i> pareado entre grupos populacionais e híbridos interpopulacionais nos sítios 4qT, e 5qT, diferenças significativas são identificadas em negrito.....	29
Tabela 11: Estatísticas descritivas sumárias e testes de hipóteses entre as frequências de marcação de Ag-RON por sítio cromossômico e o sexo.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análise qualitativa da proporção de indivíduos em relação a frequência de marcação pela prata em cada sítio cromossômico por população. Detalhes de frequência por sítio, por indivíduo e por população se encontram no Anexo 5.....19

Figura 2: Regiões organizadoras do nucléolo em exemplares de *Akodon cursor*, identificadas pela coloração pela prata e FISH com sonda ribossomal. a) LGA4981, fêmea com $2n=16$ – Ag-RON, asteriscos indicam marcações nos sítios 1pT (inéditas em homologia), e as demais marcações pela prata em ambos os sítios 6pT (acrocêntrico), um sítio XpT e em ambos os sítios 4qT (par heteromórfico). b, c, d) LGA4338, macho com $2n=15$. b) Marcações de prata em um homólogo dos cromossomos 6 e X. (acrocêntricos) c) Marcação pela prata em um homólogo dos sítios 5qT e 6pT (acrocêntrico). d) FISH, a seta indica a marcação intersticial no sítio 1+3i, as demais marcações encontram-se em ambos homólogos dos sítios 4qT(heteromórfico) e 5qT. e, f) LGA4215, macho com $2n=15$. e) Marcações de prata com asterisco indicando marcação no sítio 1pT, demais marcações nos sítios 4qT (submetacêntrico) e 5qT. f) FISH com marcação nos sítios 1pT, 4qT (heteromórfico) e 5qT em ambos os homólogos. g, h) LGA4351, fêmea X0 com $2n=13$. g) Marcações pela prata com seta indicando marcação intersticial no sítio 1+3i, e demais nos sítios 4qT (ambos homólogos), 6pT, 6c (inédita) e XpT. h) FISH com setas indicando marcações em ambos homólogos nos sítios 1+3i, 4qT (heteromórficos) e 5qT. i, j) LGA 4279, fêmea com $2n=14$. i) Marcações pela prata em ambos homólogos dos sítios 5qT e XpT e marcações nos sítios 6pT e 6i (inédita). j) FISH com marcação intersticial no sítio 1+3i (seta), e em ambos homólogos nos sítios 4qT (submetacêntricos) e 5qT (metacêntricos). k, l) LGA 4401, macho com $2n=14$. k) Marcação pela prata em um homólogo no sítio 4qT, e em ambos homólogos nos sítios 5qT e 6pT. l) FISH com marcações duplas nos sítios 4qT (acrocêntricos) e 5qT (metacêntricos). **Figura 3:** Gráficos Box Plot da variação da frequência de atividade por sítio cromossômico entre as populações.....22

Figura 3: Gráficos Box Plot da variação das frequências de atividade por sítio cromossômico entre as populações.....25

Figura 4: Gráficos Box Plot das variações da frequência de atividade por sítio cromossômico entre as populações da Bahia, Espírito Santo e híbridos interpopulacionais.....28

INTRODUÇÃO

Há cerca de 50 anos, os genes *housekeeping* foram definidos como genes sempre expressos, necessários para manutenção de funções celulares basais (Watson *et al.*, 1965). Hoje, com uma melhor compreensão dos processos celulares, esses genes são definidos por suas funções críticas, desempenhando papéis fundamentais na manutenção de cada célula, independente de nível ou período de expressão, que pode variar muito entre tecidos e fases do ciclo celular (Warrington *et al.*, 2000; Xinwei *et al.*, 2009). Alguns genes *housekeeping* são considerados referências em estudos de expressão gênica, como os que codificam tubulinas e actinas, proteínas do citoesqueleto, e os genes que codificam RNA ribossomal, responsáveis por formar o ribossomo, o centro catalítico da síntese proteica (Eisenberg & Levanon, 2003; Chang *et al.*, 2011).

Os RNAs ribossomais (RNAr) em eucariontes são codificados por um conjunto de genes, organizados em longos arranjos de centenas a milhares de unidades precursoras de um RNAr 45S dispostas *in tandem*, intercaladas por espaçadores externos não transcritos, chamado de cistron ribossomal. Cada unidade precursora que forma o RNAr 45S é formada por três genes (18S, 28S e 5,8S) separados por dois espaçadores intergênicos transcritos (ITS 1 e 2) (Heslop-Harrison, 2000). Os cistrons ribossomais são agrupados em sítios cromossômicos específicos, conhecidos como Regiões Organizadoras do Nucléolo (RONs), que podem variar entre indivíduos e/ou espécies em tamanho (número de cópias de unidades precursoras) e em número de sítios cromossômicos por célula (Gornung *et al.*, 2013).

A biogênese ribossomal ocorre com a associação de RNAs ribossomais a ribonucleoproteínas para formação das subunidades ribossomais maior e menor, que posteriormente migram ao citosol para a completa formação do ribossomo (Andrade, 2011). Esse processo têm início com a transcrição do DNAr durante a intérfase, posterior montagem das subunidades ribossomais no núcleo pela união de RNAr e ribonucleoproteínas. Durante a divisão celular, na prófase ocorre a interrupção da atividade ribossomal (Dundr, Misteli & Olson, 2000). Assim, ribonucleoproteínas são proteínas localizadas próximas aos sítios ativos de RONs, onde foram transcritos os RNAs ribossomais durante a intérfase celular.

Devido as ribonucleoproteínas possuírem caráter argirofílico, a técnica de coloração das RONs pelo nitrato de prata proposta por Howell & Black (1980) é capaz de impregná-las com a prata, formando grânulos visíveis ao microscópio, evidenciando indiretamente os sítios de RONs ativos na intérfase anterior. Essas regiões são chamadas de Ag-RONs (Goodpasture & Bloom, 1975).

Dessa forma, a técnica de coloração das Ag-RONs em células metafásicas tem sido interpretada como um método capaz de revelar genes ribossomais ativos na intérfase anterior, e indiretamente, tem sido utilizada para localizar os genes nas espécies analisadas (Yonenaga-

Yassuda *et al.*, 1992). Variação na posição de Ag-RONs entre cromossomos têm auxiliado na interpretação de eventos de remanejamento de segmentos cromossômicos (ex. inversões, translocações, fusões, deleções, etc), enquanto variação no tamanho das Ag-RONs entre homólogos tem sido interpretada como variação na atividade desses genes na intérfase anterior ou no tamanho do cistron ribossomal (Oliveira *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1998; Pellegrino *et al.*, 1999; Fagundes *et al.*, 1997; Carvalho & Dias, 2007; Ventura *et al.*, 2009)

Em meados dos anos 80, foi desenvolvida uma técnica que se baseia na propriedade recombinante das cadeias complementares de DNA, a Hibridação *in situ* Fluorescente – FISH, que consiste em revelar a posição de segmentos alvo nos cromossomos (genes ou regiões específicas), pela utilização de sondas de DNA complementares, marcadas com fluorocromos, detectados por imunofluorescência (Flavell, 1989). Após o isolamento do gene ribossomal 18S, essa técnica tem sido amplamente utilizada para localização do mesmo em diversos grupos, por tratar-se de um gene altamente conservado (Andrade, 2011). Essa técnica passou então a ser indicada para o estudo da localização física do gene ribossomal, independente de sua atividade (Gornung *et al.*, 2013), em contraste com a técnica de Ag-RON, capaz de localizar indiretamente somente os genes ativos, pela localização das ribonucleoproteínas.

Do ponto de vista evolutivo, as RONs são regiões relativamente conservadas, e por isso seu número e localização nos cromossomos são frequentemente usados como marcadores específicos (Castro *et al.*, 2001). Desde a década de 70, estudos da atividade transcricional e localização das Ag-RONs geraram grande avanço no conhecimento em diferentes grupos de organismos e indicaram que padrões de marcação de Ag-RONs podem ser espécie-específicos, com potencial de serem população-específicos (Gornung *et al.*, 2013).

Por sua vez, diferenças no padrão de frequência de marcação de Ag-RONs dentro e entre indivíduos (variação intra e interindividual) e populações (variação intra e interpopulacional) têm sido detectadas em vários grupos como em peixes (Singh, *et al.*, 2009; Santi-Rampazzo *et al.*, 2008), anfíbios (Venu, 2014) e mamíferos (Zurita *et al.*, 1975; Idris & Moin, 2009; Suzuki *et al.*, 2014).

Em espécies que possuem somente um par portador de RON, a frequência de marcação de Ag-RON é sempre muito alta (Yonenaga-Yassuda, 1985; Leal-Mesquita *et al.*, 1992; Gallardo *et al.*, 2006, Arslan *et al.*, 2013; Gornung *et al.*, 2013), enquanto em espécies que possuem vários pares portadores de RONs, há extensa variabilidade na atividade das Ag-RONs por par cromossômico (Nunes & Fagundes, 2008a, 2008b; Santi-Rampazzo *et al.*, 2008; Carvalho, Lopes & Svartman, 2012; Venu, 2014; Kuchta-Gladysz *et al.*, 2016).

A despeito de inúmeros trabalhos descrevendo a atividade das Ag-RONs, pouco se conhece sobre o potencial de transmissão dos padrões de frequência de atividade das RONs entre as gerações. Sabe-se que o tamanho das RONs são características inerentes a um cromossomo particular, capazes de serem transmitidas de pai para filho. Porém, perante um padrão de atividade

que varia entre indivíduos e tecidos, ainda não se sabe se é também transmitido entre as gerações ou reprogramado no zigoto. Poucos estudos demonstraram que as características inerentes às Ag-RONs são transmitidas para a prole segundo um padrão de herança mendeliana, sendo registrado em alguns estudos com humanos (Markovic *et al.*, 1978; Taylor & Martin-DeLeon, 1981), peixes (Castro *et al.*, 1998; Foresti *et al.*, 2004) e coelhos (Arruga & Monteagudo, 1989).

Ainda, alguns estudos comprovam presença de Ag-RONs no cromossomo sexual X, e portanto atividade diferencial das RONS entre sexos em vertebrados, como visto em anuros *Hyla femoralis* (Anderson, 1991), *Gastrotheca riobanae* (Schmid *et al.*, 1983, 1986), *Buergeria buergeri* (Schmid *et al.*, 1993), peixe *Hoplias malabaricus* (Born & Bertollo, 2000) e no morcego *Carollia perscillata* (Goodpasture & Bloom, 1975). Tais dados sugerem que a presença de RONS ativas em ambos os cromossomos X mostram que os genes de RNAr não estão sujeitos a mecanismos de inativação dependente do sexo.

Em roedores, análises de Ag-RONs mostraram existência de polimorfismo de número e localização cromossômica dos sítios portadores entre espécies e populações (Suzuki *et al.*, 1990; Boeskorov *et al.*, 1995; Yonenaga-Yassuda *et al.*, 1983), além de já terem proporcionado evidências de rearranjos cromossômicos como proposto por Fagundes (1997) para a espécie *Akodon cursor*.

Akodon cursor (Winge, 1887) é um roedor sigmodontino com ampla distribuição geográfica ao longo da encosta Atlântica brasileira, desde o estado da Paraíba ao Paraná (Geise *et al.*, 2001) de características citogenéticas marcantes, como alta variabilidade cariotípica intra- e interpopulacional, que inclui variação do número diploide ($2n = 16, 15$ e 14) e autossômico entre 18 e 26 , compreendendo um total de 31 carioformas conhecidas para a espécie (Nogueira-Massariol, 2016).

Estudos com Ag-RONs nesta espécie foram realizados por Yonenaga-Yassuda *et al.*, (1983), Fagundes (1993, 1997) e Nogueira (2003), que investigaram a variabilidade intraespecífica e interpopulacional com 74 espécimes, identificando existência de variação populacional. Nestes estudos também investigou-se a existência de variação intra-tecidual, porém, tais trabalhos apresentam resultados contraditórios onde, o primeiro encontra resultados de existência de variação e os demais de não existência de variação intra-teciduals.

No presente estudo, abordou-se questões sobre padrão de marcação de Ag-RONs e seu potencial de transmissão entre gerações utilizando uma espécie com marcante variabilidade de Ag-RONs entre pares cromossômicos e indivíduos. Nesta espécie, análises preliminares sugeriram que pode haver, em alguns casos, ausência de marcação de Ag-RON, sendo que houve ausência do gene ribossomal naquele sítio, após análise combinada de Ag-RONs e FISH, levantando-se questionamentos de que a ausência de marcação de Ag-RON indica inatividade gênica, como reconhecida desde a publicação da técnica de Ag-RON por Howel & Black em 1980.

Dessa forma, entender as características de padrões de atividade, presença e herança de genes ribossomais, torna-se importante devido ao seu possível potencial de revelar características intrínsecas do indivíduo, população ou espécie, possibilitando o uso das Ag-RONs como um bom marcador citogenético para uma dada espécie. No presente estudo investigou-se as seguintes hipóteses: 1. Ausência de marcação de Ag-RONs em sítios conhecidamente portadores do DNAr significa ausência de atividade gênica; 2. Presença de marcação de Ag-RONs em sítios conhecidamente portadores do DNAr significa presença de atividade gênica; 3. Todos os tecidos de um indivíduo apresentam o mesmo padrão de marcação de Ag-RONs, quanto ao número de cromossomos portadores e frequência de Ag-RONs por cromossomo; 4. Existe padrão variável de frequência de Ag-RONs entre indivíduos de populações distintas, ou seja, a Ag-RON pode ser utilizada como marcador populacional em *Akodon cursor*; 5. Não existe diferença na frequência de marcação de Ag-RON por par cromossômico entre indivíduos coletados na natureza e nascidos em cativeiro; 6. A frequência de marcações de Ag-RONs por célula é igual entre machos e fêmeas; e 7. O padrão de Ag-RONs de um parental é herdado pela prole, obedecendo um padrão mendeliano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

O presente estudo utilizou como modelo a espécie de roedor *A. cursor*, que se caracteriza por apresentar alta variabilidade cariotípica intra- e interpopulacional, com variação do número diploide ($2n = 16, 15$ e 14) e do número de braços autossômico ($NA=18$ a 31), resultando em 31 diferentes cariótipos para a espécie, coexistentes em algumas populações (Fagundes *et al.*, 1998; Nogueira-Massariol, 2016). Essa alta variabilidade cariotípica deve-se a eventos de rearranjos cromossômicos do tipo inversão pericêntrica e fusão cêntrica, em cinco pares autossômicos, gerando pares autossômicos heteromórficos, com homólogos facilmente distinguíveis entre si. Nos pares 4 e 6 ocorrem as formas acrocêntricas e submetacêntricas; o par 5 apresenta somente a forma metacêntrica; os cromossomos submetacêntricos 1 e 3, após fusão e inversão, formam um submetacêntrico grande 1+3. Os cromossomos portadores de Ag-RON na espécie são bem distintos (Fagundes *et al.*, 1997; Fagundes *et al.* 1998), sendo conhecidas Ag-RONs nas regiões terminais dos braços longos dos cromossomos 4 (sítio 4qT) e 5 (sítio 5qT), terminais dos braços curtos dos cromossomos 6 (sítio 6pT) e X (sítio XpT), e na região intersticial do braço longo do cromossomo 1+3 (sítio 1+3i). Para o presente estudo foram utilizados 159 indivíduos, sendo indivíduos capturados na natureza e provenientes de cruzamentos experimentais, nos casos de estudo de herança (**Anexo 1**).

Indivíduos coletados na natureza

Foram analisados 65 indivíduos coletados em dez diferentes localidades (**Tabela 1** e **Anexo 1**). Para coleta dos indivíduos na natureza utilizou-se armadilhas do tipo Sherman ou Thomahawk, no período de 1991 a 2015. Todos os indivíduos foram analisados citogeneticamente, determinando-se o número diploide ($2n$), número fundamental (NF) e fórmula cariotípica, localização e frequências das Ag-RONs.

Indivíduos nascidos em cativeiro proveniente de cruzamentos experimentais

Foram analisados 94 indivíduos nascidos em cativeiro (**Tabela 2, Anexo 1**), provenientes de cruzamentos entre parentais provenientes de Una - Bahia (Una) e Domingos Martins - Espírito Santo (DM), sendo 43 gerados a partir de cruzamentos intrapopulacionais (Una x Una e DM x DM) e 47 de cruzamentos entre indivíduos de populações distintas (Una x DM). De cada indivíduo foram registrados o dia de nascimento, indivíduos parentais, sexo, $2n$, NF e fórmula cariotípica.

Tabela 1. Amostra de indivíduos coletados na natureza. Número de indivíduos de *Akodon cursor* por localidade (n), e população (nt) analisados.

População	Nt	Localidade	Coordenada	n
São Paulo	22	Iporanga - SP	-47.63, -24.12	4
		Parque Estadual Intervales, Sete Barras - SP	-47.85, -24.38	18
Bahia	24	RPPN Nova Angélica, Una - BA	-39.07, -15.25	14
		REBIO Una, Una - BA	-39.07, -15.30	11
Espírito Santo	15	Valsugana Velha, Santa Teresa - ES	- 40.56, -19.96	2
		Estação Biológica Santa Lúcia, Santa Teresa - ES	- 40.56, -19.96	3
		Domingos Martins - ES	- 40.65, -20, 34	7
		Castelo - ES	-41.18, -20.61	3
Pernambuco	4	APA Aldeia, Camaragibe - PE	-34, 98, -7,94	3
		Rio Formoso - PE	-35,18, - 8,71	1
Total	65			65

Tabela 2: Amostra de indivíduos nascidos em cativeiro, considerando a localidade de origem dos parentais (Bahia, BA e Espírito Santo, ES) e sexo, em cruzamentos intrapopulacionais (INTRA) e interpopulacionais (INTER).

Cruzamentos	Tipo	Parentais			Prole		
		n total	Machos	Fêmeas	n total	Machos	Fêmeas
INTRA	BA x BA	18	8	10	38	15	23
	ES x ES	4	2	2	9	5	4
INTER	BA x ES	21	10	11	47	23	24
Total		43	20	23	94	43	51

Geração e análises dos dados

Os protocolos de preparação cromossômica, coloração das Ag-RONs e hibridação *in situ* fluorescente estão detalhados no **Anexo 2**.

As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS®, versão 24.0 (SPSS® Inc; Illinois, USA), onde para todas as hipóteses apresentadas, os dados foram testados para normalidade através de teste Kolgomorov-Smirnov e quando não normais tentou-se transformação via raiz quadrada e Log 10. O valor de corte *p* estipulado para todos os testes foi de 0,05 ou 5%.

