



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

THAYS DUARTE DE OLIVEIRA

**EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Ctenomys***

PORTO ALEGRE  
2022

THAYS DUARTE DE OLIVEIRA

**EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Ctenomys***

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Animal.

Área de concentração: Biologia Comparada

Orientador: Prof. Dr. Thales R. O. de Freitas

PORTO ALEGRE

2022

THAYS DUARTE DE OLIVEIRA

**EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Ctenomys***

Aprovada em 14 de julho de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Maríndia Deprá  
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

---

Dr. Ricardo José Gunski  
(Universidade Federal do Pampa)

---

Dr. Anderson José Baia Gomes  
(Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará)

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Genética, Laboratório de Citogenética e Evolução, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), contando como auxílio financeiro de:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

“É necessário sempre acreditar que o  
sonho é possível  
Que o céu é o limite e você, truta, é  
imbatível”

A vida é desafio - Racionais MC's

“Ao infinito... E além!”

Buzz Lightyear em Toy Story – Um Mundo  
de Aventuras

Dedico este trabalho à minha mãe,  
Rosária, pelo incentivo para realizar e  
concluir mais essa etapa. E ao meu pai,  
Wanclei, por ter sonhado isto comigo e,  
infelizmente, não conseguir ver a  
realização deste sonho.

## AGRADECIMENTOS

Aqui encerro mais um ciclo, e inúmeras pessoas contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste, gostaria de agradecer a todas.

Agradeço ao Thales, pela orientação, por ter acreditado na minha capacidade e me ensinado tanto sobre os tuco-tucos. Pela calma, paciência e incentivo durante estes quase cinco anos.

À professora Vera e à professora Maríndia, desde o primeiro dia em que pisei na UFRGS me receberam super bem e me abriram as portas do Laboratório de *Drosophila*, obrigada por toda ajuda e conhecimento transmitido sobre os cromossomos e as sequências repetitivas.

À Natasha, a melhor dupla que eu poderia ter escolhido na graduação, obrigada por não me deixar desistir da ideia de começar este doutorado. Além disso, por toda a ajuda em todo o processo, mas principalmente, em terminar os experimentos durante a pandemia. Obrigada pela parceria e amizade.

Aos amigos que fiz aqui durante o doutorado, Ane, Henrique, Mayara e Carol, por terem tornado os dias mais leves e engraçados.

Ao Lu pelos cafés, pipocas e toda ajuda necessária no laboratório, sem você teria sido bem mais complicado.

À Lucia pela ajuda com a burocracia dos projetos no CEUA.

À todos colegas que passaram pelo Laboratório de Citogenética e Evolução da UFRGS, obrigada pelos momentos de *brainstormings*, pelas risadas e pelas festinhas do laboratório.

Aos colegas do Laboratório de *Drosophila*, obrigada por sempre me receberem muito bem e fazer com que me sentisse parte do grupo.

À todos os meus coautores por suas contribuições aos artigos, em especial ao Rafael, por toda ajuda nos experimento de FISH. Ao professor Edivaldo por ceder o seu laboratório para realização de alguns experimentos. Ao professor Marcelo Cioffi pelas sondas microssatélites e por deixar o artigo “redondinho” para a nova submissão.

À minha família, pelo apoio incondicional mesmo de longe ao longo do últimos 11 anos, obrigado por sonharem comigo e terem me ajudado realizar.

Obrigada à todas que por ventura posso ter esquecido, pois neste momento a memória já está falhando!



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	10
<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>Capítulo 1</b> .....	15
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	15
1.1 Aspectos gerais do gênero <i>Ctenomys</i> .....	15
1.2 Mecanismos de especiação cromossômica .....	19
1.3 Citogenética comparativa em roedores.....	22
1.4 DNA repetitivo .....	24
2 OBJETIVOS .....	27
2.1 Objetivo Geral .....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
<b>Capítulo 2</b> .....	28
Karyotype evolution of <i>Ctenomys</i> : a chromosomal review of Tuco-tuco.....	29
<b>Capítulo 3</b> .....	73
New Karyotypic Information for <i>Ctenomys</i> (Rodentia: Ctenomyidae) from Midwest and Northern Brazil.....	74
<b>Capítulo 4</b> .....	116
Genomic organization of microsatellites and <i>LINE-1</i> -like retrotransposons: evolutionary implications for <i>Ctenomys minutus</i> (Rodentia: Ctenomyidae) cytotypes .....	117
<b>Capítulo 5</b> .....	132
Comparative chromosome painting clarifies the intraspecific chromosomal variation in two <i>Ctenomys</i> species (Rodentia: Ctenomyidae) .....	133
<b>Capítulo 6</b> .....	180
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	180
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	183
<b>APÊNDICES</b> .....	201
<b>ANEXOS</b> .....	203

## LISTA DE ABREVIACÕES

2n – Número Diploide

FISH –Hibridização *in situ* Fluorescente

L1 - Elementos Nucleares Intercalados Longos 1 (Long Interspersed Nuclear Elements 1)

LINEs - Elementos Nucleares Intercalados Longos (Long Interspersed Nuclear Elements)

MYA - Milhões de Anos Atrás

MT – Mato Grosso

FN – Número Fundamental

NOR – Regiões Organizadoras de Nucléolo

ORFs – Quadros de Leitura Aberta

pb – Pares de Base

RS - Rio Grande do Sul

RO - Rondônia

SC - Santa Catarina

SSRs - Repetições de Sequências Simples

TEs – Elementos Transponíveis

## RESUMO

*Ctenomys*, popularmente conhecido como tuco-tucos, é o gênero mais especioso entre os roedores subterrâneos, cerca de 65 espécies. Entre os mamíferos, *Ctenomys* é o grupo com a maior variação cromossômica, com números diploides variando de  $2n=10$  para *C. steinbachi*, à  $2n=70$  para *C. pearsoni* e *C. dorbignyi*, além de variações intraespecíficas, *C. minutus* ( $2n=42$  à  $50$ ) e *C. lami* ( $2n=54$  à  $58$ ). No Brasil, são descritas oito espécies de *Ctenomys*: *Ctenomys bicolor* (Rondônia), *Ctenomys rondoni* (Mato Grosso), *Ctenomys nattereri* (Mato Grosso), *Ctenomys flamarioni* (Rio Grande do Sul), *Ctenomys lami* (Rio Grande do Sul), *Ctenomys minutus* (Santa Catarina e Rio Grande do Sul), *Ctenomys ibicuiensi* (Rio Grande do Sul) e *Ctenomys torquatus* (Rio Grande do Sul). Todas as espécies do Sul do Brasil possuem descrição cariotípica e padrão de bandeamento, sendo *C. minutus* e *C. lami*, espécies irmãs e que possuem a maior variação cariotípica intraespecífica. Apesar de muitos trabalhos descrevendo os diferentes cariótipos, estudos utilizando citogenética molecular são incipientes e ainda não se tem claro como os mecanismos de especiação cromossômica podem influenciar a diferenciação destas espécies. Enquanto as espécies do Centro-oeste e Norte, apenas *C. bicolor* possui a descrição do seu cariótipo ( $2n=40$ ), assim carecem de informações e comparações entre as espécies destas regiões. Sabendo-se destas lacunas o objetivo desta tese foi contribuir no desenvolvimento do conhecimento sobre mecanismos de evolução cromossômica, por meio de diferentes abordagens de análise, aprofundando o conhecimento sobre a organização genômica e cromossômica nas espécies do gênero *Ctenomys* presentes no Brasil. Para isso, além de uma revisão dos dados citogenéticos do gênero, foram utilizadas métodos de citogenética clássica (NORs, Banda-C e G) e citogenética molecular (FISH – hibridização *in situ* fluorescente), com diferentes conjuntos de sondas de DNA (de cromossomos inteiros, microssatélites e elemento transponível) em espécies com ocorrência no Brasil. Empregando a técnica de FISH utilizando sondas de microssatélites e elemento transponível (*L1*) em diferentes citótipos de *C. minutus*, identificamos o papel das sequências repetitivas na variação cariotípica desta espécie, mostramos que diferentes citótipos apresentam diferenças no padrão de distribuição e na quantidade de sinais para as diferentes sondas. E utilizando sondas de cromossomos inteiros de *C. flamarioni*, realizamos a pintura cromossômica em diferentes citótipos de *C. minutus* e *C. lami*, identificamos os rearranjos

intracromossômicos que ocorrerem entre os diferentes citótipos da mesma espécie e as homeologias entre as três espécies. Utilizando estas abordagens de citogenética clássica descremos dois kariótipos para espécies do centro-oeste, além dos padrões de heterocromatina, NORs e bandeamento G para *C. bicolor*, *C. nattereri* e *C.sp.* “xingu” e *C. sp* “central”. Assim, descrevemos os possíveis rearranjos ocorridos para diferenciação dos kariótipos destas espécies. Essas evidências encontradas demonstram como o gênero *Ctenomys* é um ótimo modelo para entender evolução cromossômica e os mecanismos de especiação cromossômicas.