Cálculo da frequência de marcações de Ag-RON por sítio cromossômico por indivíduo

Para a descrição dos cariótipos admitiu-se a nomenclatura e numeração cromossômica estabelecida por Fagundes *et al.* (1998). Foram analisadas no mínimo 20 células coradas pela prata por indivíduo, e por tecido, quando for o caso. Para cada metáfase foi registrado o cromossomo portador e a posição da Ag-RON no cromossomo (terminal no braço curto, p;

terminal no braço longo, q ou intersticial, i). Quando o par autossômico era homomórfico, foi registrada a presença de marcação em um (+/-) ou nos dois homólogos (+/+). Quando o par era heteromórfico, foi registrada a morfologia de cada cromossomo portador da Ag-RON (A=acrocêntrico, S/M= cromossomos submetacêntricos ou metacêntricos, com dois braços).

Foram contabilizados os números máximo e mínimo de Ag-RONs marcadas por célula e o número modal de marcações por indivíduo. A frequência de marcação de Ag-RON, por sítio, foi determinada pela fórmula:

$$\text{Freq. (par)} = \frac{\text{número total de sítios marcados de todas as células analisadas}}{\text{número máximo de sítios portadores de todas as células analisadas}}$$

Presença da Ag-RON x Presença do gene ribossomal

Foram selecionados 12 indivíduos que apresentassem frequências de marcação de Ag-RONs nos sítios cromossômicos, e cujos valores foram discrepantes entre os homólogos do par e/ou entre indivíduos, independente da população (**Tabela 3**), para proceder com os experimentos de hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNAr 18S e contrapor os dados de presença de marcação das Ag-RONs. Foram verificadas as presenças de marcação da sonda, independente da presença de marcação prévia de Ag-RON, sendo realizada uma análise qualitativa de presença e ausência de marcação de Ag-RON e FISH em cada indivíduo.

Comparação de frequência de Ag-RON entre tecidos de um indivíduo

Para testar a hipótese de que os tecidos de um indivíduo apresentam o mesmo padrão de frequência de marcação de Ag-RONs por sítio cromossômico, foram utilizados 22 indivíduos com frequência de Ag-RONs de células provenientes dos tecidos: baço e medula óssea (**Anexo 4**). Foram utilizados os testes T pareado ou Wilcoxon pareado.

Comparação da frequência de Ag-RON por sítio entre populações

Visando testar a existência de padrões populacionais de frequência de atividade de RONS por sítio cromossômico, foram considerados da mesma população, indivíduos coletados na natureza, provenientes de localidades com menos de 40 km de distância entre si, com altitudes que não variaram mais de 100 metros, a saber: São Paulo, Espírito Santo e Bahia. Foram analisados 61 indivíduos (**Tabela 1** e **Anexo 5**). Foram utilizados os testes Kruskal-Wallis ou ANOVA, a depender do resultado de normalidade.

Comparação entre indivíduos da natureza e gerados em cativeiro

Para testar a manutenção do padrão de frequência dentro das populações foram comparados indivíduos coletados na natureza com indivíduos gerados de cruzamentos

intrapopulacionais. A amostra contou com 24 indivíduos Bahia, 15 do Espírito Santo, 29 indivíduos de cruzamentos intrapopulacionais da Bahia e 9 indivíduos de cruzamentos entre indivíduos do Espírito Santo (**Anexo 6**). Os testes ANOVA e Kruskal-Wallis foram utilizados a depender dos dados de normalidade.

Para verificar se há diferença na frequência de marcação de Ag-RON, por sítio cromossômico, entre indivíduos coletados na natureza e híbridos interpopulacionais nascidos em cativeiro, foram utilizados indivíduos da geração F1 (n=7), F2 (n=24) e F3 (n=16) e parentais originários da natureza da Bahia (n=24) x Espírito Santo (n=15) (**Anexo 6**). Também foram utilizados os testes Kruskal-Wallis, para dados não paramétricos e o teste ANOVA para dados paramétricos.

Comparação da frequência de Ag-RON entre sexo

Visando verificar se há diferença na frequência de Ag-RONs por sítio cromossômico entre sexos, foi utilizada uma amostra de 24 indivíduos naturais da Bahia e 29 provenientes de cruzamentos intrapopulacionais da Bahia, contendo 30 fêmeas e 23 machos (**Anexo 7**), utilizando-se os testes de Mann-Whitney ou teste T.

Comparação da frequência de Ag-RON entre homólogos heteromórficos

Para verificar se há diferença entre a frequência de marcação de Ag-RON entre cromossomos homólogos do par 4 heteromórfico foram utilizados 27 indivíduos coletados na natureza, 11 provenientes de cruzamento em cativeiro com parentais de mesma população e 21 indivíduos provenientes de cruzamentos com parentais de populações distintas (**Anexo 8**), sendo utilizados os testes T ou de Mann-Whitney, dependendo da normalidade dos dados.

RESULTADOS

Dentre os 159 indivíduos, verificou-se variação do número diploide de $2n = 13$ a 16 e do número de braços autossômicos de $NA = 26$ a 18, gerando 20 diferentes cariótipos (**Anexo 3**). O cariótipo com $2n = 16$ possui os pares 1 e 3 submetacêntricos não fusionados. Um rearranjo complexo envolvendo inversão e fusão cêntrica dos cromossomos 1 e 3, formando um metacêntrico grande (1+3) em homozigose ($2n = 14$) e em heterozigose ($2n = 15$). O cariótipo com $2n=13$ foi devido à monossomia do X de um indivíduo com o par metacêntrico 1+3 ($2n = 13$). A variação do NA também é devido à inversão pericêntrica dos cromossomos 2, 4 e 6, que de metacêntricos/submetacêntricos ocorrem na forma acrocêntrica, em homozigose e heterozigose. Nenhum cariótipo encontrado é inédito, e nenhuma forma cariotípica é população-específica, coexistindo em diferentes populações, apesar de no Espírito Santo só ocorrer a forma $2n = 14$, enquanto em Pernambuco só ocorre $2n = 16$.

DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MARCAÇÃO PELA PRATA

Nas células de medula de indivíduos coletados na natureza ($n = 65$, **Anexo 1**) das populações de Pernambuco ($n = 4$), Bahia ($n = 24$), Espírito Santo ($n = 15$) e São Paulo ($n = 22$), foram observadas marcações pela prata em cinco sítios cromossômicos (**Figura 2**): intersticial proximal no braço longo do cromossomo 1+3 (sítio 1+3i); telomérica no braço curto do cromossomo 1 (1pT), presente somente em indivíduos com $2n = 15$ e 16; telomérica nos braços longos dos cromossomos 4 e 5 (sítios 4qT e 5qT, respectivamente); telomérica dos braços curtos dos cromossomos 6 e X (sítios 6pT e XpT, respectivamente). Quando na forma metacêntrica, o cromossomo 6 apresentou marcações na região centromérica (sítio 6c), esse sítio foi considerado como mesmo sítio do cromossomo 6, caso houvesse ou não rearranjo. O número de sítios marcados pela prata variou de 1 a 9 sítios por célula.

As análises de distribuição de frequência de marcação pela prata entre indivíduos das populações (**Figura 1**), mostraram que o sítio 1pT marcou somente em indivíduos da Bahia e Pernambuco com frequência média (0-60% das células); o sítio 1+3i exibiu baixa frequência de marcação, com cerca de 45-55% dos indivíduos das populações com nenhuma marcação, e os restantes com até 20% de frequência de marcação e somente em São Paulo e na Bahia cerca de 5% dos indivíduos marcam com frequência superior a 50%.

Os sítios 4qT e 5qT mostraram grande variação na frequência de marcação pela prata entre seus indivíduos, sendo nas populações do Espírito Santo e São Paulo cerca de >80% dos indivíduos com frequências de marcação superiores a 40%, e a população da Bahia sem um padrão observável.

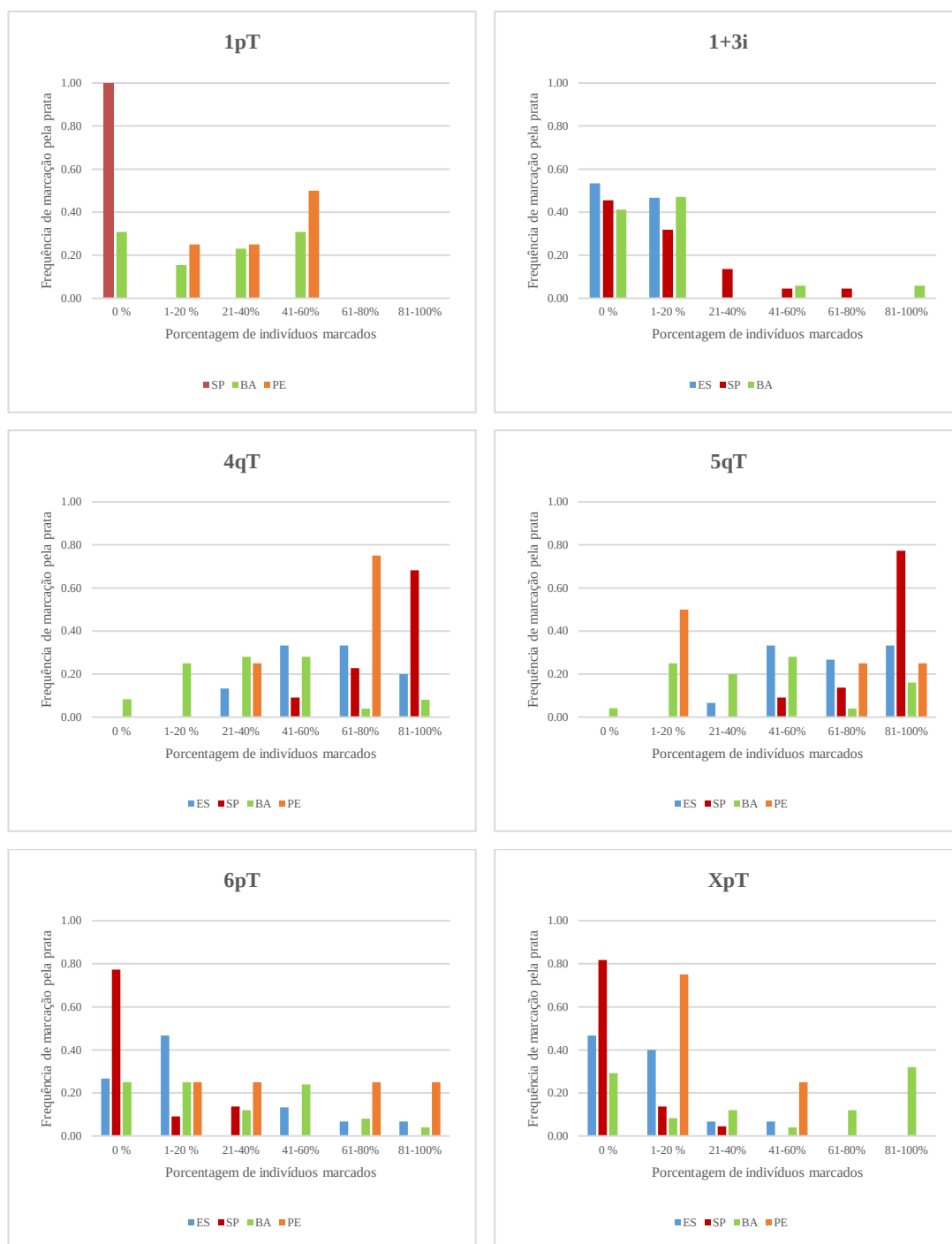


Figura 1: Análise qualitativa da proporção de indivíduos em relação a frequência de marcação pela prata em cada sítio cromossômico por população. Detalhes de frequência por sítio, por indivíduo e por população se encontram no Anexo 5.

MAPEAMENTO FÍSICO DOS GENES RIBOSSOMAIS

Para o mapeamento físico dos genes ribossomais pela FISH utilizou-se 12 indivíduos com diferentes padrões de marcação de Ag-RONs (**Tabela 3**).

Sítio 1pT

Dos quatro indivíduos com $2n=15$, um exemplar (LGA 4215) apresentou marcação pela prata em 85% das células, confirmada pela presença do gene 18S pela marcação por FISH. Já os três outros indivíduos (LGA 4474, LGA 4338 e CIT 10) não mostraram marcações de prata em nenhuma das 60 células analisadas, tampouco sinal da presença do gene pela técnica de FISH. Esses dados mostram que há variação da presença do gene 18S no sítio 1pT, havendo cromossomos 1S com e sem o referido gene.

Sítio 1+3i

Dos indivíduos com $2n=14$, somente o indivíduo LGA4351 mostrou marcação em ambos os sítios pela prata e pela técnica de FISH do gene 18S e pela prata. Os indivíduos BIO856 e CIT10 apresentaram marcações de FISH em ambos os sítios, apesar de não apresentar marcação pela prata em nenhum deles. Os indivíduos LGA4619 e LGA4279 mostraram marcação do gene 18S pela FISH em somente um dos homólogos, enquanto que os respectivos sítios não foram marcados pela prata nas 60 células analisadas. O indivíduo CIT20 apresentou marcações pela prata e pela FISH em somente um dos homólogos. O indivíduo LGA4432 não apresentou marcação do sítio nem pela prata nem pela FISH. Já o indivíduo LGA 4401 apresentou marcação pela prata em uma frequência baixíssima de (2,5%) em apenas um dos homólogos, mas não apresentou marcação pela FISH. Dos indivíduos com $2n=15$, os indivíduos LGA4474 e CIT 47 mostraram o sítio ativo (Ag-RON positiva) e presença do gene 18S. Os indivíduos LGA4215 e LGA4338 mostraram presença do gene 18S pela FISH e ausência de atividade observada pela marcação pela prata nas 60 células analisadas. Os dados mostram variação da presença do gene 18S, bem como variação de atividade gênica no respectivo sítio avaliado.

Sítio 4qT

Todos os indivíduos analisados apresentaram marcações positivas de FISH nos dois homólogos para este sítio, indicando que não há variação da presença do gene neste sítio, mesmo entre indivíduos de diferentes populações e ou cativeiro. O dado mostra não haver variação de presença e atividade gênica neste sítio.

Sítio 5qT

Assim como no sítio anterior, o sítio 5qT também evidenciou a presença do gene em todos os indivíduos analisados indicando que este sítio não é variável em relação a presença do gene,

mesmo entre indivíduos de diferentes populações e ou cativeiro. O dado mostra não haver variação de atividade ou presença gênica neste sítio cromossômico.

Sítios 6pT e XpT

Dos 12 indivíduos, as Ag-RON marcaram nos dois homólogos do par 6 em sete (LGA4351, LGA4474, LGA4279, LGA4619, LGA4401, BIO856 e CIT20) e em um dos homólogos por metáfase em dois indivíduos (LGA4432 e LGA4338). Quanto à marcação no sítio XpT, somente em 4 indivíduos (LGA4401, CIT10, CIT20 e CIT47) não foram observadas marcações positivas de Ag-RON neste sítio, os demais todos apresentaram marcações de prata positivas neste sítio. Considerando que em todos os indivíduos foram observadas marcações de FISH nos sítios 4qT e 5qt, servindo como controle positivo para a hibridação da sonda 18S, a ausência de marcação de FISH nos sítios 6pT, 6c e XpT em todas as células analisadas de todos os doze indivíduos analisados indica que não há genes ribossomais nestas posições, devendo a marcação pela prata ser atribuída a outro fator e não à atividade transcricional de genes ribossomais nesses sítios.

Número de sítios de genes ribossomais

Os sinais de hibridação da sonda 18S confirmam que há genes ribossomais somente em quatro sítios cromossômicos (1pT, 1+3i, 4qT, 5qT), sendo o número mínimo e máximo de Ag-RONs, por célula, variável de 1 a 5 sítios.

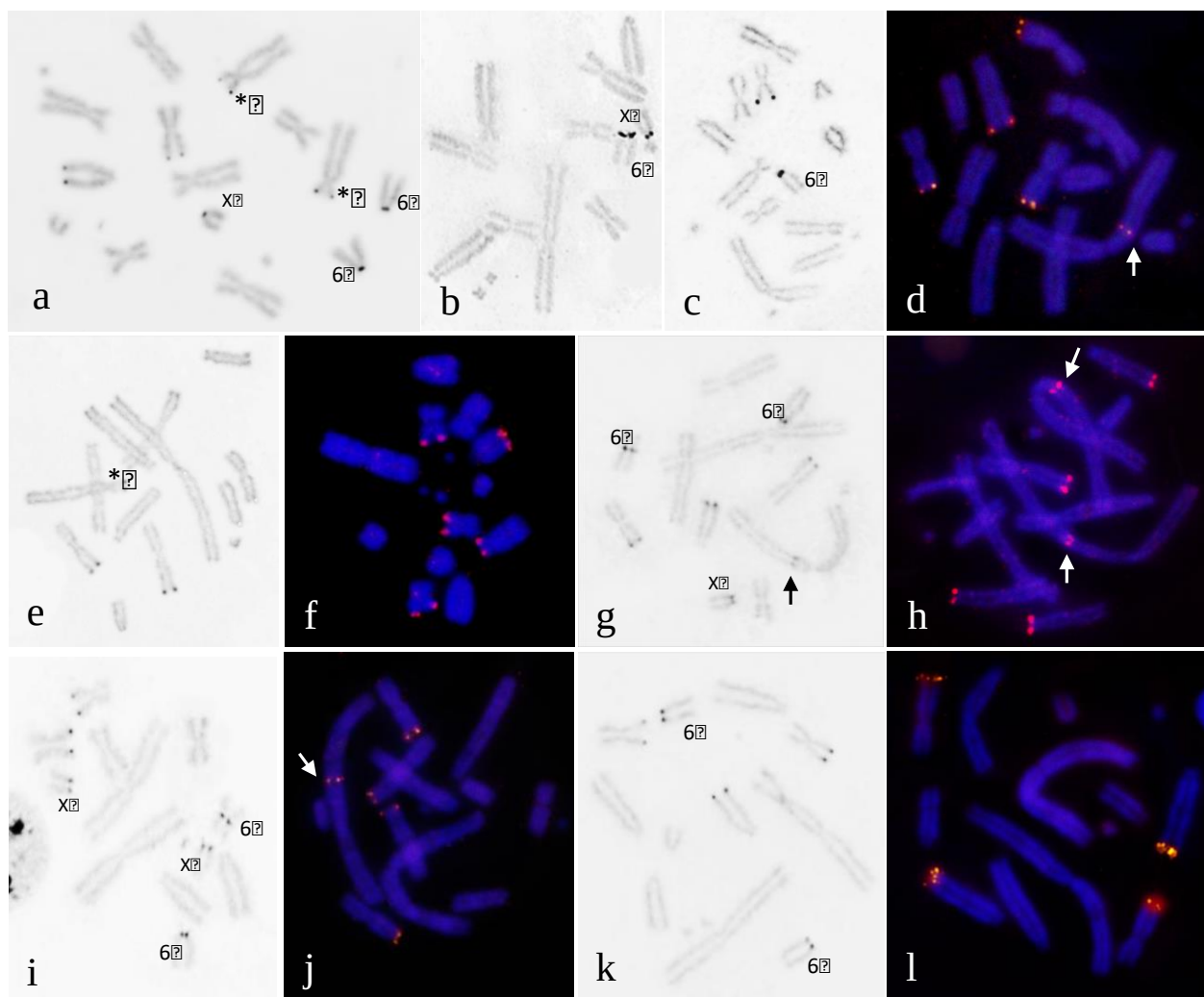


Figura 2: Regiões organizadoras do nucléolo em exemplares de *Akodon cursor*, identificadas pela coloração pela prata e FISH com sonda ribossomal. a) LGA4981, fêmea com $2n=16$ – Ag-RON, asteriscos indicam marcações nos sítios 1pT (inéditas em homologia), e as demais marcações pela prata em ambos os sítios 6pT (acrocêntrico), um sítio XpT e em ambos os sítios 4qT (par heteromórfico). b, c, d) LGA4338, macho com $2n=15$. b) Marcações de prata em um homólogo dos cromossomos 6 e X. (acrocêntricos) c) Marcação pela prata em um homólogo dos sítios 5qT e 6pT (acrocêntrico). d) FISH, a seta indica a marcação intersticial no sítio 1+3i, as demais marcações encontram-se em ambos homólogos dos sítios 4qT(heteromórfico) e 5qT. e, f) LGA4215, macho com $2n=15$. e) Marcações de prata com asterisco indicando marcação no sítio 1pT, demais marcações nos sítios 4qT (submetacêntrico) e 5qT. f) FISH com marcação nos sítios 1pT, 4qT (heteromórfico) e 5qT em ambos os homólogos. g, h) LGA4351, fêmea XO com $2n=13$. g) Marcações pela prata com seta indicando marcação intersticial no sítio 1+3i, e demais nos sítios 4qT (ambos homólogos), 6pT, 6c (inédita) e XpT. h) FISH com setas indicando marcações em ambos homólogos nos sítios 1+3i, 4qT (heteromórficos) e 5qT. i, j) LGA 4279, fêmea com $2n=14$. i) Marcações pela prata em ambos homólogos dos sítios 5qT e XpT e marcações nos sítios 6pT e 6i (inédita). j) FISH com marcação intersticial no sítio 1+3i (seta), e em ambos homólogos nos sítios 4qT (submetacêntricos) e 5qT (metacêntricos). k, l) LGA 4401, macho com $2n=14$. k) Marcação pela prata em um homólogo no sítio 4qT, e em ambos homólogos nos sítios 5qT e 6pT. l) FISH com marcações duplas nos sítios 4qT (acrocêntricos) e 5qT (metacêntricos).