**Palavras-chaves:** Citogenética; Ctenomiydae; Pintura cromossômica; FISH; Rodentia

## ABSTRACT

*Ctenomys*, popularly known as tuco-tucos, is the most speciose genus among subterranean rodents, with about 65 described species. Among mammals, *Ctenomys* is the current group that has the greatest chromosomal variation, with diploid numbers ranging from  $2n=10$  for *C. steinbachi*, to  $2n=70$  for *C. pearsoni* and *C. dorbignyi*, in addition to intraspecific variations, as in *C. minutus* ( $2n=42$  to  $50$ ) and *C. lami* ( $2n=54$  to  $58$ ). In Brazil, eight species of *Ctenomys* were described, namely: *Ctenomys bicolor* (Rondônia), *Ctenomys rondoni* (Mato Grosso), *Ctenomys nattereri* (Mato Grosso), *Ctenomys flamarioni* (Rio Grande do Sul), *Ctenomys lami* (Rio Grande do Sul), *Ctenomys minutus* (Rio Grande do Sul and Santa Catarina), *Ctenomys ibicuiensi* (Rio Grande do Sul) and *Ctenomys torquatus* (Rio Grande do Sul). All species from southern Brazil have a karyotype description and banding pattern, with *C. minutus* and *C. lami*, sister species that have the greatest karyotype variation. Despite many works describing the different karyotypes, studies using molecular cytogenetic are incipient and it is still unclear how chromosomal speciation can influence the differentiation of these species. While the species from Midwest and North, only *C. bicolor* has the description of its karyotype ( $2n=40$ ), thus, information and comparisons between the species of these regions are lacking. Knowing these gaps, the objective of this thesis was to contribute to the development of knowledge about the mechanisms of chromosomal evolution through different analysis approaches, deepening the knowledge about the genomic and chromosomal organization in species of the genus *Ctenomys* present in Brazil. For this, in addition to a review of the cytogenetic data of the genus, methods of classical cytogenetic (NORs, C-Band, and G) and molecular cytogenetic (FISH - fluorescent *in situ* hybridization) were used, with different sets of DNA probes (from chromosomes integers, microsatellites, and transposable element) in species occurring in Brazil. Employing the FISH technique using microsatellite probes and transposable element (*L1*) in different cytotypes of *C. minutus*, we identified the role of repetitive sequences in the karyotype variation of this species, we showed that different cytotypes present differences in the distribution pattern and the number of signals for the different probes. In addition, using probes of whole chromosomes of *C. flamarioni*, we performed the chromosome painting in different cytotypes of *C. minutus* and *C. lami*, we identified the intrachromosomal rearrangements that occur between the different cytotypes of the same species and the homeologies between the

three species. Using these classical cytogenetic approaches, we describe two karyotypes for Midwestern species: heterochromatin, NORs, and G-banding patterns for *C. bicolor*, *C. nattereri*, and *C.sp.* "xingu". Thus, we describe the possible rearrangements that occurred to differentiate the karyotypes of these species. This evidence demonstrates how the genus *Ctenomys* is a great model for understanding chromosomal evolution and the mechanisms of chromosomal speciation.

**Keywords:** Cytogenetics; Ctenomyidae; Chromosomal painting; FISH; Rodentia

## **CAPÍTULO 1**

Neste capítulo será apresentado uma introdução geral e os objetivos, geral e específicos, desta tese.

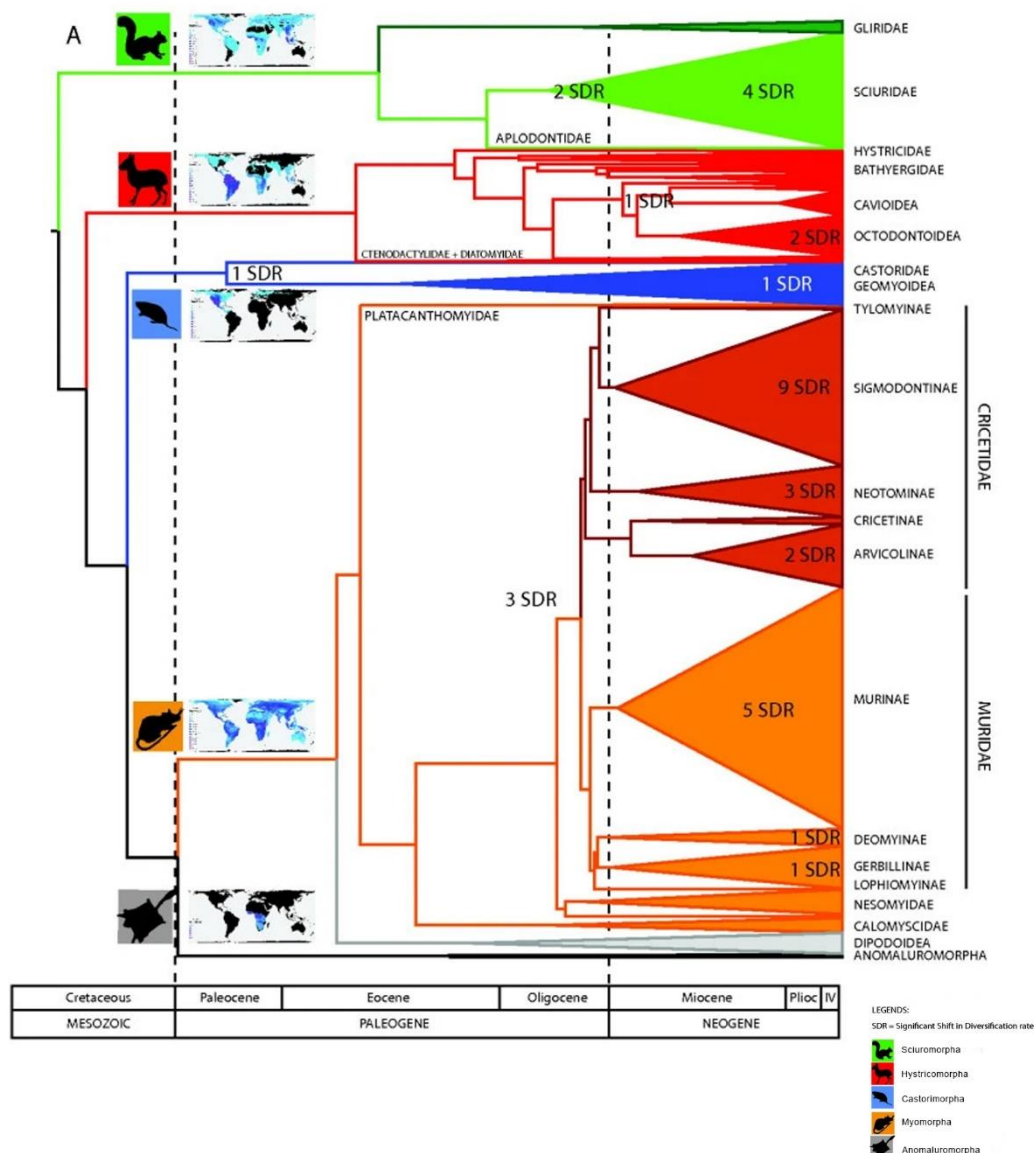
### **1 INTRODUÇÃO GERAL**

#### **1.1 Aspectos gerais do gênero *Ctenomys***

A ordem Rodentia é a mais diversificada dentre as linhagens dos mamíferos, possui mais de 2200 espécies, o que corresponde a cerca de 42% das espécies da classe Mammalia (Carleton and Musser 2005). A taxonomia moderna reconhece 5 subordens (Anomaluomorpha, Castorimorpha, Hystricomorpha, Myomorpha e Sciuromorpha) e 33 famílias (Figura 1) (Fabre et al. 2012). Ocorre em praticamente todos os continentes, com exceção da Antártida, ocupando uma grande variedade de habitats, além de ser capaz de explorar diferentes hábitos, como terrestre, arborícola e semiaquática (Patton et al. 2015). Dentre os roedores terrestres, os grupos que conduzem a maioria de suas atividades vitais em galerias abaixo da superfície terrestre são nomeados de subterrâneos (Lacey et al. 2000). Os roedores subterrâneos são representados pelas famílias: Bathyergidae (Hystricomorpha), Geomyidae (Castorimorpha), Muridae (Myomorpha), Octodontidae (Hystricomorpha) e Ctenomyidae (Hystricomorpha) (Wilson and Reeder 2005).