Tabela 3 – Frequência de marcação pela prata por sítio de indivíduos submetidos ao mapeamento físico dos genes ribossomais pela FISH com sonda 18S.

Espécime	Procedência ¹	Sexo	2n	NA	Frequência de marcações de Ag-RON por sítio					
					1pT	1+3i	4qT	5qT	6pT	XpT
LGA 4401	ES	♂	14	18	-	0,025	0,300	0,475	0,700	0,000
LGA 4351	BA	♀	13	22	-	0,125	0,875	0,850	0,550	0,400
LGA 4215	C BA	♂	15	21	0,850	0,000	0,425	0,550	0,000	0,100
LGA 4474	C BA	♀	15	23	0,000	0,200	0,550	0,450	0,325	0,675
LGA 4432	C NS	♀	14	19	-	0,000	0,125	0,113	0,500	0,963
LGA 4619	C NS	♂	14	20	-	0,000	0,950	1,000	0,550	0,850
LGA 4338	BA	♂	15	22	0,000	0,000	0,222	0,286	0,492	0,571
LGA 4279	C BA	♀	14	21	-	0,000	0,137	0,175	0,850	0,913
BIO 856	SP	♀	14	19	-	0,170	0,850	1,000	0,120	0,170
CIT 10	SP	♀	14	19	-	0,000	0,650	1,000	0,000	0,000
CIT 20	SP	♀	14	19	-	0,300	0,860	0,840	0,020	0,000
CIT 47	SP	♀	15	21	0,000	0,370	0,700	1,000	0,000	0,000

¹ES = Espírito Santo; BA = Bahia; C BA = geração F1 de parentais da Bahia; C NS = geração F1 de parentais da Bahia e Espírito Santo.

Tabela 4 – Marcações dos sítios portadores de RONS pela prata e pela hibridação *in situ* com sonda 18S dos indivíduos analisados. + = presença; - = ausência.

Indivíduo	2n	Marcação pela Ag/FISH					
		1+3i	1pT	4qT	5qT	6pT	XpT
LGA 4351	14	+/+		+/+	+/+	+/-	+/-
LGA 4432	14	-/-		+/+	+/+	+/-	+/-
LGA 4619	14	-/+		+/+	+/+	+/-	+/-
LGA 4279	14	-/+		+/+	+/+	+/-	+/-
LGA 4401	14	-/-		+/+	+/+	+/-	-/-
BIO 856	14	-/+		+/+	+/+	+/-	+/-
CIT 10	14	-/+		+/+	+/+	-/-	-/-
CIT 20	14	+/+		+/+	+/+	+/-	-/-
LGA 4338	15	-/+	-/-	+/+	+/+	+/-	+/-
LGA 4215	15	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/-
LGA 4474	15	+/+	-/-	+/+	+/+	+/-	+/-
CIT 47	15	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-

VARIAÇÃO NA FREQUÊNCIA DE MARCAÇÃO DAS AG-RONS

Entre tecidos de um indivíduo

Para verificar se há variação do padrão de frequência de marcação de Ag-RONs entre tecidos de um indivíduo, foram analisadas células de baço e medula de 15 indivíduos coletados na natureza e 6 indivíduos gerados em cruzamentos intrapopulacionais (**Anexo 4**).

A análise da frequência de marcação de cada sítio, por tecido, mostrou grande variação da frequência intratecidual, com altos valores de desvio padrão. O Teste T pareado (sítio 4qT) e Wilcoxon pareado (sítios 1+3i, 5qT) indicaram haver diferenças significativas entre as frequências de Ag-RON, por sítio, entre os tecidos de um mesmo indivíduo (**Tabela 5**).

Tabela 5: Estatísticas sumárias das frequências de marcação de Ag-RON por sítio entre tecidos baço e medula.

Sitio	Tecido	Frequência de marcação por sítio				Estatística	
		Min	Max	Med	DP	Teste	p-valor
1+3i	Baço	0	0,475	0,112	0,133	<i>T pareado</i> = -3,297	0,004
	Medula	0	0,425	0,057	0,104		
4qT	Baço	0,275	1,00	0,795	0,201	<i>T wilcoxon</i> = 2,608	0,009
	Medula	0,120	1,00	0,650	0,280		
5qT	Baço	0,100	1,00	0,843	0,210	<i>T wilcoxon</i> = 2,273	0,023
	Medula	0,110	1,00	0,719	0,280		

Entre populações

Para a análise comparativa da frequência de Ag-RONs, por sítio, entre populações, foram utilizadas células de medula de 61 indivíduos coletados na natureza das populações da Bahia (n=24), Espírito Santo (n=15) e São Paulo (n=22) (**Anexo 5**).

A marcação no sítio 1pT foi observada em 9 dos 13 indivíduos com 2n=15 somente na população da Bahia, com frequência por indivíduo de 15 a 60% das células analisadas.

O sítio 1+3i, por sua vez, apareceu marcado em todas as populações com frequência de 2 a 43% das células analisadas. O teste Kruskal-Wallis mostrou que não há diferenças significativas na frequência de atividade do sítio 1+3i entre as populações (**Tabela 6, Figura 3**).

O sítio 4qT mostrou maiores valores de frequência na população de São Paulo e menores valores na população da Bahia, mostrando-se significativamente distinto entre as populações pelo teste de Kruskal-Wallis, sendo cada população com um padrão distinto entre si, pelo teste pareado (**Tabela 7, Figura 3**).

Similarmente, o sítio 5qT mostrou maiores frequências na população de São Paulo e menores frequências de atividade na Bahia. O teste Kruskal-Wallis indicou que há diferenças

significativas das frequências entre as populações, enquanto que o teste pareado mostrou que não há diferença entre as populações de São Paulo e Espírito Santo (**Figura 3**).

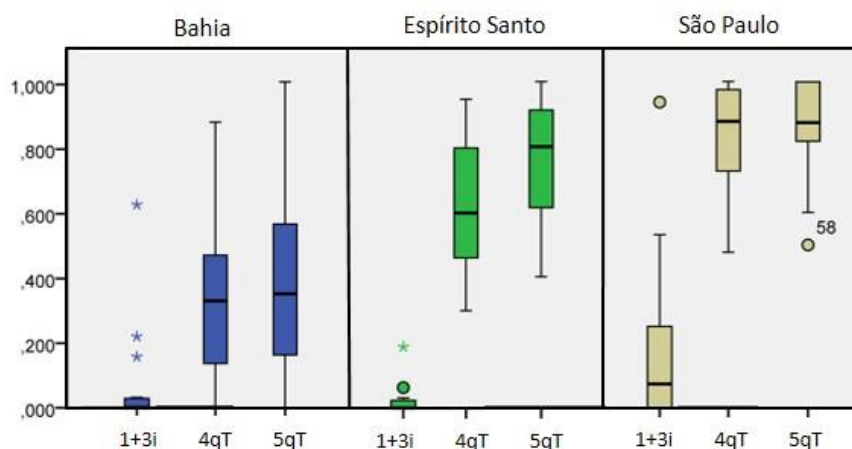


Figura 3: Gráficos Box Plot da variação das frequências de atividade por sítio cromossômico entre as populações.

Entre indivíduos da natureza e gerados em cativeiro

Geração F₁ de parentais de mesma população

Para verificar se, dentro de uma população, há manutenção do padrão de marcação das Ag-RONs entre indivíduos gerados em cativeiro e os indivíduos coletados da natureza foi realizada uma análise comparativa das frequências de marcação entre indivíduos de duas populações: gerados em cativeiro (n=29) e coletados na natureza (n=24) da Bahia e gerados em cativeiro (n=9) e na natureza (n=15) do Espírito Santo (**Anexo 6**).

Tanto para a população da Bahia quanto do Espírito Santo, foram utilizados os testes Mann-Whitney (sítio 1+3i) e Teste T (sítios 4qT e 5qT), que identificaram que não há diferenças significativas entre as frequências de atividade dos sítios entre os dois grupos de indivíduos, mostrando que o padrão de marcação de Ag-RONs da geração F₁ se apresenta semelhante ao dos indivíduos coletados da natureza (**Tabela 8**).

Tabela 6: Estatísticas sumárias dos dados de frequência de marcação de Ag-RON por sítio cromossômico pela variável localidade, diferenças significativas são identificadas em negrito.

Sitio	Bahia (n=24)				Espírito Santo (n=15)				São Paulo (n=22)				Estatística	
	Min	Max	DP	Med	Min	Max	Med	DP	Min	Max	Med	DP	Teste ¹	p-valor
1pT	0	0,600	0,206	0,131	-	-	-	-	0	0	0	0		
1+3i	0	0,430	0,104	0,049	0	0,150	0,026	0,052	0	0,425	0,113	0,140	<i>H</i> = 3,217	0,200
4qT	0	0,875	0,242	0,344	0,300	0,950	0,623	0,209	0,47	1,00	0,845	0,154	<i>H</i> = 33,169	0,001
5qT	0	1,00	0,298	0,416	0,475	1,00	0,808	0,147	0,50	1,00	0,856	0,148	<i>H</i> = 23,384	0,001

¹ *t* = Teste *t*; *H* = Kruscall-Wallis

Tabela 7: Teste Dunn-Bonferroni e T pareado entre populações nos sítios 4qT, e 5qT, diferenças significativas são identificadas em negrito.

Sítio	Interpopulacional	Valor <i>p</i>
4qT	BA x ES	0,026
	BA x SP	0,001
	ES x SP	0,038
5qT	BA x ES	0,013
	BA x SP	0,001
	ES x SP	0,488

Tabela 8: Estatísticas sumárias dos dados de frequência de marcação de Ag-RON por sítio cromossômico pelas variáveis cativo e natureza das populações da Bahia e Espírito Santo.

Sitio	Frequência – Natureza				Frequência – Cativo				Estatística	
	Min	Max	Med	DP	Min	Max	Med	DP	Teste ¹	p-valor
População da Bahia										
1+3i	0	0,850	0,077	0,196	0	0,750	0,087	0,233	$U = 383,5$	0,478
4qT	0	0,875	0,369	0,216	0	0,775	0,340	0,245	$t = 0,933$	0,355
5qT	0,150	1,00	0,462	0,251	0,025	0,950	0,417	0,297	$t = 1,235$	0,223
População do Espírito Santo										
1+3i	0	0,150	0,026	0,052	0	0,050	0,011	0,022	$U = 82,00$	0,319
4qT	0,300	0,950	0,623	0,209	0,225	0,950	0,676	0,247	$t = -0,562$	0,580
5qT	0,400	1,00	0,748	0,199	0,150	0,950	0,577	0,290	$t = 1,708$	0,102

¹ t = Teste T ; U = Mann-Whitney

Tabela 9: Estatísticas sumárias dos dados de frequência de marcação de Ag-RON por sítio cromossômico pelas variáveis populacionais, Bahia, Espírito Santo, híbridos interpopulacionais F1, F2 e F3.

Sitio	Bahia (n=24)				Espírito Santo (n=15)				F1 interpop (n=7)				F2 interpop (n=24)				F3 interpop (n=16)			
	Min	Max	Med	DP	Min	Max	Med	DP	Min	Max	Med	DP	Min	Max	Med	DP	Min	Max	Med	DP
1+3i	0	0,850	0,077	0,196	0	0,150	0,026	0,052	0	0,025	0,003	0,009	0	0,125	0,011	0,032	0	0,050	0,007	0,017
4qT	0	0,875	0,369	0,216	0,300	0,950	0,623	0,209	0,050	1,00	0,357	0,392	0	0,950	0,243	0,278	0	0,725	0,230	0,213
5qT	0,150	1,00	0,462	0,251	0,400	1,00	0,748	0,199	0,100	0,950	0,410	0,304	0	1,00	0,323	0,325	0	0,900	0,371	0,306

Gerações F₁ a F₃ de parentais de populações distintas

Considerando que a geração F₁ mantém o padrão de marcação Ag-RON da população parental (vide item anterior) e que o padrão dos sítios 4qT e 5qT são distintos entre Bahia e Espírito Santo (vide análise entre populações), verificamos se há diferença no padrão de marcação de Ag-RONs entre indivíduos gerados em cativeiro cujos parentais são de populações distintas. Para tanto foi realizada uma análise comparativa das frequências de marcação nos sítios 4qT e 5qT entre indivíduos das gerações F₁ (n=7), F₂ (n=24) e F₃ (n=16) e indivíduos coletados da natureza da população da Bahia (n=24) x do Espírito Santo (n=15), dentre os quais estão os parentais das gerações F₁ a F₃ (**Anexo 6**).

Foi observado grande desvio padrão nos grupos analisados, sendo que os indivíduos do Espírito Santo apresentam maiores valores de média nos sítios 4qT e 5qT, que são menores na Bahia e nos grupos de gerações F₁, F₂ e F₃ (**Figura 4, Tabela 9**).

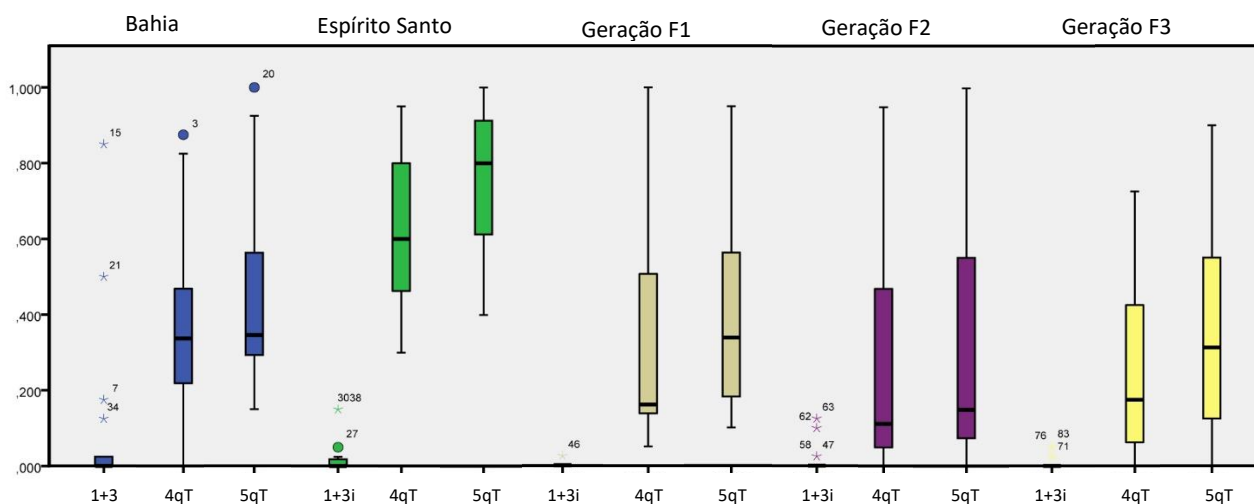


Figura 4: Gráficos Box Plot das variações da frequência de atividade por sítio cromossômico entre as populações da Bahia, Espírito Santo e híbridos interpopulacionais.

Com o teste Kruskal-Wallis (sítio 1+3i), os resultados apontaram que para o sítio 1+3i não há diferenças significativas entre as gerações F₁₋₃ e as populações da Bahia e do Espírito Santo ($H = 6,099$; $p\text{-valor} = 0,192$).

Para o teste ANOVA (sítios 4qT e 5qT), verificou-se diferenças entre os agrupamentos analisados 4qT ($F = 7,010$; $p\text{-valor} = 0,001$) e 5qT ($F = 6,172$; $p\text{-valor} = 0,001$). O teste *post hoc* Tukell (**Tabela 10**), indica que diferenças significativas ocorrem entre os indivíduos das gerações F₂ e F₃ e coletados no Espírito Santo e que a população da Bahia possui padrão semelhante às gerações F₂ e F₃.

Tabela 10: Teste *post hoc* pareado entre grupos populacionais e híbridos interpopulacionais nos sítios 4qT, e 5qT, diferenças significativas são identificadas em negrito.

Sítio	Grupos	Valor <i>p</i>
4qT	BA x ES	0,005
	BA x F ₁	0,993
	BA x F ₂	0,143
	BA x F ₃	0,221
	ES x F ₁	0,315
	ES x F ₂	0,001
	ES x F ₃	0,001
	F ₁ x F ₂	0,884
	F ₁ x F ₃	0,941
	F ₂ x F ₃	1,000
	BA x ES	0,002
5qT	BA x F ₁	0,976
	BA x F ₂	0,145
	BA x F ₃	0,607
	ES x F ₁	0,151
	ES x F ₂	0,001
	ES x F ₃	0,006
	F ₁ x F ₂	0,884
	F ₁ x F ₃	0,981
	F ₂ x F ₃	0,987

Entre sexos

Para verificar se há diferença no padrão de frequência de atividade de RON por sítio entre indivíduos de sexo distintos, foram analisadas células de medula de indivíduos da Bahia coletados na natureza (n=24) e provenientes de cruzamentos experimentais (n=29), sendo 30 fêmeas e 23 machos (**Anexo 7**). Foi observada grande variação de frequência de atividade nos dois sexos, porém sem diferença significativa entre os sexos para os testes T (4qT e 5qT) e Mann-Whitney (1+3i) (**Tabela 8**).