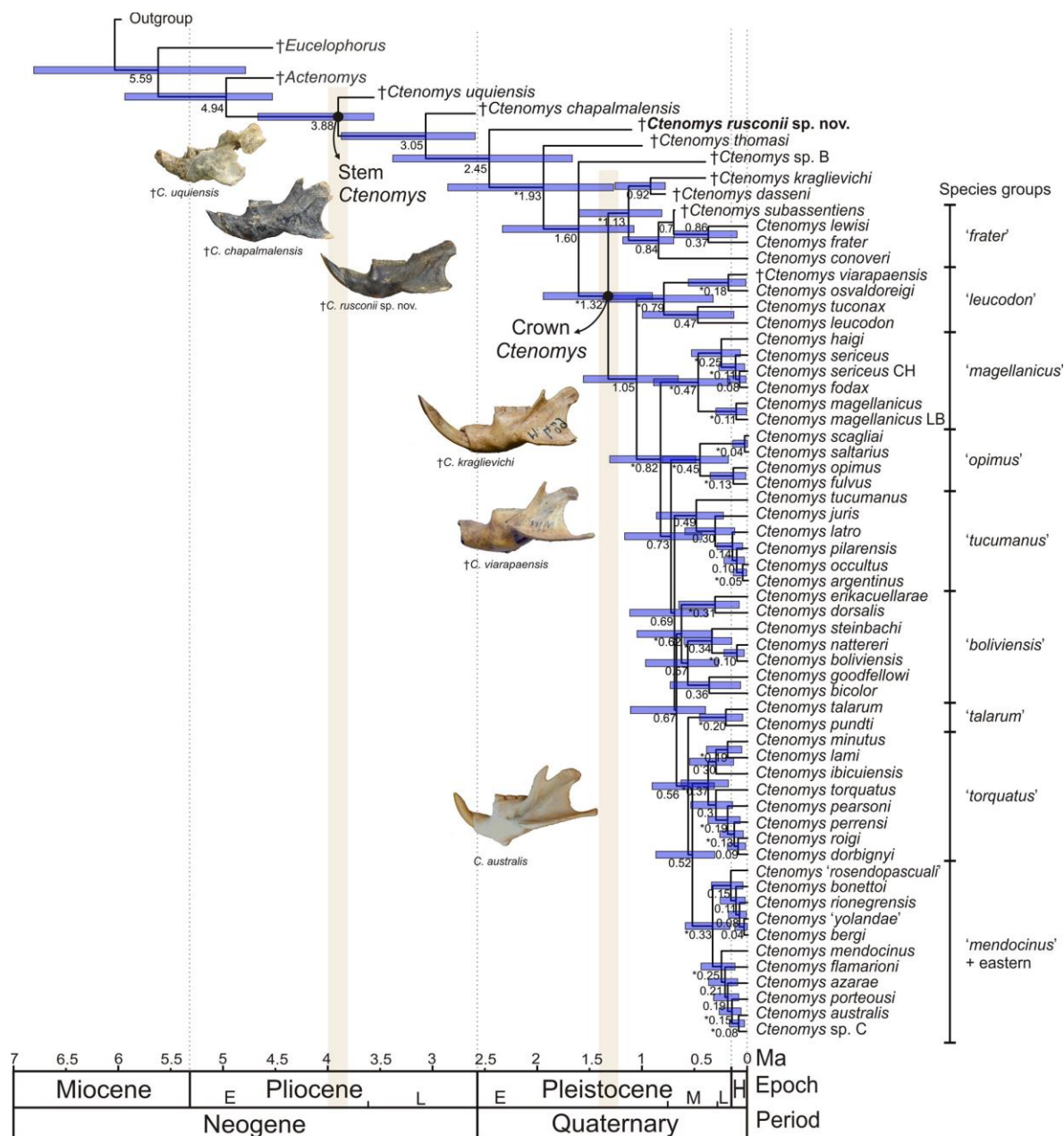
A família Ctenomyidae é formada apenas pelo gênero *Ctenomys*, conhecido popularmente como tuco-tucos, este é o mais especioso entre os roedores subterrâneos, tendo cerca de 65 espécies (Teta and D'Elía 2020). Além disso, é amplamente distribuído desde o sul da Bolívia e Peru até a Argentina, na Terra do Fogo (Reig et al. 1990). A origem do gênero é datada em aproximadamente 3 MYA, com o surgimento de 8 grupos monofiléticos de espécies (Parada et al. 2011), porém alguns outros estudos têm demonstrado que podem ter se originado entre 10-6 MYA (Parada et al. 2011; Roratto et al. 2015; Upham and Patterson 2015; Caraballo and Rossi 2018). No entanto, um estudo recente usando calibrações fósseis dentro de *Ctenomys* situa a origem deste gênero em um período mais recente (1,32 MYA;