Tabela 11: Estatísticas descritivas sumárias e testes de hipóteses entre as frequências de marcação de Ag-RON por sítio cromossômico e o sexo.

Sítio	Macho				Fêmea				Estatística	
	Min	Max	Med	DP	Min	Max	Med	DP	Teste ¹	Valor <i>p</i>
1+3i	0	0,430	0,040	0,102	0	0,750	0,093	0,165	<i>U</i> = 256,00	0,108
4qT	0	0,825	0,329	0,248	0,040	0,875	0,353	0,239	<i>t</i> = -0,474	0,637
5qT	0,42	1,000	0,406	0,281	0	0,950	0,424	0,310	<i>t</i> = 0,182	0,856

¹ *t* = Teste *t*; *U* = Mann-Whitney

Entre homólogos heteromórficos

Para verificar se há variação na frequência de marcação de Ag-RON no sítio 4qT entre os homólogos heteromórficos do par cromossômico 4, foram analisadas células de medula de 38 indivíduos de uma mesma população com par 4 heteromórfico, sendo 27 coletados na natureza e 11 provenientes de cruzamento em cativeiro, assim como de 21 indivíduos provenientes de cruzamentos em cativeiro com parentais de populações distintas (**Anexo 8**).

Os testes indicaram não haver diferenças significativas entre as frequências de marcação de Ag-RON entre os cromossomos acrocêntrico e metacêntrico de indivíduos dentro da população ($U = 776,500$; $p\text{-valor} = 0,571$) e entre indivíduos das gerações F_1 - F_3 de cruzamentos interpopulacionais ($t = 0,16$; $p\text{-valor} = 0,987$), indicando que a marcação no sítio não varia com a morfologia do cromossomo.

HERANÇA DA MARCAÇÃO DE AG-RON ENTRE PARENTAL E PROLE

A análise qualitativa de herança da marcação de Ag-RON entre parentais e prole (**Anexo 9**) mostrou que em 24 dos 28 cruzamentos analisados, quando um sítio estava ativo em pelo menos um parental, o sítio se mantinha ativo na prole, e vice-versa. Porém, quatro cruzamentos mostraram-se discrepantes, pois o parental apresentou sítios inativos e a prole esses mesmos sítios ativos, ou vice-versa.

No cruzamento 340, o parental macho (LGA 4338, Bahia, $2n=15$) possui o sítio 1pT inativo e um dos dois descendentes que herdou o cromossomo 1 do pai, (LGA 4927, $2n=15$) apresentou o mesmo sítio ativo, mesmo que com uma frequência baixa de 5%. No mesmo cruzamento os dois parentais apresentam inatividade no sítio 1+3i, e um dos descendentes (LGA 4927) mostra atividade do sítio também na frequência de 5%.

O cruzamento 303 é formado por parentais com inatividade do sítio 1+3i, que geraram uma fêmea com o mesmo sítio ativo em uma frequência de 12,5%. Assim como acontece no cruzamento 85, onde ambos os parentais são inativos no sítio 1+3i, e ambas as filhas (LGA 4473 e LGA 4474) mostram atividade do sítio na frequência respectiva de 72,5 e 20%. No cruzamento 14, ambos os parentais são ativos no sítio 4qT, e um (LGA 4271) dos quatro indivíduos da prole mostra-se inativo neste sítio. Esses dados questionam a transmissão da frequência segundo padrões genéticos de herança.

DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisados 159 espécimes de *Akodon cursor*, sendo 65 provenientes da natureza e 94 gerados em cruzamentos experimentais em cativeiro, somando um total de 4979 células analisadas. O estudo trouxe novas contribuições para a compreensão dos padrões de atividade e mapeamento de genes ribossomais na espécie e levantou questionamentos sobre a validade da técnica de impregnação pela prata para se avaliar a presença e a atividade dos genes ribossomais, como previamente postulado por Howell & Black (1980).

Embora presente a marcação pela prata nos sítios 1pT, 1+3i, 4qT, 5qT, 6pT, 6c e XpT, as análises cromossômicas a partir da FISH com sonda de DNAr 18S somente confirmaram a localização dos genes ribossomais nos sítios 1pT, 1+3i, 4qT e 5qT. Como essa análise detecta os *loci* de DNAr, independente de seu estado transcricional, a ausência de marcações nos sítios 6pT e XpT confirma a ausência de genes ribossomais nesses sítios.

A caracterização dos padrões múltiplos de Ag-RON nem sempre é uma tarefa fácil, devido às limitações da própria técnica, uma vez que o íon prata se impregna nas proteínas não-histônicas associadas ao RNAr transcrito, identificando somente as sequências de DNAr que estiveram ativas. Desse modo o estabelecimento do número correto de RONS presente no genoma pode ser mascarado pelo fato de existirem regiões não ativas (Gazzoni *et al.*, 2011). Outra complicação é a possível associação da prata a proteínas argirofílicas ligadas a sequências repetitivas do cromossomo, seja nas regiões teloméricas, centroméricas ou mesmo intersticiais, casos em que os sítios que se mostram Ag-positivos não constituem RON verdadeiras (Dobigny *et al.*, 2003)

O estudo da localização das Ag-RONs através da coloração pela prata na espécie *Akodon cursor* foi apresentado pela primeira vez por Yonenaga-Yassuda *et al.* (1983), identificando marcações nos telômeros dos braços longos dos pares 4 (4q) e 5 (5q), telômero do braço curto do par acrocêntrico 6 (6p) e X (Xp) além da marcação intersticial proximal no braço longo do metacêntrico grande 1+3 (1+3i). Estudos de Ag-RONs identificando marcações nos mesmos sítios cromossômicos observados por Yonenaga-Yassuda *et al.* (1983) foram realizados por Fagundes *et al.* (1997) e Manduca *et al.* (2008) nas populações de São Paulo e Minas Gerais, respectivamente. Fagundes (1997) também realizou estudos prévios com FISH e identificou marcações nos sítios 1+3i, 4qT e 5qT.

Fagundes *et al.* (1997) mostraram que os cromossomos 6 e X apresentam blocos heterocromáticos na região telomérica do braço curto, coincidente com a marcação pela prata. Por outro lado, os cromossomos 1, 1+3 e 4 apresentam blocos heterocromáticos pericentroméricos (1c e 1+3c) e teloméricos dos braços curtos (4pT), enquanto a marcação pela prata ocorre no telômero do braço longo (sítio 4qT), telômero do braço curto (sítio 1pT) e intersticial (1+3i), em regiões não coincidentes com o mapeamento dos genes ribossomais (presente estudo). Esse dado

mostra que não há coincidência de blocos heterocromáticos e marcação dos genes ribossomais pela prata nos sítios 1pT, 1+3i, 4qT e 5qT, sendo esses sítios então, reconhecidos como RONS verdadeiras em *Akodon cursor*.

Heterocromatina x regiões organizadoras de nucléolos

Com relação às marcações pela prata nos sítios 6pT e XpT, nossos dados confirmam de que essas marcações da prata não estão relacionadas à marcação das ribonucleoproteínas (atividade da RON), mas são coincidentes com regiões específicas de heterocromatina constitutiva.

Descrição de inespecificidades da técnica de coloração pela prata não são novas na literatura, sendo observadas em vários grupos como peixes (Pendás *et al.*, 1993; Gromicho *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2012), roedores (Sánchez *et al.*, 1995; Dobigny *et al.*, 2002) e anuros (Lourenço *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2006; Ananias *et al.*, 2007a). Esse autores pontuam que alguns sítios positivos de impregnação de prata não são RONS verdadeiras e relacionam-nos à regiões de heterocromatina. Nesses casos, autores como Santos *et al.* (2012) e Pendás *et al.* (1993) tentam argumentar que a não identificação de sinais fluorescentes em regiões de marcações pela prata e com heterocromatica, poderiam ser genes ribossomais intercalados de regiões heterocromáticas, dificultando a hibridação da sonda. Outros autores como Silva *et al.* (2006) e Dobigny *et al.* (2002), porém, sugerem que regiões de heterocromatina contenham proteínas com afinidade pela prata, e ainda registram que aparentemente a marcação pela prata se dê em ambas regiões de heterocromatina ricas em AT e CG.

Existem outros estudos em que a RON foi associada a regiões de heterocromatina, como em cavalos (Slota *et al.*, 2007); peixes (Artoni *et al.*, 1999; Margarido & Galetti Junior, 2000) com presença do gene confirmada pela FISH; ou em roedores equimídeos (Pessoa *et al.*, 2002; Fagundes *et al.*, 2004) nos quais a RON se encontra em regiões de constrição secundária, característica de heterocromatina, também confirmadas pela FISH. Nesses casos, o gene ribossomal foi identificado pela técnica de FISH, mesmo intercalado entre regiões de heterocromatina, colocando dúvidas sobre o argumento de Santos *et al.* (2012) e Pendás *et al.* (1993) de que a heterocromatina atrapalharia a hibridação da sonda pela FISH.

Originalmente a heterocromatina foi definida como a porção do genoma que permanece condensada na intérfase, associada aos telômeros e regiões pericêntricas dos cromossomos (Heitz, 1928). Atualmente porém, é definida como áreas condensadas do genoma, geralmente concentradas em regiões centroméricas e teloméricas, envolvidas em várias funções nucleares incluindo organização nuclear, segregação cromossômica e silenciamento gênico (Grewal & Elgin, 2002). Desde a década de 70, no entanto, já se tem evidências de que a prata se associa à regiões de heterocromatina, como demonstrado por Pathak & Hsu (1979), utilizando a impregnação pela prata em preparações de meiose para visualização de complexo sinaptonêmico.

O que já se tem claro é que marcações pela prata se dão em algum tipo de proteína cromossômica de caráter ácido (Scwarzacher *et al.*, 1978), mas qual proteína, sua composição e função ainda é um dado obscuro.

Diante dos dados mostrados assumimos que o conceito de que a técnica de impregnação por prata descrita por Howell & Black (1980) evidencia sítios de RONS ativos na interfase anterior é equivocado, uma vez que a prata também pode impregnar-se em proteínas argirofílicas presentes na composição de regiões heterocromáticas.

Polimorfismo de presença x atividade de genes ribossomais

O presente estudo mostrou, de forma inequívoca e inédita, que os genes ribossomais podem ocorrer de forma polimórfica, podendo estar presentes ou não nos sítios conhecidos de RONS, a depender do indivíduo, indicando polimorfismo interindividual de presença dos genes ribossomais.

Na literatura dados de Ag-RON e FISH são utilizados em combinação para confirmação da presença do gene ribossomal. Os diversos estudos tem mostrado que: a) a FISH corrobora os dados de Ag-RON, como observado em anuros (Nunes & Fagundes, 2008), peixes (Born & Bertollo, 2000; Martínéz *et al.*, 2009; Milhomem *et al.*, 2013), e roedores (Gallardo *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2014) ou b) a FISH identifica regiões de genes ribossomais não detectadas pela técnica de coloração pela prata, mostrando serem RONS inativas, como em peixes, anuros, morcegos ou roedores (Castro *et al.*, 2001; Suárez *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2002; Gallardo *et al.*, 2006).

Em *A. cursor*, porém, isso mostrou-se diferente, uma vez que no presente estudo, a FISH confirmou a presença da RON nos sítios 1pT e 1+3i de alguns indivíduos, mas ausência de RON nos mesmos sítios em outros indivíduos, além de em um dos indivíduos analisados a presença do gene ser confirmada somente em um dos cromossomos homólogos do par 1+3, mostrando que existe polimorfismo de presença gênica entre indivíduos e entre cromossomos homólogos nestes sítios (1pT e 1+3i).

Em nosso estudo, verificou-se também que a ausência ou presença do gene em determinado sítio é transmitida para prole, uma vez que o cruzamento 85 (**Anexo 9**), composto de parentais com gene no sítio 1+3i, e o parental macho com o sítio 1pT sem o gene, transmitiram tal característica ao indivíduo analisado com FISH da prole, onde foi verificado que este possuía o gene no sítio 1+3i, assim como os pais, e não possuía o gene no sítio 1pT, assim como seu parental macho, que o transmitiu.

O processo de formação do cromossomo 1+3 proposto por Fagundes *et al.* (1998) sugere a ocorrência de um complexo rearranjo cromossômico com inversão pericêntrica seguido de fusão cêntrica dos cromossomos 1S e 3S da carioforma com $2n=16$, formando o cromossomo metacêntrico grande 1+3M nas carioformas com $2n=14$ e 15 . Assim, o polimorfismo de presença

do gene ribossomal neste sítio (1+3i) poderia ser decorrente de uma perda do cistron ribossomal, se presente no telômero do braço curto do cromossomo 1 (1pT), durante o rearranjo cromossômico. Por outro lado, o polimorfismo de presença do gene também é observado no sítio 1pT, podendo assim não estar diretamente relacionada ao rearranjo na formação do cromossomo 1+3. Essa interpretação explica também as grandes diferenças encontradas na frequência de atividade do sítio 1+3i entre as populações, uma vez que o evento de origem do cromossomo 1+3, pode ter ocorrido com cromossomos 1 diferentes (com ou sem genes) em diferentes indivíduos.

O fato da ocorrência de polimorfismo de presença gênica ocorrer nos sítios 1pT e 1+3i pode explicar o porquê esses sítios mostram baixa frequência de atividade ribossomal na espécie, uma vez que a ausência gênica influencia além da atividade total, também na frequência de atividade destes sítios.

Assim, nossos dados novamente derrubam o consenso de que a técnica de coloração pelo nitrato de prata, proposta por Howell & Black (1980), evidencia sítios de RONS ativos na intérfase anterior, e conseqüentemente a não marcação pela prata em sítios conhecidos de RONS indica a inatividade do cistron, pois verificamos que a ausência de marcação de Ag-RON além da inatividade gênica pode referir-se à ausência gênica na posição esperada.

Nos sítios de maior atividade de RON na espécie (sítio 4qT e 5qT) porém, não foram identificados polimorfismos de presença do gene, uma vez que todos os indivíduos analisados mostraram marcações de FISH positivas, indicando presença do gene mesmo em indivíduos que mostraram baixa frequência de atividade nos mesmos. Esses dados indicam que a ausência de marcação pela prata nestes sítios refere-se à inatividade gênica, ou seja, polimorfismo de atividade.

Dados de polimorfismo de atividade de RON são comuns na literatura (Suzuki *et al.*, 1992; Zurita *et al.*, 1997; Lourenço *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2001; Cross *et al.*, 2003; Santi-Rampazzo *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2014) e corroboram Raska *et al.*, (2004), que afirma que cromossomos que apresentam forte marcação de FISH, nem sempre mostram um nível excepcional ou mesmo algum nível de atividade transcricional.

Dessa forma concluímos que a ausência de marcação de prata positivas em sítios de RON pode referir-se tanto a inatividade quanto a ausência gênica. Assume-se ainda que para a definição do padrão de atividade de genes ribossomais de uma espécie deve-se associar a análise pela impregnação de prata e FISH com sondas ribossomais, uma vez que existe polimorfismos de atividade e presença do gene, além de marcações inespecíficas pela prata, que podem levar a conclusões equivocadas.

Conservadorismo das frequências de marcação de Ag-RONs

A grande variação de frequência de marcação de Ag-RON por sítio observada entre indivíduos de *A. cursor* é normal para espécies com mais de um sítio cromossômico portador de RON por genoma, segundo Howell *et al.* (1975), mostrando que o número de sítios marcados pela prata varia de célula a célula em torno da moda que é normalmente menor que a média absoluta.

A maior frequência de atividade dos sítios 4qT e 5qT, em comparação aos demais, sugerem que sejam os principais sítios ativos da espécie. De acordo com Ventura *et al.*, (2009), que utilizou com pintura cromossômica em espécies do gênero *Akodon*, as regiões que correspondem as RONS nos sítios 4qT e 5qT em *A. cursor* são correspondentes as mesmas regiões que contém RONS em sua espécie irmã *Akodon montensis*, sendo ainda que nesta espécie, essas regiões são as RONS de maior frequência de atividade, indicando que a alta frequência de atividade destes sítios é característica proveniente de um ancestral comum das espécies.

Ainda, segundo Castro *et al.* (2001), um número constante de sítios de RON é observado em vertebrados, mas em alguns casos o padrão multicromossômico parece ser instável, envolvendo um par cromossômico com marcação de Ag-RON principal, presente em todos os indivíduos, e outros sítios muito variáveis.

Em nossa amostra, no entanto, são observados indivíduos cuja frequência de marcação de Ag-RON é muito baixa (abaixo de 10%), como nos indivíduos LGA 4930, 4916, 4934, 4759, 4884, 4882, 4521, 4967, 4922, 4764, 4888, 4743, 4925, todos oriundos de cruzamentos interpopulacionais.

Segundo Raska *et al.* (2002), em células diferenciadas, genes ribossomais podem exibir um nível muito baixo, ou mesmo, em algum momento, nenhum nível transcricional, apresentando um silenciamento governado que sob baixa estimulação rapidamente pode ser revertido. No entanto as células analisadas são células de medula, não totalmente diferenciadas. Porém de acordo com autores como Carpeta *et al.*, (2002) e González-Melendi *et al.*, (2001), em uma célula, com produção máxima de RNAr, somente cerca de 50% de seus genes ribossomais são ativamente transcritos, e ainda que em algumas plantas, apenas 5% de seus genes são ativos, indicando que apenas uma diminuta parte desses genes parece ser o suficiente para suprir as necessidades da célula.

Nossas análises mostraram que não existe conservadorismo intertecidual de atividade do gene ribossomal em *A. cursor*, podendo indicar que mecanismos de controle de atividade sejam independentes entre tecidos. Vários exemplos na literatura verificaram existência de diferenças de atividade entre tecidos em roedores, anuros e humanos respectivamente (Modi & Gamperl, 1989; Silva *et al.*, 1999; Reeves *et al.*, 1982; Warrington *et al.*, 2000; Hsiao *et al.*, 2001).

Um adendo vem desde a definição atual de genes *housekeeping*, considerados genes constitutivamente expressos nas células para manutenção das funções celulares (Butte *et al.*, 2001). Vários estudos têm identificado tais genes universalmente expressos em vários, se não

todos, tecidos corpóreos (Wang *et al.*, 2006; Goh *et al.*, 2007). Outros estudos, no entanto, têm identificado genes tecidos-seletivos (Liang *et al.*, 2006), que não deveriam ser considerados, segundo esse conceito como genes *housekeeping*.

Em estudo recente, Cheng-Wei *et al.* (2011) mostrou que genes responsáveis por funções fundamentais no processo biológico como a transcrição, processos de metabolismos de RNA, biogênese ribossomal, transporte molecular e ciclo celular são genes de expressão constitutiva em diferentes tecidos. Esses achados nos levam a questionar se uma expressão constitutiva seria relacionada também a uma semelhança na frequência de atividade gênica, uma vez que uma mínima fração dos genes ribossomais da célula pode estar ativa e mesmo assim suprir a necessidade celular.

O conservadorismo de atividade ribossomal entre os sexos em *Akodon cursor* soma-se a um estudo realizado em humanos por Mikelsaar (1977). Segundo Schmid *et al.* (1993) os polimorfismos de RON associados ao sexo são raros em vertebrados e todos os polimorfismos são associados ao cromossomo sexual X, tendo poucos exemplos como os anuros *Hyla femoralis* (Anderson, 1991), *Gastrotheca riobanae* (Schmid *et al.*, 1983, 1986), *Buergeria buergeri* (Schmid *et al.*, 1993) e no morcego *Carollia perscillata* (Goodpasture & Bloom, 1975). Como no presente estudo a marcação pela prata no cromossomo X não foi associada à atividade ribossomal, era esperado não observar diferenças entre os sexos na marcação do cromossomo X em *Akodon cursor*.

Ainda foi observado que não há diferença entre a frequência de marcação de Ag-RON e a morfologia do cromossomo 4, que variam de forma entre acrocêntrica e submetacêntrica, indicando que fatores que não as morfologias cromossômicas influenciem na atividade ribossomal. Ao mesmo tempo, também não foi identificada correlação da frequência de atividade entre pares cromossômicos, indicando que a atividade ribossomal em um par ocorre independente da atividade ribossomal de outro par. De acordo com Fagundes *et al.* (1997), o rearranjo que origina o heteromorfismo do par cromossômico 4 se deve a um evento de inversão pericêntrica envolvendo o braço curto, e uma vez que a RON está presente no telômero do braço longo deste cromossomo, o rearranjo que origina esse heteromorfismo não envolve a região de RON, explicando assim a não diferenciação de atividade dos mesmos.

Herança da frequência de atividade do gene ribossomal

Apesar da grande variação de frequência das Ag-RONs entre os indivíduos dentro das populações, foi verificado que cada população possui um padrão distinto de atividade dos genes ribossomais no sítio 4qT, capaz de diferenciá-las, assim como foi observado que o padrão de frequência do sítio 5qT é capaz de diferenciar a população da Bahia das demais, não diferenciando

a população do Espírito Santo e de São Paulo entre si. A não diferenciação do padrão de marcação de Ag-RON no sítio 1+3i entre as populações pode estar influenciada ao polimorfismo da presença do gene nesse sítio.

Variações populacionais na frequência de atividade das RONS são comuns na literatura, sendo encontradas em populações de moluscos, anfíbios, peixes e mamíferos (Anderson, 1991; Porter *et al.*, 1994; Olmo *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 1999; Woznicki, 2000; Castro *et al.*, 2001; Cross *et al.*, 2003; Nunes & Fagundes, 2008; Martínez *et al.*, 2009; Accioly *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 2014).

A similaridade das frequência de atividade entre os indivíduos das populações de São Paulo e Espírito Santo concorda com a proposta de Colombi *et al.* (2010) e Nogueira-Massariol (2016) de que as populações do clado sul (ES, RJ, SP e PR) tem maior proximidade genética entre si do que entre alguma população do norte (BA, PB, PE). Nogueira-Massariol (2016) sugeriu que a quebra geográfica entre os clados norte e sul ocorra na região do Vale do Jequitinhonha. De acordo com esta proposta é compatível encontrar maior diferenciação na frequência de atividade RON na população da Bahia, quando comparada à São Paulo e Espírito Santo, visto maior tempo de diversificação das linhagens que formam os clados norte e sul.

Dessa forma é possível concluir que a frequência de atividade ribossomal evidenciada pela prata pode ser um marcador populacional na espécie *Akodon cursor*.

O presente estudo verifica também a manutenção do padrão de frequência de atividade de RONS dentro de populações, o que era esperado, uma vez da ocorrência de diferentes padrões de atividade populacional, ele deve ser mantido e transmitido entre seus indivíduos. Porém não se sabe ainda qual é o processo de herança desse padrão de atividade.

Trabalhos anteriores indicaram que as atividades de marcações de Ag-RON possuíam um padrão de herança mendeliana em peixes, coelhos e humanos respectivamente (Castro *et al.*, 1998; Arruga & Monteagudo, 1989; e Mikelsaar *et al.*, 1977; Taylor & Martin-Delon, 1981; De Capoa *et al.*, 1991), mas trabalhos com frequência de atividade não são encontrados na literatura.

Em nosso estudo, quando comparadas as frequências de atividade das Ag-RONS entre indivíduos gerados a partir de duas populações com padrão de frequência de atividade gênica diferentes (Espírito Santo e Bahia), é observado uma manutenção da frequência de atividade de uma das populações, no presente caso a da população da Bahia, independente do parental proveniente da Bahia ser macho ou fêmea. Embora o padrão de frequência de atividade dos descendentes F_1 seja visualmente diferente da população natural do Espírito Santo e semelhante à da Bahia, os testes estatísticos não confirmam a diferença significativa. Porém é evidente que o n amostral reduzido no grupo F_1 aumenta os riscos de os resultados não refletirem o comportamento da população, influenciando na análise estatística. Esses dados mostram que o padrão de herança mendeliana não se aplica à frequência de atividade do gene ribossomal, uma

vez que em indivíduos interpopulacionais há manutenção do padrão de apenas uma das populações parentais.

Para híbridos interespecíficos, é amplamente discutido na literatura a ocorrência do fenômeno denominado dominância nucleolar, na qual a RON derivada de uma espécie parental é dominante sobre a outra. Esse mecanismo silencia os genes de DNAr pela transcrição dos genes de apenas um parental, com silenciamento total ou parcial dos genes do outro parental, resultante de modificações epigenéticas (Flavell, 1989, Lawrence *et al.*, 2004, Raska *et al.*, 2004; Tucker *et al.*, 2010). Sabe-se ainda, que para algumas plantas híbridas a RON da mesma espécie é sempre silenciada, independente dos efeitos paternos ou maternos, sugerindo que diferenças fundamentais ditam os sítios de DNAr dominantes e reprimidos em um híbrido, provavelmente devido às diferenças espécie-específicas nos sistemas de transcrição dos parentais (Pikaard, 2000b, 2002).

Nossos dados, não foram realizados com híbridos interespecíficos, assim como nos trabalhos que mostram dominância nucleolar, mas com indivíduos gerados a partir de duas populações com diferentes frequências de atividade ribossomal por sítio de RON. Ainda que não realizada com híbridos, foi observado que a atividade ribossomal destes indivíduos não se diferencia de uma das populações parentais enquanto difere da outra população parental, semelhante às características observadas em trabalhos com descrição de dominância nucleolar. Mesmo assim nossos dados não mostram uma dominância completa de ativação dos sítios ribossomais provenientes de apenas um dos parentais sob o outro, fato observado quando analisa-se tais indivíduos com par 4 heteromórfico, ou seja, um dos cromossomos do par com uma determinada morfologia proveniente de um parental e o outro cromossomo de morfologia diferente de outro parental, nesses casos observa-se atividade em ambos os sítios, indicando que a atividade não é devido a ativação apenas dos genes de um dos parentais. Esse fato mostra que a dominância nucleolar não é o processo que promove a semelhança de atividade ribossomal com as das populações parentais, mas que algum processo semelhante guie a manutenção do padrão de frequência de ativação desses genes.

No entanto ainda, quando cada cruzamento foi analisado separadamente, notou-se uma contradição com as leis de herança genética, nas quais as características dos parentais não são herdadas pela prole, ou ainda a prole apresenta características não presentes nos parentais, em 4 dos 28 cruzamentos analisados. Esses dados podem evidenciar uma falha amostral, tendo sido analisadas poucas células dos indivíduos cujas frequências de atividades seriam muito baixas, explicando-se assim a contradição de herança observada, ou ainda que existe uma reconfiguração do padrão de frequência de atividade entre parentais e prole, porém neste caso, nossos dados ainda são inconclusivos.

Nos últimos 15 anos muitos estudos têm mostrado que o controle transcricional do gene ribossomal é realizado através do ajuste do número de genes a serem transcritos via

remodelamento da cromatina (Jasencakova, 2003; Pikaard, 2000b, 2002; Raska *et al.* 2004; Pikaard 2010), regulado por mecanismos epigenéticos como metilação de DNA e modificações histônicas (Grummt & Pikaard, 2003; Lawrence & Pikaard, 2004; McStay 2006; Grummt 2007; Bonasora *et al.* 2013). É consenso também que o estado epigenético pode ser herdado por gerações subsequentes, mas que pode ser revertido à estados alternativos de atividade gênica entre gerações não explicados por mudanças na sequência gênica (Preuss & Pikaard. 2007; McStay & Grummt, 2008), mas à estados de necessidades celulares que dependem do estado fisiológico e fatores ambientais externos da célula (Pikaard, 2000b; Weider *et al.* 2005).

De acordo com esses dados, pode-se considerar que a atividade ribossomal transmitida entre gerações em *Akodon cursor* pode ser associada a um controle epigenético, herdável na maioria dos casos analisados, mas que pode sofrer alterações quando durante o processo de transmissão devido a fatores intrínsecos à atividade ribossomal necessária à célula.

CONCLUSÃO

Diante dos dados apresentados concluímos que:

1. A ausência de marcação pela prata em sítios conhecidamente portadores de RON pode indicar inatividade gênica nos sítios 1pT, 1+3i, 4qT e 5qT, uma vez quando a FISH confirma a presença do gene, e ainda pode indicar ausência gênica, especificamente nos sítios 1pT e 1+3i, uma vez que em alguns indivíduos não foi identificada a presença do gene pela FISH.
2. Não foram observadas marcações de FISH nos sítios 6pT, XpT de nenhum indivíduo analisado, indicando ausência do gene ribossomal, o que indica que a marcação pela prata nesses sítios não está associada à atividade do gene ribossomal. Esses sítios são regiões de heterocromatina.
3. A técnica de coloração pela prata, sozinha, é ineficaz em indicar presença de genes ribossomais, sendo necessária para caracterização dos sítios ribossomais de uma espécie o uso conjunto da técnica de hibridação *in situ* fluorescente com sondas ribossomais;
4. Não existe conservadorismo intertecidual, entre baço e medula, do padrão de frequência de marcação de Ag-RON em *A. cursor*;
5. Não existe diferença do padrão de atividade ribossomal entre sexos na espécie;
6. A frequência de marcação de Ag-RON, nos sítios 4qT e 5qT, é um bom marcador populacional em *A. cursor*, conseguindo diferenciar as populações da Bahia, Espírito Santo e São Paulo e ainda mostrar proximidade da história evolutiva entre as mesmas;
7. Existe herança do padrão de frequência de atividade ribossomal dos descendentes em relação aos parentais, quando ambos parentais são da mesma população;
8. A herança da frequência de atividade ribossomal não segue um padrão mendeliano, uma vez que a prole de cruzamentos entre indivíduos de populações distintas parece sofrer um controle de dominância da frequência de atividade de uma das populações parentais;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, I.V.; BERTOLLO, L.A.C.; COSTA, G.W.W.F.; JACOBINA, U.P.; MOLINA, W.F. Chromosomal population structuring in carangids (Peciformes) between the north-eastern and south-eastern coasts of Brazil. *African Journal of Marine Science*, 34, 3, 383-389, 2012.

ANANIAS, F.; BOMBEIRO, A.L.; DA SILVA, C.D.B.; SILVA, A.P.Z.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Cytogenetics of *Eupemphix nattereri* Steindachner, 1863 (Anura: Leiuperidae) and karyotypic similarity with species of related genera: taxonomic implications. *Acta Zoologica Sinica*, 53, 285-293, 2007.

ANDERSON, K. Chromosome evolution in holarctic *Hyla* treefrog. In: D. M. Green & S. Session (eds) *Amphibian cytogenetics and evolution*. Academic Press San Diego – p. 200-231, 1991.

ANDRADE, L.M. Arquitetura da cromatina na região organizadora do nucléolo e o seu papel no controle da expressão dos genes ribossomais. Dissertação. Mestrado em Ciências – Genética e Melhoramento de plantas, Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Piracicaba, 2011.

ARSLAN, A., ZIMA, J., YORULMAZ, T., COZUTOK, S. & TOYRAN, K. Chromosome banding pattern in at dormouse and bank vole (Mammalia: Rodentia) from Turkey. *Folia Biologica (Krokow)*, 61, 1, 47-51, 2013.

ARRUGA, M.V. & MONTEAGUDO, L.V. Evidence of Mendelian inheritance of the nucleolar organizer regions in the Spanish common rabbit. *The Journal of Heredity*, 80.1, 85-86, 1989.

BORN, G.G. & BERTOLLO, L.A.C. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Research*, 8, 111-118, 2000.

BONASORA, M.G.; POGGIO, L.; GREIZERSTEIN, E.J. Cytogenetics studies in four cultivated *Amaranthus* (Amaranthaceae) species. *Comparative Cytogenetics*, 7, 1, 53-61, 2013.

BUTTE, A.J.; DZAU, V.J.; GLUECK, S.B. Further defining housekeeping, or “maintenance”, genes Focus on “ A compendium of gene expression in normal human tissues”. *Physiology Genomics*, 7, 95-96, 2001.

CARPETA, A.D.; NEVES, N.; MORAIS-CECÍLIO, L.; MALHO, R.; VIEGAS, W. Genome restructuring in rye affects the expression, organization and disposition of homologous rDNA loci. *Journal of Cell Science*, 115, 2839-2846, 2002.

CARVALHO, A., POLANCO, C., BRITO, J.L., GUEDES-PINTO, H. Differential rRNA genes expression in hexaploid wheat related to NOR methylation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 28, 403-412, 2010.

- CARVALHO, A.H., LOPES, M.O.G. & SVARTMAN, M. A new karyotype for *Rhipidomys* (Rodentia, Cricetidae) from Southeastern Brasil. *Cytogenetics*, 6, 3, 227-237, 2012.
- CARVALHO, R.A. & DIAS, A.L. Interindividual size heteromorfism of NOR and chromosomal location of 5S rRNA genes in *Iheringichthys labrosus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50, 1, 141-146, 2007.
- CASTRO, J., SÁNCHEZ, L. & MARTÍNÉZ, P. Analysis of the inheritance of NOR size variants in Brown Trout (*Salmo trutta*). *The Journal of Heredity*, 89, 3, 264-266, 1998.
- CASTRO, J., RODRÍGUEZ, S., PARDO, B.G., SÁNCHEZ, L. & MARTÍNEZ, P. Population analysis of an unusual NOR-site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity*, 86, 291-302, 2001.
- COLOMBI, V.H.; LOPES, S.R. & FAGUNDES, V. Testing the Rio Doce as a riverine barrier in shaping the Atlantic rainforest population divergence in the rodent *Akodon cursor*. *Genetics and Molecular Biology*, 33, 4, 785-789, 2010.
- CHANG, C-W., CHENG, W-C., CHEN, C-R., SHU, W-T., TSAI, M-L., et al. Identification of human housekeeping genes and tissue-selective genes by microarray meta-analysis. *Plos One*, 6-7, 1-10, 2011.
- CROSS, I.; VEGA, L.; REBORDINOS, L. Nucleolar organizer regions in *Crassostrea angulata*: chromosomal location and polymorphism. *Genetica*, 119, 65-74, 2003.
- DE CAPOA, A., ALEIXANDRE, C., FELLI, M.P. Inheritance of ribosomal gene activity and level of DNA methylation in individual gene clusters in a three generation Family. *Human Genetics*, 88, 146-152, 1991.
- DOBIGNY, G., NOMAO, A., GAUTUN, J.C. A cytotaxonomic survey of rodents from Niger: implications for systematics, biodiversity and biogeography. *Mammalia*, 66, 495-523, 2002.
- DUNDR, M., MISTELI, T., OLSON, M.O. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *The journal of Cell Biology*, 150, 3, 433-446, 2000.
- EISENBERG E., LEVANON, E.Y. Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*. 29(10),569–74, 2013.
- FAGUNDES, v., VIANNA-MORGANTE, A.M. & YONENAGA-YASSUDA, Y. Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of a polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent *Akodon cursor* (2n= 14, 15 and 16). *Chromosome Research*, 5, 228-232, 1997.
- FAGUNDES, V., CHRISTOFF, A.U. & YONENAGA-YASSUDA, Y. Extraordinary chromosomal polymorphism with 28 different karyotypes in the neotropical species *Akodon cursor* (Muridae, Sigmodontinae), one of the smallest diploid number in rodents (2n = 16, 15 and 14). *Hereditas*, 129, 263-274, 1998.

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

OLIVEIRA, C., FORESTI, F., RIGOLINO, M.G. & TABATA, Y.A. Paracentric inversion involving a NOR-bearing chromosome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): electron microscopy studies of the synaptonemal complex. Caryologia, 49, 335-342, 1996.

FORESTI, F.P., OLIVEIRA, C., GOMES, E.A., TABATA, Y.A., RIGOLINO, M.G. & FORESTI, F. A lethal effect associated with polymorphism of the NOR-bearing chromosomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Genetics and Molecular Biology, 27, 51-54, 2004.

FUJIWARA, A., ABE, S., YAMAHA, E., YAMAZAKI, F. & YOSHIDA, M.C. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. Chromosome Research, 6, 463-471, 1998.

FLAVELL, R.B. Variation in structure and expression of ribosomal DNA loci in wheat. Plant Molecular Genetics, 31, 963-968, 1989.

GALLARDO, M.H., GONZÁLEZ, C.A., CEBRIÁN, I. Molecular cytogenetics and allotetraploidy in the red vizcacha rat, *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia, Octodontidae). Genomics, 88, 214-221, 2006.

GAZZONI, T. Marcadores citológicos no cariótipo de espécies de *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) analisado com técnicas de citogenética clássica e molecular. 2011. 101f. Dissertação (Mestrado em ciências Biológicas) – Instituto de Biociências – Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – São Paulo, 2011.

GONZÁLEZ-MELENDEZ, P.; WELLS, B.; BEVEN, A.; SHAW, J. Single ribosomal transcription units are linear, compacted Christmas trees in plant nucleoli. Plant Journal, 27, 223-233, 2001.

GORNUNG, E. Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the Teleosts: A review of research. Cytogenetic and Genome Research. 141, 90-102, 2013.

GOH, K.I.; CUSICK, M.E.; VALLE, D.; CHILDS, B.; VIDAL, M. *ET AL.* The human disease network. Proc Natl Acad Sci USA, 104, 8685-8690, 2007.

GOODPASTURE C., BLOOM, S.E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma, 53, 37-50, 1975.

GREWAL, S.I.S. & ELGIN, S.C.R. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance. Genetics & Development, 12, 178-187, 2002.