intervalo: 0,8–2,1) em relação ao relatado por outros autores, além disso propõe mais um clado formado por *leucodon-tuconax* + *osvaldoreigi-viarapaensis*, provisoriamente chamado de '*leucodon group*' (Figura 2) (De Santi et al. 2021).





cariotípica, favorecendo fixação de rearranjos cromossômicos, e posteriormente, podendo levar à especiação (Reig and Kiblsky 1969; Ortells 1995; Freitas 2001;



Freitas 2006).

**FIGURA 2 - Filogenia de Ctenomyidae.** Fonte: Adaptado de De Santi et al. 2021

Os tuco-tucos são marcadamente semelhantes entre si, exibindo adaptações morfológicas relacionadas ao seu hábito de vida como: redução da cauda e pavilhões auditivos; corpo robusto e cilíndrico; um maior desenvolvimento da musculatura (principalmente dos membros anteriores) e das unhas; e uma abertura bucal atrás dos incisivos, que ficam expostos para fora da boca (Figura 3) (Nevo 1979; Reig et al. 1990). As espécies deste gênero também são herbívoros e se alimentam preferencial

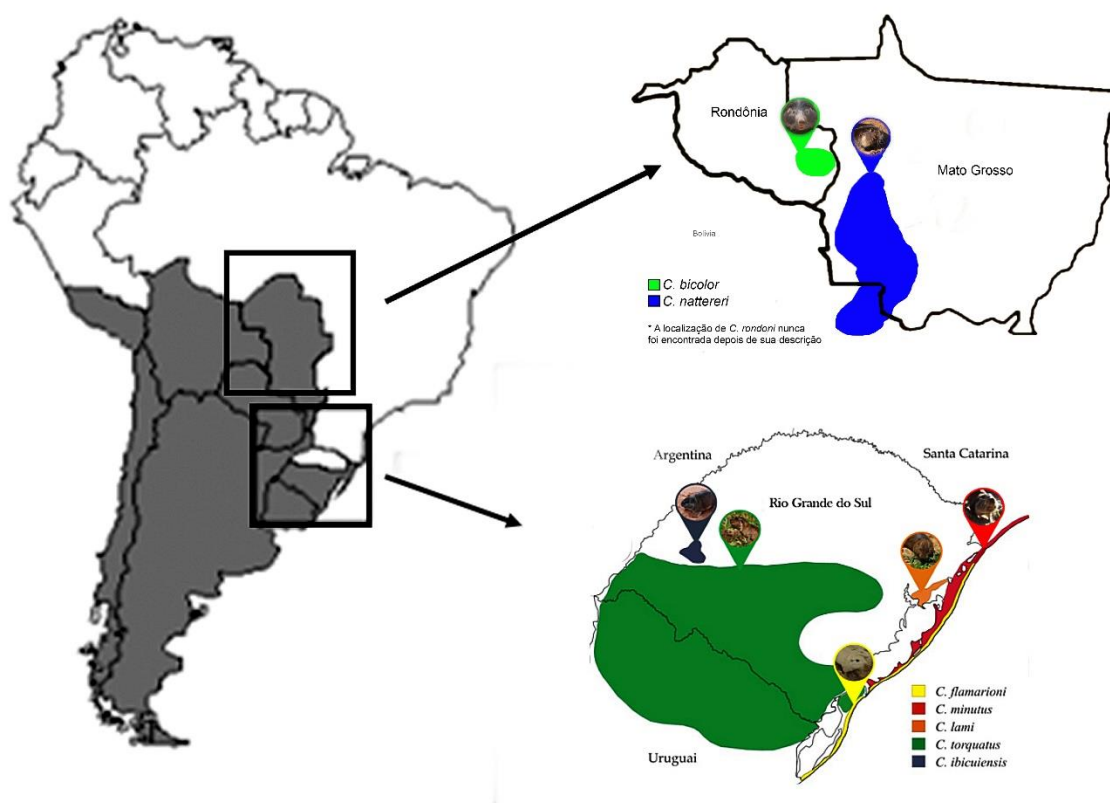
de gramíneas, contudo são generalistas na maioria dos casos, consumindo de ervas, brotos, ou até mesmo os restos raízes de lavouras, pastos e pastagens (Del Valle et al. 2001). Além disso, podem influenciar diretamente a comunidade de plantas e por meio do revolvimento e aeração à alterações do solo na região onde habitam, devido aos seus hábitos de vida e alimentares (Zenuto and Busch 1995; Rosi et al. 2000).



**FIGURA 3 - Adaptações morfológicas em *Ctenomys*, relacionados ao modo de vida subterrâneo.**  
Fonte: Imagens Thales R. O. de Freitas e Thays D. de Oliveira.

No Brasil, encontram-se descritas oito espécies de *Ctenomys*. Uma espécie com distribuição no estado de Rondônia, *Ctenomys bicolor* Miranda Ribeiro, 1914 e duas no estado de Mato Grosso, *Ctenomys rondoni* Miranda Ribeiro, 1914 e *Ctenomys nattereri* Wagner, de 1848 (Figura 4). Informações sobre distribuição, ecologia, comportamento, genética e citogenética destas três espécies anteriormente citadas ainda são incipientes, além disso, a localização de *Ctenomys rondoni* nunca foi encontrada depois de sua descrição. As outras cinco espécies apresentam distribuição no estado do Rio Grande do Sul (Figura 4), sendo três endêmicas do estado: *Ctenomys flamarioni* Travi, 1981; *Ctenomys lami* Freitas, 2001 e *Ctenomys ibicuiensi* Freitas et al. 2012, as outras duas espécies (*Ctenomys minutus* Nehring, 1887 e *Ctenomys torquatus* Lichtenstein, 1830) apresentam parte de sua distribuição

no Estado de Santa Catarina e no Uruguai, respectivamente (Freitas and Lessa 1984; Freitas 1995; Freitas 1997).



**FIGURA 4 - Distribuição das espécies de *Ctenomys* da região sul, centro-oeste e norte do Brasil.**  
Fonte: Adaptado da postagem da página do projeto tuco-tuco no Instagram.

## 1.2 Mecanismos de especiação cromossômica

Nos últimos 70 anos, muitos modelos de especiação cromossômica foram publicados, todos eles com a suposição de que diferenças cromossômicas acumuladas entre neoespécies e seus progenitores prejudicam a fertilidade ou viabilidade de híbridos interespecífico. Os modelos de especiação cromossômica que também tiveram grande impacto são: estasiopátrico, cascata, transitoriedade cromossômica, fusão monobraquial, recombinação, quântico e saltacional (revisão em Rieseberg 2001) (Tabela 1).

- Modelo estasiopátrico: sugere que os rearranjos cromossômicos têm uma vantagem seletiva no estado homozigoto e defende que, para que esse mecanismo

ocorra, as espécies devem ter baixa vagilidade com capacidade de formar populações isoladas (White 1973; White 1978).

- Modelo de cascata: assume que o isolamento reprodutivo aparece devido ao acúmulo de rearranjos cromossômicos, que são ligeiramente subdominantes individualmente (White 1978).

- Modelo de transiliência cromossômica: sugere que um rearranjo cromossômico fortemente subdominante pode se tornar fixo por deriva e endogamia em uma população isolada (Templeton 1981).

- Modelo de fusão monobranquial: estabelece a hipótese de que em subpopulações isoladas diferentes fusões cêntricas são fixadas independentemente com pouco efeito sobre a fertilidade, mas híbridos entre essas subpopulações podem apresentar grande redução na fertilidade ou mesmo serem estéreis (Baker and Bickham 1986).