GROMICHO, M., OZOUF-COSTAZ, C., COLLARES-PEREIRA, M.J. Lack of correspondence between CMA3-, Ag-positive signals and 28S r DNA loci in two Iberian minnows (Teleostei, Cyprinidae) evidenced by sequential banding. Cytogenetic and Genome Research, 109, 507-511, 2005.

GRUMMT, I.; PIKAARD, C.S. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 641-649, 2003.

GRUMMT, I. Different epigenetics layers engage in complex xrosstalk to define the epigenetic state of mammalian rRNA genes. *Hum. Mol. Genet.*, 16, 21-27, 2007.

HEITZ, E. Das heterochromatin der Moose. *Jehrb Wiss Botanik*, 69, 762-818, 1928.

HESLOP-HARRISON, J.S. RNA, genes and chromosome: repetitive DNA sequences in plants. *Chromosome Today*, Switzeland, 13, 45-56, 2000b.

HSIAO, L.-L., DANGOND, F., YOSHIDA, T., *et al.* (23 co-authors). A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol. Genomics*, 7, 97-104, 2001.

HOWELL, W.M., DENTON, T.E., DIAMOND, J.R. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia*, 31, 260-262, 1975.

HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protevative coloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36, 1014-1015, 1980.

IDRIS, I., MOIN, S. Somatic chromosomes of the Bornean Sambar deer and *Rusa* deer interspecific hybrids. *American Journal of Applied Sciences*, 6, 862-868, 2009.

JASENCAKOVA, Z.; SOPPE, W.J.J.; MEISTER, A.; GERNAND, D.; TURNER, B.M.; SCHUBERT, I. Histone modifications in *Arabidopsis*: high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *The plant Journal*, Oxford, 33, 471-480, 2003.

KASAHARA, S., SILVA, A.P.Z., HADDAD, C.F.B. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 19, 237-242, 1996.

KUCHTA-GLADYSZ, M., OTWINOWSKA-MINDUR, A., NIEDBALA, P., SZELESZCZUK, O., GLOWACKA, J. Preliminary investigation on the variation of the nucleolar organizer region in the breeding chinchilla karyotype. *Med. Weter*, 72, 373-377, 2016.

LAWRENCE, R.J.; EARLEY, K.; PONTES, O.; SILVA, M.; CHEN, Z.; NEVES, N.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C.S.A. Concerted DNA methylation/Histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Molecular Cell*, Cambridge, 13, 599-609, 2004.

LEAL-MESQUITA, E.R., YONENAGA-YASSUDA, Y., CHU, T.H. & ROCHA, P.L.B. Chromosomal characterization and comparative cytogenetic analysis of two species of *Proechimys* (Echimyidae, Rodentia) from the Caatinga domain of the State of Bahia, Brazil. *Caryologia*, 45, 2, 197-212, 1992.

LOURENÇO, L.B., RECCO-PIMENTEL, S.M. & CARDOSO, A.J. Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura,

Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. Chromosome Research, 6, 621-628, 1998.

MANDUCA, E.G.; LIMA, C.B., DERGAM, J.A. Análise citogenética em *Akodon cursor* (Rodentia: Sigmodontinae) no estado de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MARKOVIC, V.D., WORTON, R.G., BERG, J.M. Evidence for the inheritance of silver-stained nucleolus organizer regions. Human Genetics, 41, 181-187, 1978.

MARGARIDO, V.P. & GALETTI JÚNIO, P.M. Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). Genetics and Molecular Biology, 23, 3, 569-573, 2000.

MARTINÉZ-EXPÓSITO, M.J., PASANTES, J.J., MÉNDEZ, J. NOR activity in larval and juvenile mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.). Journal of experimental marine biology and ecology, 175, 155-165, 1994.

MIKELSAAR, A.V., SCHWARZACHER, H.G., SCHNEDL, W., WAGENBICHLER, P. Inheritance of Ag-stainability of nucleolus organizer regions: investigation in 7 families with trisomy 21. Human Genetic, 38, 183-188, 1977b.

MILHOMEM, S.S.R.; SCACCHETTI, P.C.; PIECZARKA, J.C.; FERGUSON-SMITH, M.A.; PANSINATO-ALVES, J.C.; O'BRIEN, P.C.M., FORESTI, F.; NAGAMACHI, C.Y. Are NORs always located on homeologous chromosomes? A FISH investigation with rDNA and whole chromosome probes in *Gymnotus* fishes (Gymnotiformes). Plos one, 8, 2, 1-6, 2013.

MODI, W.S. & GAMPERL, R. Chromosomal banding comparisons among American and European Red-backed mice, genus *Clethrionomys*. Z. Saugetierkunde, 54, 141-152, 1989.

MCSTAY, B. Nucleolar dominance: a model for rRNA gene silencing. Genes Desenvolviment. 20, 1207-1214, 2006.

MCSTAY, B.; GRUMMT, I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. The annual review of cell and developmental biology. 24, 131-157, 2008.

NOGUEIRA-MASSARIOL, C.D. DE A. Especiação em *Akodon cursor* (WINGE, 1887): Uma abordagem multidisciplinar. 2016. 206f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade do Espírito Santo, 2016.

NUNES, R.R.A., & FAGUNDES, V. Cariótipos de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hyalinae e Phyllomedusinae (anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. Mus. Biol. Mello Leitão, 23, 21-36, 2008a.

NUNES, R.R.A. & FAGUNDES, V. Patterns of ribosomal DNA distribution in hylid frogs from the *Hypsiboas faber* and *H. Semilineatus* groups. Genetics and Molecular Biology, 31, 4, 982-987, 2008b.

OLMO, E., ODIERNA, G., CAPRIGLIONE, T. The karyology of Mediterranean lacertid lizards. In: E. D. Valakos, W Bohme, V. Perez-mellado & P. Maragou (eds), Lacertids of the

mediterranean region: A biological approach. Hellenic Zoological Society, Athens, p. 61-84, 1993.

PATHAK, S. & HSU, T.C. Silver-stained structures in mammalian meiotic prophase. *Chromosoma*, 70, 2, 195-203, 1979.

PELLEGRINO, K.C.M., ROGRIGUES, M.T. & YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forest: banding patterns and FISH of telomeric sequences. *Hereditas*, 131, 15-21, 1999.

PENDÁS, A.M., MORÁN, P., GARCIA-VÁSQUEZ, G. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenetic Cell Genetic*, 63, 128-130, 1993.

PESSÔA, L.M.; CORRÊA, M.M.O.; OLIVEIRA, J.A. & LOPES, M.O.G. Karyological and morphometric variation in the genus *Thrichomys* (Rodentia: Echimyidae). *Mammalian Biology*, 4, 258-269, 2004.

PIKAARD, C.S. The epigenetic of nucleolar dominance. *Trends in genetics*, London, 16, 495-500, 2000b.

PIKAARD, C.S. Transcription and tyranny in the nucleolus: the organization, activation, dominance and repression of ribosomal RNA genes. *The Arabidopsis Book*, Rockville, 1-24, 2002.

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

PORTER, C.A., HAIDUK, M.-W., QUEIROZ, K. Evolution and phylogenetic significance of ribosomal gene location in chromosomes of squamate reptiles. *Copeia*, 302-315, 1994.

PREUSS, S.; PIKAARD, C.S. rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. *Biochimica et Biophysica Acta*, 383-392, 2007.

RASKA, I., KOBERNA, K., MALLINSKY, J., FIDLEROVA, H., MASATA, M. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol. Cell*, 96, 579-594, 2004.

REEVES, B.R., CASEY, G., HARRIS, H. Variations in the activity of nucleolar organizers in different tissues, demonstrated by silver staining of human normal and leukemic cells. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 6, 3, 223-230, 1982.

SÁNCHEZ, A., BURGOS, M., JIMÉNEZ, R. & DÍAZ DE LA GUARDIA, R. Quantitative analysis of silver staining of the nucleolar organizer regions in *Eliomys quercinus*. *Genome*, 32, 978-982, 1989.

SÁNCHEZ, A., JIMÉNEZ, R., BURGOS, M., STITOU, S., ZURITA, F., DÍASZ DE LA GUARDIA, R. Cytogenetic peculiarities in the Algerian hedgehog: silver stains not only NORs but also heterochromatic blocks. *Heredity*, 75, 10-16, 1995.

SANTOS, N.; FAGUNDES, V.; YONENAGA-YASSUDA, Y. & SOUZA, M.J. Localization of rRNA genes in Phyllostomidae bats reveals silent NORs in *Artibeus cinereus*. *Hereditas*, 136, 137-143, 2002.

SANTOS, A.R., RUBERT, M., GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A.L. Sympatric occurrence of four cytotypes and one extra chromosome in *Bryconamericus ecai* (Characidae): 18S rDNA polymorphism and heterochromatin composition. *Hereditas*, 149, 24-33, 2012.

SANTI-RAMPAZZO, A.P., NISHIYAMA, P.B., FERREIRA, P.E.B. & MARTINS-SANTOS, I.C. Intrapopulacional polymorphism of nucleolus organizer regions in *Serrapinnus notomelas* (Characidae, Cheirodontinae) from the Paraná River. *Journal of Fish Biology*, 72, 1236-1243, 2008.

SILVA, A.P.Z., HADDAD, C.F. & KASAHARA, S. Nucleolar organizer regions in *physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. *Hereditas*, 131, 135-141, 1999.

SILVA, A.P.Z., HADDAD, C.F.B., GALASSI, G.G., KASAHARA, S. Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* based on cytogenetic and molecular analyses. *Genetica* 127, 35-44, 2006.

SINGH, M., KUMAR, R., NAGPURE, N.S., KUSHWAHA, B., MANI, I. & LAKRA, W.S. Extensive NOR site polymorphism in geographically isolated populations of Golden mahseer, *Tor putitora*. *Genome*, 52, 783-789, 2009.

SUZUKI, H.; SAKURAI, S.; NISHIMURA, M.; KOMINAMI, R.; MORIWAKI, K. Compensatory changes in silver-stainability of nucleolar organizer regions in mice. *Japan Journal Genetics*, 67, 217-232, 1992.

SUZUKI, T., OBARA, Y., TSUCHIYA, K., OSHIDA, T. & IWASA, M.A. Ag-NORs analysis in three species of red-backed voles, with a consideration of generic allocation of Anderson's red-backed vole. *BioOne*, 39,2, 91-97, 2014.

SHE, X., ROHL, C.A., CASTLE, J.C., KULKARNI, A.V., JOHNSON, J.M. & CHEN, R. Definition, conservation and epigenetics of housekeeping and tissue-enriched genes. *BMC genomics*, 10, 269, 2009.

SCHMID, M., HAAF, T., GEILLE, B., SIMS, S. Chromosome banding in Amphibia. VIII. An unusual XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotrisca riobambae* (Anura, Hylidae). *Chromosoma*, 88, 69-82, 1983.

SCHMID, M., SIMS, S.H., HAAF, T., MACGREGOR, H. C. Chromosome banding in Amphibia. X. 18S and 28S ribosomal genes, nucleolus organizers and nucleoli in *Gastrothaca riobambae*. Chromosoma, 94, 139-145, 1986.

SCHMID, M., OTHA, S., STEINLEIN, C., GUTTENBACH, M. Chromosome banding in Amphibia. XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosome in *Buergeria buergeri* (Anura, Rhacophoridae). Cytogenetics Cell Genetics, 62, 238-246, 1993.

SCHWARZACHER, H.G.; MIKELSAAR, A.V. & SCHNEDL, W. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. Cytogenetic Cell Genetics, 20, 24-39, 1978.

TAYLOR, E.F. & MARTIN-DELEON, P.A. Familial silver staining patterns of human nucleolus organizer regions (NORs). American Society of Human Genetics, 33, 67-76, 1981.

TUCKER, S.; VITINS, A.; PIKAARD, C.S. Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. Current Opinion in cell biology, 22, 3, 351-356, 2010.

UTSUNOMIA, R., SILVA, D.M.Z.A., RUIZ-RUANO, F.J., ARAYA-JAIME, C., PANSONATO-ALVES, J.C., SCACCHETTI, P.C., HASHIMOTO, D.T., OLIVEIRA, C., TRIFONOV, V.A., PORTO-FORESTI, F., CAMACHO, J.P.M., FORESTI, F. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). Plos One, March, 2, 2016.

VENU, G. Studies on silver staining of chromosomes of caecilians (Amphibia:Gymnophiona) of Western Ghats of India. International Journal of Advanced Research, 2,3, 63-72, 2014.

VENTURA, K., SILVA, M.J.J., FAGUNDES, V., PARDINI, R., YONENAGA-YASSUDA, Y., An undescribed karyotype for *Thaptomys* (2n=50) and the mechanism of differentiation from *Thaptomys nigrita* (2n=52) evidenced by FISH and Ag-NORs. Caryologia, 57, 1, 89-97, 2004.

WANG, T.Z.; XU, M.; ZHOU, X. CHEN, T. *ET AL.*, Further understanding human disease genes by comparing with housekeeping genes and other genes. BMC Genomics, 7, 31, 2006.

WARRINGTON, J.A., NAIR, A., MAHADEVAPPA, M., TSYGANSKAYA, M. Comparison of human adult and fetal expression. and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. Physiological genomics, 2, 3, 143-147, 2000.

WATSON, J. D., HOPKINS, N. H., ROBERTS, J. W., STEITZ, J. A. and WEINER, A. M. Molecular biology of the gene, 1, 704, 1965.

WEIDER, L.J.; ELSE, J.J.; CREASE, T.J.; MATEOS, M.; COTNER, J.B.; MARKOW, T.A. The functional significance of ribosomal (r) DNA variation: impacts on the evolutionary ecology of organisms. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 36, 219-242, 2005.

WOZNICKI, P., SANCHEZ, L., MARTINEZ, P., PARDO, B.G. & JANKUN, M. A population analyses of the structure and variability of NOR in *Salmo trutta* Ag, CMA3 and ISH. *Genetica*, 108, 113-118, 2000.

YONENAGA-YASSUDA, Y., ASSIS, M.F.L., KASAHARA, S., ABBATE, M.L. & SOUZA, M.J. Nucleolar organizer regions in *Akodon arviculoides* (Cricetidae, Rodentia): evidence for the activity of rDNA genes in both X chromosomes of females. *Cytogenetic Cell Genetic*, 35, 143-147, 1983.

YONENAGA-YASSUDA, Y., DE ASSIS, M.F.L. & KASAHARA, S. Variability of the nucleolus organizer regions and the presence of the rDNA genes in the supernumerary chromosome of *Akodon aff. Arviculoides* (Cricetidae, Rodentia). *Caryologia*, 45, 163-174, 1992.

ZURITA, F.; SÁNCHEZ, A.; BURGOS, M.; JIMÉNEZ, R.; LA GUARDIA, R.D. Interchromosomal, intercelular and interindividual variability of NORs studied with silver staining and *in situ* hybridization. *Heredity*, 78, 229-234, 1997.

ANEXO 1

Dados de espécimes de *Akodon cursor* analisados. Os estados são listados em letras maiúsculas em negrito, seguidos pelo número total de indivíduos por estado (em negrito, em parênteses), localidades específicas, município e número de indivíduos, em negrito e itálico, latitude e longitude (em parênteses), número de identificação do espécime e em parênteses, sexo (F ou M), 2n e NF, e referência e número de indivíduos por localidade (entre parênteses).

Acrônimos: BIO e CIT (Laboratório de Citogenética de Vertebrados - USP, SP), LGA (Laboratório de Genética Animal – UFES, ES)

SÃO PAULO (n=22) - 1. Parque Estadual Intervales – Iporanga, n= 4 (-47.63, -24.12): BIO835 (M, 14, 19), BIO845 (M, 14, 19), BIO856 (F, 14, 19), BIO857 (F, 14, 19). **2. Parque Estadual Intervales – Sete Barras, n= 18** (-47.85, -24.38): BIO 615 (M, 14, 19), BIO619 (F, 14, 20), BIO621 (F, 15, 21), BIO622 (F, 15, 20), BIO818 (M, 14, 19), BIO819 (F, 14, 19), BIO820 (M, 14, 20), BIO822 (F, 14, 18), BIO824 (M, 14, 19), CIT10 (F, 14, 19), CIT13 (M, 14, 19), CIT19 (F, 14, 19), CIT20 (F, 14, 19), CIT39 (M, 14, 20), CIT47 (F, 15, 21), CIT71 (M, 14, 19), CIT95 (M, 14, 19), CIT113 (M, 14, 19).

ESPÍRITO SANTO (n=16) – 3. Valsugana Velha – Santa Teresa, n= 2 (-40.56, -19.96): LGA37 (F, 14, 18), LGA38 (F, 14, 20). **4. Estação Biológica Santa Lúcia - Santa Teresa, n= 3** (-40.58, -19.93): LGA42 (F, 14, 20), LGA159 (F, 14, 18), LGA2339 (F, 14, 19). **5. Domingos Martins, n=5** (-40.65, -20.34): LGA 4401 (M, 14, 18), LGA4452 (F, 14, 19), LGA325 (M, 14, 19), LGA327 (M, 14, 18), LGA328 (F, 14, 19), LGA1759 (F, 14, 21), LGA962 (M, 14, 19). **6. Castelo, n=3** (-41.18, -20.61): LGA 934 (M, 14, 20), LGA935 (M, 14, 19), LGA936 (F, 14, 20).

BAHIA (n=24) – 7. PRRN Nova Angélica – Una, n= 13 (-39.07, -15.25): LGA 4028 (M, 14, 21), LGA4021 (M, 14, 20), LGA4351 (F, 13, 22), LGA4339 (M, 14, 19), LGA4024 (F, 14, 20), LGA4352 (F, 14, 21), LGA4337 (M, 14, 21), LGA4338 (M, 15, 22), LGA4030 (F, 14, 21), LGA4648 (M, 15, 22), LGA4033 (M, 14, 20), LGA4026 (M, 14, 21), LGA4358 (M, 15, 22). **8. REBIO Una – Una, n=11** (-39.07, -15.30): CIT1023 (M, 16, 25), CIT1020 (F, 16, 25), CIT1022 (F, 16, 25), CIT934 (F, 15, 24), CIT933 (M, 14, 20), CIT930 (M, 16, 26), CIT929 (M, 15, 21), CIT883 (M, 16, 25), CIT881 (F, 16, 24), CIT879 (M, 15, 22), CIT878 (M, 16, 24).

PERNAMBUCO (n=3) – 9. Rio Formoso, n= 1 (-35,18, - 8,71): CIT 953 (M, 16, 26). **10. APA Aldeia – Camaragibe, n= 3** (34, 98, -7,94): LGA 4975 (M, 16, 26), LGA4971 (F, 16, 26), LGA4981 (M, 16, 25).