- Modelo de recombinação: descreve um processo em que a hibridização, entre populações que divergem cromossomicamente, leva à quebra cromossômica e à classificação dos rearranjos pré-existentes que diferenciam as espécies parentais. Um novo genótipo recombinante pode ser estabilizado se as diferenças cariotípicas em relação às espécies parentais forem suficientes e, portanto, ocorre o isolamento reprodutivo (Grant 1981).

- Modelo quântico de especiação: sugere que os rearranjos cromossômicos podem se fixar rapidamente em uma população fundadora periférica por meio de deriva e endogamia, levando ao isolamento reprodutivo. Ao contrário do modelo de transitoriedade, os novos conjuntos de genes, formados como resultado da mudança cariotípica, são adaptativos (Grant 1981).

- Modelo saltacional: propõe que a endogamia em uma população periférica fundadora pode induzir a quebra cromossômica. No entanto, como na maioria dos outros modelos, os rearranjos cromossômicos (que posteriormente servem como barreiras de isolamento) são fixados, por deriva, em pequenas populações endogâmicas (Lewis 1966).

Modelos de especiação cromossômica têm sido muito discutidos e criticados por alguns pesquisadores que defendem causas genéticas de especiação (Coyne et al. 1993; Coyne and Allen Orr 1998). As razões mais amplamente citadas para duvidar do importante papel das mudanças cariotípicas na especiação incluem: 1) a

observação de que muitos rearranjos cromossômicos têm pouco efeito sobre a fertilidade (Dobzhansky 1933; Sites and Moritz 1987; Coyne et al. 1993); 2) as dificuldades teóricas associadas à fixação na população de rearranjos cromossômicos fortemente subdominantes (Walsh 1982; Lande 1985; Baker and Bickham 1986); 3) a alegada ineficácia das diferenças cromossômicas como barreiras ao fluxo gênico (Barton 1979; Futuyma and Mayer 1980); 4) a crença generalizada de que as barreiras pré-zigóticas e/ou ecológicas aparecem antes dos rearranjos cromossômicos nos processos de especiação e, portanto, são causas mais prováveis de especiação (Coyne and Allen Orr 1998; Schemske 2000).

**TABELA 1- Resumo com as principais diferenças entre os modelo de especiação cromossômicas.** Fonte: Tabela adaptada de Rieseberg, 2001.

<b>Modelo</b>	<b>Isolamento geográfico?</b>	<b>Origens mutacionais</b>	<b>Aptidão de rearranjos individuais</b>	<b>Meio de estabelecimento</b>	<b>Repadronização cromossômica adaptativa?</b>
Cascata	Sim	Rearranjo Espontâneo	Fraca Subdominância	Deriva	Não
Transiliência cromossômica	Sim	Rearranjo Espontâneo	Forte Subdominância	Deriva	Não
Fusão monobraquial	Sim	Rearranjo Espontâneo	Fraca ou sem Subdominância	Deriva	Não
Recombinação	Provável	Hibridização	Fraca ou sem Subdominância	Seleção de fertilidade	Talvez
Quântico	Sim	Rearranjo Espontâneo	Forte Subdominância	Deriva	Sim
Saltacional	Não	Rearranjo Espontâneo	Forte Subdominância	Deriva/impulso meiótico	Sim
Estasipátrico	Sim	Endogamia	Forte Subdominância	Deriva	Talvez

Embora geralmente se assume que a importância dos rearranjos cromossômicos reside na sua eficácia como barreiras ao fluxo gênico atuando na fertilidade ou na viabilidade de híbridos, uma série de modelos surgiram recentemente argumentando que, na maioria dos casos, essas mutações reduzem o fluxo gênico mais por causa de uma diminuição na taxa de recombinação do que por causa de seus efeitos sobre a aptidão (Noor et al. 2001; Rieseberg 2001; Navarro and Barton 2003a). Essa diminuição na recombinação facilitará a diferenciação da área do cromossomo afetada pelo rearranjo quando as populações divergentes estiverem em

parapatriciação. Se novos alelos favoráveis aparecerem ligados ao rearranjo cromossômico, a extensão destes, na área geográfica da espécie, será retardada no tempo. Isso permitirá que diferentes alelos se estabeleçam em diferentes áreas da espécie. Se esses alelos forem incompatíveis, ao entrarem em contato reforçarão o isolamento reprodutivo (Navarro and Barton 2003b). Esses modelos são baseados em: 1) rearranjos cromossômicos considerados subdominantes (translocações, fusões, fissões e inversões) são imprevisíveis em seus efeitos sobre a aptidão, devido a mecanismos que mitigam ou previnem a segregação errada durante a meiose, como a supressão parcial ou completa da recombinação (Coyne et al. 1993); 2) é extremamente difícil diferenciar o efeito de rearranjos cromossômicos daquele de genes na esterilidade híbrida (Shaw et al. 1986); 3) os efeitos de um certo tipo de rearranjo variam entre grupos de organismos (Stebbins 1958; Sites and Moritz 1987; Coyne et al. 1993); 4) os rearranjos cromossômicos muitas vezes suprimem a recombinação e, assim, diminuem o fluxo gênico através das regiões genéticas (Searle 1998; Navarro and Barton 2003a); 5) em alguns casos uma redução na recombinação pode resultar em seleção contra os gametas recombinantes, produzindo redução na fertilidade dos híbridos (Rieseberg 2001); 6) em cromossomos com rearranjos estruturais, foi detectada maior taxa de evolução de proteínas do que naqueles que não apresentam esse tipo de alteração (Navarro and Barton 2003b).