CRUZAMENTOS INTRAPOPULACIONAIS

UNA x UNA (n=34): LGA 4241 (M, 14, 21), LGA4584 (F, 13, 19), LGA4078 (M, 14, 20), LGA4215 (M, 15, 21), LGA4079 (F, 14, 21), LGA4083 (M, 15, 23), LGA4238 (F, 14, 21), LGA4076 (M, 14, 19), LGA4583 (F, 13, 19), LGA4266 (M, 14, 20), LGA4265 (F, 14, 20), LGA4284 (F, 14, 21), LGA4277 (M, 14, 22), LGA4269 (F, 14, 20), LGA4406 (F, 14, 19), LGA4279 (F, 14, 21), LGA4268 (F, 14, 20), LGA4408 (F, 14, 21), LGA4624 (F, 14, 20), LGA4511 (M, 14, 19), LGA4473 (F, 14, 19), LGA4474 (F, 15, 23), LGA4880 (M, 14, 19), LGA4625 (F, 14, 19), LGA4901 (F, 15, 22), LGA4902 (M, 15, 22), LGA4832 (M, 14, 20), LGA4604 (M, 14, 20), LGA4962 (F, 15, 21), LGA4965 (M, 15, 23), LGA4964 (F, 16, 24), LGA4966 (F, 16, 24), LGA4963 (F, 15, 20), LGA4751 (F, 14, 20), LGA4084 (F, 15, 22), LGA4271 (M, 15, 21), LGA4270 (M, 14, 19), LGA4276 (F, 14, 22).

DOMINGOS MARTINS x DOMINGOS MARTINS (n=9): LGA 4775 (F, 14, 20), LGA4784 (M, 14, 19), LGA4444 (M, 14, 19), LGA4652 (F, 14, 18), LGA4734 (F, 14, 18), LGA4780 (M, 14, 18), LGA4849 (F, 14, 18), LGA4651 (M, 14, 18), LGA4610 (M, 14, 19).

CRUZAMENTOS INTERPOPULACIONAIS

UNA x DOMINGOS MARTINS (n=47): LGA 4431 (M, 14, 18), LGA4433 (F, 14, 19), LGA4432 (F, 14, 19), LGA4429 (M, 14, 18), LGA4417 (F, 14, 20), LGA4613 (F, 14, 19), LGA4418 (M, 14, 20), LGA4618 (F, 14, 19), LGA4619 (M, 14, 20), LGA4519 (M, 14, 18), LGA4746 (F, 14, 18), LGA4744 (M, 14, 20), LGA4932 (F, 14, 19), LGA4748 (M, 14, 18), LGA4621 (M, 14, 21), LGA4520 (M, 14, 20), LGA4517 (F, 14, 18), LGA4747 (M, 14, 19), LGA4931 (F, 14, 18), LGA4915 (F, 14, 19), LGA4881 (F, 14, 21), LGA4527 (F, 14, 21), LGA4620 (M, 14, 19), LGA4271 (M, 15, 21), LGA4916 (F, 14, 19), LGA4518 (F, 14, 19), LGA4816 (F, 14, 19), LGA4818 (M, 14, 18), LGA4526 (M, 14, 21), LGA4885 (M, 14, 19), LGA4632 (M, 14, 21), LGA4887 (F, 14, 18), LGA4617 (M, 14, 19), LGA4928 (F, 15, 23), LGA4927 (M, 15, 23), LGA4885 (M, 14, 20), LGA4817 (F, 14, 20), LGA4764 (F, 14, 21), LGA4763 (F, 14, 21), LGA4789 (M, 14, 19), LGA4796 (F, 14, 19), LGA4774 (F, 14, 20), LGA4768 (M, 14, 19), LGA4768 (M, 14, 19), LGA4762 (F, 14, 20), LGA4788 (F, 14, 19), LGA4798 (M, 14, 20).

ANEXO 2

Protocolo de obtenção e coloração de cromossomos mitóticos

Medula e baço - Os cromossomos mitóticos foram obtidos pelo método *in vivo* descrito por FAGUNDES et al. (1998), utilizando-se solução de colchicina 0,1%, na proporção de 1mL para 100 gramas de peso do animal. Esta solução foi injetada intraperitonealmente no animal vivo, que foi colocado em descanso, por um período de 48 horas. Após esse tempo, o animal foi anestesiado, sacrificado e as células foram extraídas do tecido pela injeção de solução de Hanks com seringa de 1 ml. Posteriormente foi realizada centrifugação e retirada da solução, o material foi diluído com solução hipotônica de cloreto de potássio (KCL) 0,075M, e colocado em banho-maria a 37°C por 40 minutos para hipotonização celular. Após este período à solução foram adicionadas 7 gotas de fixador Carnoy (metanol 3:1 ácido acético), sendo homogeneizada delicadamente e permanecendo em temperatura ambiente por 5 minutos. Passado esse tempo à solução foi acrescentada mais fixador Carnoy até que esta completasse o volume de 10 mL e deixada descascar por mais 10 minutos, período denominado pré-fixação. Após o período de pré-fixação, a solução foi centrifugada e o sobrenadante desprezado. Posteriormente foram adicionados 7ml de fixador e a solução foi ressuspensa por movimentos de pipetagem e centrifugada por 7 minutos a 1200 rpm. O procedimento de ressuspensão e centrifugação foi repetido mais duas vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi diluído. O material foi pingado de altura em lâminas e deixado secar em temperatura ambiente.

Ag-*RON* - A marcação das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-*RON*) foi realizada segundo protocolo de HOWELL e BLACK (1980), com modificações. Após hidrólise em solução de HCL 1N a 60°C, durante 7 minutos, a lâmina foi lavada com água destilada e seca à temperatura ambiente. Em câmara úmida à 60°C, sobre a lâmina pingou-se uma gota de solução coloidal reveladora 30%, e duas gotas de nitrato de prata a 50 %. O material foi coberto com lamínula e incubado por cerca de três a quatro minutos. Após, a lâmina era lavada e seca em temperatura ambiente.

Protocolo de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas ribossomais

A sonda 18S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de peixe usando os *primers* 18S6F (5' – CTCTTTCGAGGCCCTGTAAT – 3') e 18S6R (5' – CAGCTTTGCAACCATACTCC – 3'') (Utsunomia *et al.*, 2016). Esta sonda foi marcada com digoxigenina-11-dUTP (Roche) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche). Os parâmetros para marcação foram: 31µL de água Mili-Q, 5µL de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5 µL de MgCl₂ (25mM), 1µL de dATP, dCTP

e dGTP e 0,7 µL de dTTP (2mM cada), 0,8 µL de digoxigenina-11-dUTP, 1µL de cada primer (10mM), 0,5 µL de Taq polimerase (5U/µL) e 2µL de DNA molde. Total da reação: 50 µL.

O perfil de termociclagem constituiu-se de 2 minutos para desnaturação inicial a 94°C, 35 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 95°C, 45 segundos de anelamentos a 54°C e 1 minuto e 30 segundos de extensão a 72°C, seguidos por um passo de extensão final de 5 minutos a 72°C.

O mapeamento das sondas de DNAr 18S em cromossomos metafásicos foi realizado de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com modificações conforme descrito abaixo:

As lâminas foram lavadas em PBS 1x por 5 minutos à temperatura ambiente e desidratadas em série alcóolica a 70%, 85% e 100% por 5 minutos em cada banho. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com solução de RNase (100µg/mL) por uma hora em câmara úmida a 37°C, lavadas 2 vezes em 2xSSC por 10 minutos e uma vez em PBS 1x por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram tratadas com pepsina 0,005%/HCl 10 mM por 10 minutos a 37°C, lavadas em PBS 1x à temperatura ambiente por 5 minutos e fixadas com formaldeído 1%/PBS 1x/MgCl₂ 50 mM por 10 minutos a temperatura ambiente. Depois de fixadas, as lâminas foram lavadas em PBS 1x por 5 minutos e desidratadas em série alcoólica. Simultaneamente à denaturação das lâminas, desnaturou-se a solução de hibridação (10% sulfato dextrano, 50% formamida e 20xSSC e água) contendo 3 µL de sonda marcada por 10 minutos a 100°C. Posteriormente, 15 µL de solução de hibridação foram colocados sobre a lâmina, que foi coberta com lamínula e mantida em câmara úmida a 37°C *overnight*.

Após a hibridação as lâminas foram lavadas 2 vezes em solução de formamida 15%/0,2xSSC a 42°C por 10 minutos cada. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em solução de 0,1xSSC a 60°C por 5 minutos cada e uma vez em solução de Tween 0,5%/4xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos. Após as lavagens as lâminas foram incubadas em solução de bloqueio (leite em pó, 20xSSC e água) por 15 minutos e lavadas em Tween 0,5%/4xSSC a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 30 µL de solução de bloqueio com anticorpo (24 µL de solução de bloqueio e 6 µL de antidigoxi-rodamina) por meia hora em câmara úmida e escura a 37°C. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes em Tween 0,5%/4xSSC por 5 minutos, desidratadas em série alcóolica, secas e cobertas com 22 µL de Vectashield Mounting Medium com DAPI (Vector). As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens metafásicas, capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics). Para cada indivíduo, no mínimo 10 células foram analisadas para confirmação dos resultados da FISH e foram estimados número e localização dos genes por célula.

ANEXO 3

Relação de cariótipos observados nos espécimes coletados na natureza utilizados neste estudo, com referência da localidade amostral. Em ordem: Carioforma, número diploide (2n), número autossômico (NA), morfologia dos pares cromossômicos, número de indivíduos com a carioforma correspondente para cada localidade (n), Localidade amostral com referência ao **Anexo 1**.

Carioforma	2n	NA	Pares cromossômicos									n	Localidade ¹
			1 e 3	1 /1+3 /3	1+3	2	4	5	6	7	Sexual		
1	13	22	-	-	M	S	M	M	A	N	X0	1	7
2	14	18	-	-	M	A	A	M	A	N	XX; XY	2	5
												1	3
												1	4
												1	2
3	14	19	-	-	M	H	A	M	A	N	XX; XY	1	7
												2	1
												2	5
												1	4
4	14	19	-	-	M	A	H	M	A	N	XX; XY	10	2
												2	1
												1	6
												2	5
5	14	19	-	-	M	A	M	M	A	N	XY	2	2
6	14	19	-	-	M	A	A	M	A	N	XY	1	2
7	14	20	-	-	M	H	H	M	A	N	XX; XY	1	3
												1	4
												2	7
												1	8
												2	6
												1	2
8	14	20	-	-	M	A	M	M	A	N	XY	1	7
												1	2
9	14	21	-	-	M	H	M	M	A	N	XX; XY	4	7
												1	5
10	14	21	-	-	M	A	M	M	H	N	XY	1	7
11	15	20	-	S/M/S	-	A	A	M	A	N	XX	2	2
12	15	21	-	S/M/S	-	A	H	M	A	N	XX; XY	1	2
												1	7
13	15	22	-	S/M/S	-	H	H	M	A	N	XY	2	7
14	15	21	-	S/M/S	-	S	H	M	A	N	XX	1	8
15	15	22	-	S/M/S	-	S	M	M	A	N	XY	2	8
16	16	24	S/S	-	-	A	M	M	A	N	XY	1	8
17	16	26	S/S	-	-	S	M	M	A	N	XX; XY	1	8
												2	10
												1	9
18	16	25	S/S	-	-	S	H	M	A	N	XX; XY	1	8
												1	10
19	16	24	S/S	-	-	H	H	M	A	N	XX	1	8
20	16	25	S/S	-	-	H	M	M	A	N	XX	3	8

¹ Conforme Anexo 1

ANEXO 4

Relação de espécimes utilizados na comparação entre as frequências de marcação de Ag-RON por sítio cromossômico entre os tecidos Baço e Medula. Em ordem: Número de tombo (Espécime), localidade amostral (ES – Espírito Santo; BA – Bahia; SP – São Paulo; C BAxBA – Cruzamentos entre ind. da Bahia; C ESxES – Cruzamentos entre ind. do Espírito Santo, sexo, número diploide (2N), número autossômico (NA), tecido analisado e frequência de marcação pela prata por sítio de RON.

Espécimes	Localidade	Sexo	2n	NA	Baço				Medula			
					1pT	1+3i	4qT	5qT	1pT	1+3i	4qT	5qT
LGA 4028	BA	M	14	21	*	0.000	0.287	0.413	*	0.000	0.275	0.100
LGA 4351	BA	F	13	22	*	0.125	0.875	0.850	*	0.350	0.975	0.850
LGA 4339	BA	M	14	19	*	0.125	0.725	0.875	*	0.150	0.775	0.900
LGA 4024	BA	F	14	20	*	0.000	0.087	0.075	*	0.025	0.900	0.775
LGA 4401	ES	M	14	18	*	0.025	0.300	0.475	*	0.000	0.725	0.900
LGA 4849	ES	F	14	18	*	0.000	0.950	0.525	*	0.025	1.000	0.850
LGA 4452	ES	F	14	19	*	0.012	0.800	0.900	*	0.100	1.000	0.975
BIO 615	SP	M	14	19	*	0.100	0.900	0.875	*	0.175	0.925	0.825
BIO 820	SP	M	14	20	*	0.200	0.525	0.600	*	0.190	0.643	0.857
BIO 824	SP	M	14	19	*	0.150	0.725	1.000	*	0.275	0.750	1.000
BIO 856	SP	F	14	19	*	0.000	0.789	0.947	*	0.175	0.850	1.000
CIT 10	SP	F	14	19	*	0.000	0.650	1.000	*	0.000	0.625	1.000
CIT 13	SP	M	14	19	*	0.425	0.975	0.950	*	0.475	0.900	1.000
CIT 19	SP	F	14	19	*	0.000	1.000	1.000	*	0.000	1.000	1.000
CIT 39	SP	M	14	20	*	0.000	0.975	0.950	*	0.150	0.975	0.975
LGA 4215	C BAxBA	M	15	21	0.950	0.000	0.425	0.550	0.850	0.200	0.450	0.775
LGA 4079	C BAxBA	F	14	21	*	0.000	0.525	0.600	*	0.000	0.875	0.825
LGA 4083	C BAxBA	M	15	23	0.400	0.000	0.100	0.075	0.700	0.000	0.525	0.400
LGA 4238	C BAxBA	F	14	21	*	0.050	0.400	0.600	*	0.075	0.875	0.750
LGA 4406	C BAxBA	F	14	19	*	0.000	0.775	0.950	*	0.000	0.675	0.950
LGA 4784	C ESxES	M	14	19	*	0.000	0.875	0.900	*	0.000	0.975	1.000

ANEXO 5

Relação dos espécimes utilizados na comparação das frequências de marcação de Ag-RON por sítio cromossômico entre populações. Em ordem: Número de tombo (Espécime), População (ES – Espírito Santo; BA – Bahia; SP – São Paulo), sexo, número diploide (2N), número autossômico (NA) e frequência de marcação de Ag-RON por sítio cromossômico.

Espécimes	População	Sexo	2N	NA	Sítios cromossômicos			
					1pT	1+3i	4qT	5qT
LGA 4028	BA	M	14	21	*	0.000	0.287	0.413
LGA 4021	BA	M	14	20	*	0.017	0.470	0.559
LGA 4351	BA	F	13	22	*	0.125	0.875	0.850
LGA 4339	BA	M	14	19	*	0.125	0.725	0.875
LGA 4026	BA	M	14	21	*	0.025	0.050	0.050
LGA 4024	BA	F	14	20	*	0.000	0.212	0.150
LGA 4352	BA	F	14	21	*	0.175	0.375	0.000
LGA 4337	BA	M	14	21	*	0.000	0.200	0.175
LGA 4338	BA	M	15	22	0.014	0.000	0.022	0.086
LGA 4030	BA	F	14	21	*	0.020	0.140	0.320
LGA 4648	BA	F	15	22	0.350	0.000	0.125	0.125
LGA 4033	BA	M	14	20	*	0.000	0.467	0.350
LGA 4358	BA	M	15	22	0.150	0.000	0.016	0.042
CIT 878	BA	M	16	24	0.425	0.000	0.225	0.475
CIT 879	BA	M	15	22	0.000	0.430	0.475	0.300
CIT 881	BA	F	16	24	0.523	0.000	0.545	0.568
CIT 883	BA	M	16	25	0.325	0.000	0.350	0.525
CIT 929	BA	M	15	21	0.000	0.000	0.000	0.233
CIT 930	BA	M	16	26	0.275	0.000	0.425	0.550
CIT 933	BA	M	14	20	*	0.025	0.825	1.000
CIT 934	BA	F	15	24	0.000	0.250	0.225	0.925
CIT 1020	BA	F	16	25	0.600	0.000	0.450	0.325
CIT 1022	BA	F	16	25	0.150	0.000	0.325	0.775
CIT 1023	BA	M	16	25	0.500	0.000	0.464	0.321
LGA 4401	ES	F	14	21	*	0.025	0.300	0.475
LGA 4452	ES	F	14	20	*	0.012	0.800	0.900
LGA 0037	ES	M	14	18	*	0.050	0.775	0.925
LGA 0038	ES	F	14	19	*	0.000	0.950	0.400
LGA 0042	ES	F	14	18	*	0.000	0.475	0.800
LGA 0159	ES	F	14	20	*	0.150	0.450	1.000
LGA 1759	ES	M	14	20	*	0.000	0.675	0.475
LGA 0936	ES	M	14	20	*	0.000	0.375	0.700
LGA 2339	ES	M	14	18	*	0.005	0.475	0.875
LGA 0962	ES	F	14	19	*	0.000	0.600	0.925
LGA 0934	ES	F	14	19	*	0.002	0.875	0.700
LGA 0935	ES	M	14	19	*	0.000	0.800	0.725

LGA 0325	ES	F	14	20	*	0.000	0.475	0.800
LGA 0327	ES	F	14	18	*	0.150	0.450	1.000
LGA 0328	ES	M	14	19	*	0.000	0.875	0.525
BIO 615	SP	M	14	19	*	0.100	0.900	0.875
BIO 619	SP	F	14	20	*	0.000	1.000	0.825
BIO 621	SP	F	15	21	0	0.000	0.690	0.820
BIO 622	SP	F	15	20	0.000	0.000	0.977	0.613
BIO 818	SP	M	14	19	*	0.130	0.891	1.000
BIO 819	SP	F	14	19	*	0.000	0.475	0.825
BIO 820	SP	M	14	20	*	0.200	0.525	0.600
BIO 822	SP	F	14	18	*	0.068	0.864	0.818
BIO 824	SP	M	14	19	*	0.150	0.725	1.000
BIO 835	SP	M	14	19	*	0.050	0.725	0.975
BIO 845	SP	M	14	19	*	0.000	0.950	0.875
BIO 856	SP	F	14	19	*	0.000	0.789	0.947
BIO 857	SP	F	14	19	*	0.125	0.854	1.000
CIT 10	SP	F	14	19	*	0.000	0.650	1.000
CIT 13	SP	M	14	19	*	0.425	0.975	0.950
CIT 19	SP	F	14	19	*	0.000	1.000	1.000
CIT 20	SP	F	14	19	*	0.300	0.860	0.840
CIT 39	SP	M	14	10	*	0.000	0.975	0.950
CIT 47	SP	F	15	21	0.000	0.380	0.850	1.000
CIT 71	SP	M	14	19	*	0.000	1.000	0.500
CIT 95	SP	M	14	19	*	0.225	0.975	0.750
CIT 113	SP	M	14	19	*	0.350	0.950	0.675

ANEXO 6

Relação dos espécimes utilizados na comparação das frequências de marcação de Ag-RON por sítio entre indivíduos coletados na natureza e gerados em cruzamentos intrapopulacionais e interpopulacionais. Em ordem: Número de tombo (Espécime), Procedência (ES – Espírito Santo; F1 ES – Cruzamento entre indivíduos do Espírito Santo; BA – Bahia; F BA – Cruzamentos entre ind. da Bahia; F BAxES – Cruzamentos entre ind. da Bahia e Espírito Santo), frequência de marcação de Ag-RON por sítio cromossômico.

Espécime	Procedência	Frequência de marcação de Ag-RON por sítio			
		1pT	1+3i	4qT	5qT
LGA 4401	ES	*	0.025	0.3	0.475
LGA 4452	ES	*	0.012	0.8	0.9
LGA 37	ES	*	0.05	0.775	0.925
LGA 38	ES	*	0	0.95	0.4
LGA 42	ES	*	0	0.475	0.8
LGA 159	ES	*	0.15	0.45	1
LGA 1759	ES	*	0	0.675	0.475
LGA 0936	ES	*	0	0.375	0.7
LGA 2339	ES	*	0.005	0.475	0.875
LGA 0962	ES	*	0	0.6	0.925
LGA 0934	ES	*	0.002	0.875	0.7
LGA 0935	ES	*	0	0.8	0.725
LGA 325	ES	*	0	0.475	0.8
LGA 327	ES	*	0.15	0.45	1
LGA 328	ES	*	0	0.875	0.525
LGA 4028	BA	*	0.000	0.287	0.413
LGA 4021	BA	*	0.017	0.470	0.559
LGA 4351	BA	*	0.125	0.875	0.850
LGA 4339	BA	*	0.125	0.725	0.875
LGA 4026	BA	*	0.025	0.150	0.250
LGA 4024	BA	*	0.000	0.212	0.150
LGA 4352	BA	*	0.175	0.375	0.300
LGA 4337	BA	*	0.000	0.200	0.175
LGA 4338	BA	0.014	0.000	0.222	0.286
LGA 4030	BA	*	0.020	0.140	0.320
LGA 4648	BA	0.350	0.000	0.225	0.225
LGA 4033	BA	*	0.000	0.467	0.350
LGA 4358	BA	0.150	0.000	0.216	0.342
CIT 878	BA	0.425	0.000	0.225	0.475
CIT 879	BA	0.000	0.850	0.475	0.300
CIT 881	BA	0.523	0.000	0.545	0.568
CIT 883	BA	0.325	0.000	0.350	0.525
CIT 929	BA	0.000	0.000	0.000	0.233
CIT 930	BA	0.275	0.000	0.425	0.550
CIT 933	BA	*	0.025	0.825	1.000
CIT 934	BA	0.000	0.500	0.225	0.925
CIT 1020	BA	0.600	0.000	0.450	0.325
CIT 1022	BA	0.150	0.000	0.325	0.775
CIT 1023	BA	0.500	0.000	0.464	0.321
LGA 4775	F1 ES	*	0.05	0.925	0.15
LGA 4784	F1 ES	*	0	0.875	0.9
LGA 4444	F1 ES	*	0	0.65	0.5
LGA 4652	F1 ES	*	0	0.413	0.587
LGA 4734	F1 ES	*	0.05	0.8	0.9

LGA 4780	F1 ES	*	0	0.725	0.95
LGA 4849	F1 ES	*	0	0.95	0.525
LGA 4651	F1 ES	*	0	0.525	0.462
LGA 4610	F1 ES	*	0	0.225	0.225
LGA 4079	F1 BA	*	0.000	0.525	0.600
LGA 4078	F1 BA	*	0.250	0.750	0.625
LGA 4584	F1 BA	*	0.025	0.250	0.025
LGA 4583	F1 BA	*	0.125	0.225	0.150
LGA 4269	F1 BA	*	0.450	0.700	0.950
LGA 4624	F1 BA	*	0.125	0.275	0.500
LGA 4625	F1 BA	*	0.050	0.225	0.275
LGA 4268	F1 BA	*	0.050	0.375	0.475
LGA 4832	F1 BA	*	0.000	0.500	0.575
LGA 4279	F1 BA	*	0.000	0.137	0.175
LGA 4473	F1 BA	*	0.175	0.725	0.950
LGA 4474	F1 BA	0.000	0.200	0.550	0.450
LGA 4238	F1 BA	*	0.050	0.400	0.600
LGA 4241	F1 BA	*	0.000	0.375	0.875
LGA 4270	F1 BA	*	0.000	0.450	0.625
LGA 4406	F1 BA	*	0.000	0.775	0.950
LGA 4901	F1 BA	0.200	0.000	0.125	0.200
LGA 4962	F1 BA	0.800	0.050	0.700	0.475
LGA 4965	F1 BA	0.150	0.000	0.125	0.150
LGA 4964	F1 BA	0.15	*	0.150	0.275
LGA 4966	F1 BA	0.025	*	0.050	0.100
LGA 4963	F1 BA	0.200	0.000	0.100	0.275
LGA 4266	F1 BA	*	0.050	0.150	0.200
LGA 4265	F1 BA	*	0.750	0.100	0.225
LGA 4276	F1 BA	*	0.000	0.040	0.030
LGA 4511	F1 BA	*	0.000	0.125	0.150
LGA 4271	F1 BA	0.050	0.000	0.000	0.100
LGA 4270	F1 BA	*	0.000	0.450	0.625
LGA 4276	F1 BA	*	0.000	0.040	0.030
LGA 4431	F1 BAxES	*	0.000	0.150	0.500
LGA 4433	F1 BAxES	*	0.000	0.050	0.100
LGA 4432	F1 BAxES	*	0.000	0.163	0.238
LGA 4429	F1 BAxES	*	0.000	1.000	0.950
LGA 4417	F1 BAxES	*	0.000	0.850	0.625
LGA 4613	F1 BAxES	*	0.000	0.161	0.338
LGA 4418	F1 BAxES	*	0.025	0.125	0.125
LGA 4606	F2 BAxES	*	0.025	0.150	0.350
LGA 4618	F2 BAxES	*	0.000	0.650	0.975
LGA 4619	F2 BAxES	*	0.000	0.950	1.000
LGA 4519	F2 BAxES	*	0.000	0.050	0.325
LGA 4746	F2 BAxES	*	0.000	0.275	0.575
LGA 4744	F2 BAxES	*	0.000	0.525	0.725
LGA 4932	F2 BAxES	*	0.000	0.200	0.175
LGA 4748	F2 BAxES	*	0.000	0.025	0.125
LGA 4930	F2 BAxES	*	0.000	0.025	0.050
LGA 4621	F2 BAxES	*	0.000	0.050	0.150
LGA 4934	F2 BAxES	*	0.000	0.013	0.025
LGA 4520	F2 BAxES	*	0.025	0.125	0.150
LGA 4517	F2 BAxES	*	0.000	0.425	0.375
LGA 4747	F2 BAxES	*	0.000	0.075	0.150
LGA 4931	F2 BAxES	*	0.000	0.125	0.125
LGA 4915	F2 BAxES	*	0.100	0.600	0.900
LGA 4881	F2 BAxES	*	0.125	0.775	0.725
LGA 4882	F2 BAxES	*	0.000	0.000	0.025

LGA 4527	F2 BA _x ES	*	0.000	0.100	0.050
LGA 4620	F2 BA _x ES	*	0.000	0.514	0.529
LGA 4743	F2 BA _x ES	*	0.000	0.050	0.000
LGA 4271	F2 BA _x ES	0.050	0.000	0.000	0.100
LGA 4916	F2 BA _x ES	*	0.000	0.075	0.050
LGA 4518	F2 BA _x ES	*	0.000	0.075	0.100
LGA 4523	F3 BA _x ES	*	0.025	0.243	0.228
LGA 4816	F3 BA _x ES	*	0.000	0.200	0.525
LGA 4818	F3 BA _x ES	*	0.000	0.150	0.425
LGA 4526	F3 BA _x ES	*	0.000	0.100	0.500
LGA 4885	F3 BA _x ES	*	0.000	0.100	0.175
LGA 4632	F3 BA _x ES	*	0.050	0.725	0.825
LGA 4887	F3 BA _x ES	*	0.000	0.475	0.875
LGA 4617	F3 BA _x ES	*	0.000	0.200	0.100
LGA 4884	F3 BA _x ES	*	0.000	0.013	0.013
LGA 4521	F3 BA _x ES	*	0.000	0.000	0.025
LGA 4929	F3 BA _x ES	*	0.000	0.075	0.150
LGA 4928	F3 BA _x ES	0.000	0.000	0.050	0.250
LGA 4927	F3 BA _x ES	0.050	0.050	0.450	0.375
LGA 4885	F3 BA _x ES	*	0.000	0.400	0.575
LGA 4888	F3 BA _x ES	*	0.000	0.025	0.000
LGA 4817	F3 BA _x ES	*	0.000	0.475	0.900

ANEXO 7

Relação dos espécimes utilizados na comparação das frequências de marcação de Ag-RON por par cromossômico entre sexos envolvendo indivíduos coletados na natureza (Bahia) e provenientes de cruzamentos entre indivíduos da Bahia. Em ordem: Número de tombo (Espécime), Procedência (BA – Bahia; F BA – Cruzamentos entre ind. da Bahia) e frequência de marcação de Ag-RON por sítio cromossômico.

Espécime	Procedência	Sexo	Frequência de Marcação de Ag-RON por sítio			
			1pT	1+3i	4qT	5qT
LGA 4028	BA	M	*	0.000	0.287	0.413
LGA 4021	BA	M	*	0.017	0.470	0.559
LGA 4351	BA	F	*	0.125	0.875	0.850
LGA 4339	BA	M	*	0.125	0.725	0.875
LGA 4026	BA	M	*	0.025	0.050	0.050
LGA 4024	BA	F	*	0.000	0.212	0.150
LGA 4352	BA	F	*	0.175	0.375	0.000
LGA 4337	BA	M	*	0.000	0.200	0.175
LGA 4338	BA	M	0.014	0.000	0.022	0.086
LGA 4030	BA	F	*	0.020	0.140	0.320
LGA 4648	BA	F	0.350	0.000	0.125	0.125
LGA 4033	BA	M	*	0.000	0.467	0.350
LGA 4358	BA	M	0.150	0.000	0.016	0.042
CIT 878	BA	M	0.425	0.000	0.225	0.475
CIT 879	BA	M	0.000	0.430	0.475	0.300
CIT 881	BA	F	0.523	0.000	0.545	0.568
CIT 883	BA	F	0.325	0.000	0.350	0.525
CIT 929	BA	M	0.000	0.000	0.000	0.233
CIT 930	BA	M	0.275	0.000	0.425	0.550
CIT 933	BA	M	*	0.025	0.825	1.000
CIT 934	BA	F	0.000	0.250	0.225	0.925
CIT 1020	BA	F	0.600	0.000	0.450	0.325
CIT 1022	BA	F	0.150	0.000	0.325	0.775
CIT 1023	BA	M	0.500	0.000	0.464	0.321
LGA 4079	F1 BA	F	*	0.000	0.525	0.600
LGA 4078	F1 BA	M	*	0.250	0.750	0.625
LGA 4584	F1 BA	F	*	0.025	0.250	0.025
LGA 4583	F1 BA	F	*	0.125	0.225	0.150
LGA 4269	F2 BA	F	*	0.450	0.700	0.950
LGA 4624	F3 BA	F	*	0.125	0.275	0.500
LGA 4625	F3 BA	F	*	0.050	0.225	0.275
LGA 4268	F2 BA	F	*	0.050	0.375	0.475
LGA 4832	F3 BA	M	*	0.000	0.500	0.575
LGA 4279	F2 BA	F	*	0.000	0.137	0.175
LGA 4473	F3 BA	F	*	0.175	0.725	0.950
LGA 4474	F3 BA	F	0.000	0.200	0.550	0.450
LGA 4238	F1 BA	F	*	0.050	0.400	0.600
LGA 4241	F1 BA	M	*	0.000	0.375	0.875
LGA 4270	F2 BA	M	*	0.000	0.450	0.625
LGA 4406	F2 BA	F	*	0.000	0.775	0.950
LGA 4901	F3 BA	F	0.200	0.000	0.125	0.200
LGA 4962	F4 BA	F	0.800	0.050	0.700	0.475
LGA 4965	F5 BA	M	0.150	0.000	0.125	0.150
LGA 4964	F5 BA	F	0.15	*	0.150	0.275
LGA 4966	F5 BA	F	0.025	*	0.050	0.100
LGA 4963	F5 BA	F	0.200	0.000	0.100	0.275

LGA 4266	F1 BA	M	*	0.050	0.150	0.200
LGA 4265	F1 BA	F	*	0.750	0.100	0.225
LGA 4276	F2 BA	F	*	0.000	0.040	0.030
LGA 4511	F3 BA	M	*	0.000	0.125	0.150
LGA 4271	F2 BA	M	0.050	0.000	0.000	0.100
LGA 4270	F2 BA	M	*	0.000	0.450	0.625
LGA 4276	F2 BA	F	*	0.000	0.040	0.030

ANEXO 8

Relação dos espécimes utilizados na comparação das frequências de marcação de Ag-RON por morfologia cromossômica do par 4. Em ordem: Número de tombo (Espécime), Procedência (BA – Bahia; F BA – Cruzamentos entre ind. da Bahia; ES – Espírito Santo; F BAxES – cruzamentos entre indivíduos da Bahia e Espírito Santo) e frequência de marcação de Ag-RON por sítio e morfologia do par 4.

Espécime	Procedência	Frequência de marcação de Ag-RON por sítio e morfologia cromossômica					
		1pT	1+3i	4qT	4A	4M	5qT
LGA 4024	BA	*	0.000	0.212	0.175	0.250	0.150
LGA 4338	BA	0.014	0.000	0.222	0.357	0.100	0.286
LGA 4648	BA	0.350	0.000	0.225	0.100	0.350	0.225
LGA 4033	BA	*	0.000	0.467	0.000	0.930	0.350
LGA 4358	BA	0.150	0.000	0.216	0.334	0.100	0.342
CIT 881	BA	0.523	0.000	0.545	0.409	0.681	0.568
CIT 883	BA	0.325	0.000	0.350	0.050	0.650	0.525
CIT 929	BA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.233
CIT 933	BA	*	0.025	0.825	0.950	0.700	1.000
LGA 4624	F3 BA	*	0.125	0.275	0.250	0.300	0.500
LGA 4625	F3 BA	*	0.050	0.225	0.250	0.200	0.275
LGA 4473	F3 BA	*	0.175	0.725	0.700	0.750	0.950
LGA 4474	F3 BA	0.000	0.200	0.550	0.400	0.700	0.450
LGA 4270	F2 BA	*	0.000	0.450	0.650	0.250	0.625
LGA 4406	F2 BA	*	0.000	0.775	0.900	0.650	0.950
LGA 4901	F3 BA	0.200	0.000	0.125	0.100	0.150	0.200
LGA 4965	F5 UU	0.150	0.000	0.125	0.150	0.100	0.150
LGA 4511	F3 BA	*	0.000	0.125	0.100	0.150	0.150
LGA 4271	F2 BA	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100
LGA 4270	F2 BA	*	0.000	0.450	0.650	0.250	0.625
LGA 38	ES	*	0.000	0.950	0.930	0.930	0.400
LGA 42	ES	*	0.000	0.475	0.200	0.480	0.800
LGA 0935	ES	*	0.000	0.800	0.750	0.880	0.725
LGA 325	ES	*	0.000	0.475	0.750	0.880	0.800
LGA 328	ES	*	0.000	0.875	0.280	0.400	0.525
BIO 615	SP	*	0.100	0.900	0.800	0.900	0.875
BIO 619	SP	*	0.000	1.000	1.000	1.000	0.825
BIO 818	SP	*	0.130	0.891	0.850	0.830	1.000
BIO 819	SP	*	0.000	0.475	0.230	0.400	0.825
BIO 824	SP	*	0.150	0.725	0.450	0.730	1.000
BIO 835	SP	*	0.050	0.725	0.660	0.320	0.975
CIT 10	SP	*	0.000	0.650	0.300	0.650	1.000
CIT 13	SP	*	0.425	0.975	0.950	0.980	0.950
CIT 19	SP	*	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000
CIT 20	SP	*	0.300	0.860	0.720	0.860	0.840
CIT 47	SP	0.000	0.750	0.850	0.700	0.850	1.000
CIT 95	SP	*	0.225	0.975	0.950	0.980	0.750
CIT 113	SP	*	0.350	0.950	0.930	0.530	0.675
LGA 4433	F1 BAxES	*	0.000	0.050	0.100	0.000	0.100
LGA 4618	F1 BAxES	*	0.000	0.650	0.950	0.650	0.975
LGA 4620	F1 BAxES	*	0.000	0.514	0.714	0.314	0.529
LGA 4523	F1 BAxES	*	0.025	0.243	1.000	0.950	0.228
LGA 4796	F2 BAxES	*	0.000	0.500	0.250	0.750	0.875
LGA 4798	F2 BAxES	*	0.000	0.200	0.050	0.350	0.200
LGA 4817	F1 BAxES	*	0.000	0.475	0.450	0.500	0.900

LGA 4885	F1 BA _x ES	*	0.000	0.400	0.200	0.000	0.575
LGA 4888	F1 BA _x ES	*	0.000	0.025	0.025	0.000	0.000
LGA 4932	F1 BA _x ES	*	0.000	0.200	0.250	0.150	0.175
LGA 4930	F1 BA _x ES	*	0.000	0.025	0.000	0.050	0.050
LGA 4934	F1 BA _x ES	*	0.000	0.013	0.000	0.025	0.025
LGA 4759	F2 BA _x ES	*	0.000	0.025	0.000	0.025	0.050
LGA 4520	F1 BA _x ES	*	0.025	0.125	0.100	0.150	0.150
LGA 4763	F2 BA _x ES	*	0.000	0.075	0.450	0.750	0.250
LGA 4764	F2 BA _x ES	*	0.025	0.075	0.000	0.150	0.025
LGA 4882	F1 BA _x ES	*	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025
LGA 4925	F2 BA _x ES	*	0.025	0.000	0.000	0.000	0.025
LGA 4929	F1 BA _x ES	*	0.000	0.075	0.050	0.100	0.150
LGA 4928	F1 BA _x ES	0.000	0.000	0.050	0.050	0.050	0.250
LGA 4927	F1 BA _x ES	0.050	0.050	0.450	0.800	0.100	0.375

ANEXO 9

Heredogramas de cruzamentos intrapopulacionais com descrição da frequência de marcação de Ag-RON por sítio cromossômico de cada indivíduo. Caracteres em azul identificam indivíduos da população do Espírito Santo, em rosa identificam indivíduos da população da Bahia.