Para o gênero *Ctenomys* existe uma ideia clássica de que o modelo de especiação cromossômica é responsável pelo aparecimento das várias espécies que constituem o gênero (Reig and Kiblicky 1969; Reig et al. 1990). Tal ideia ocorre porque as espécies de *Ctenomys* reúnem as condições esperadas para que isso ocorra, como alta variação cariotípica intra- e interespecífica, formação de pequenas populações isoladas e baixo fluxo gênico (Patton and Sherwood 1983; Reig 1989; Malizia et al. 1995; Freitas 1995). A ocorrência de rearranjos cromossômicos em heterozigotos em pequenas populações isoladas poderia gerar novos cariótipos por deriva genética, que seriam testados por seleção e baixo fluxo gênico (Freitas 2021). Um processo de especiação cromossômica provavelmente está ocorrendo em *Ctenomys*, na planície costeira do Rio Grande do Sul, onde ocorrem as espécies *C. lami* e *C. minutus* (Freitas 2021).

### 1.3 Citogenética comparativa em roedores

Os roedores são caracterizados pela variabilidade cariotípica,  $2n=9$  ou  $10$  para *Akodon* sp. (Silva e Yonenaga-Yassuda 1998) a  $102$  para *Tympanoctomys barrerae* (Contreras et al. 1990), e em algumas espécies, também, têm a presença de cromossomos B (Thomson et al. 1984; Silva e Yonenaga-Yassuda 2004).

Com o desenvolvimento das técnicas de bandeamento cromossômico iniciaram os estudos de comparativos, observando homologias e altos níveis de conservação cromossômica em certos grupos de roedores. Com isso foi possível hipotetizar um cariótipo ancestral para a ordem Rodentia, e que as espécies de sciurídeos possuem cariótipos conservados semelhantes ao putativo cariótipo ancestral (Petit et al. 1984; Viegas-PÉquignot et al. 1986). Os grupos de roedores com cariótipos considerado mais conservados em relação ao ancestral são as espécies pertencentes às subordem Castorimorpha e Anomaluromorpha (Ward et al. 1991). Em contraste, as espécies da subordem Myomorpha possuem os cariótipos altamente reorganizados (Graphodatsky et al. 2011). Além disso, existem variações de heterocromatina (Patton e Sherwood 1982; Svartman et al. 2005; Graphodatsky et al. 2011), sistemas sexuais múltiplos (Fredga e Bulmer 1988) e presença de cromossomos B (Trifonov et al. 2002; Silva e Yonenaga-Yassuda 2004).

Outro avanço no estudo sobre evolução cromossômica em mamíferos foi o desenvolvimento de técnicas de hibridização de cromossomos inteiros entre espécies, denominada pintura cromossômica. Com relação aos roedores o primeiro estudo com pintura cromossômica foi realizado por Scherthan et al. (1994). No entanto, poucas sondas de humanos hibridizaram em camundongo, provavelmente, devido ao alto grau de rearranjo do genoma de camundongo (Ferguson-Smith et al. 1998). Visto essa dificuldade fez-se necessário utilizar outros conjuntos de sondas, tanto de roedores que apresentam o cariótipo mais conservado, como os que apresentam cariótipos altamente rearranjados, assim em 1999 foram publicados os primeiros artigos com pintura cromossômica comparativa entre dois genomas de roedores: *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* (Grützner et al. 1999; Guilly et al. 1999; Stanyon et al. 1999). Desde então, mais de 100 genomas de roedores foram analisados resultando na disponibilidade de mapas cromossômicos comparativos e um panorama da evolução cariotípica nos grupos taxonômicos de roedores (Romanenko et al. 2012).

Atualmente estão disponíveis mais de 20 sondas de roedores, porém são poucos os estudos com pintura recíproca (Romanenko et al. 2012). Entre os roedores a subordem Hystricomorpha, na qual estão inclusos os *Ctenomys*, são pouco estudados por citogenética comparativa, existem apenas cinco trabalhos envolvendo espécies de Hystricomorpha com pintura cromossômica com 4 conjuntos de sondas, *Octodon degus*, *Heterocephalus glaber*, *Cavia porcellus* e *Ctenomys flamarioni* (Svartman et al. 2005; Deuve et al. 2006; Deuve et al. 2008; Romanenko et al. 2015; Kubiak et al. 2020).

Em 2020, Kubiak et al. (2020) publicaram o primeiro trabalho utilizando pintura cromossômica em *Ctenomys* e apresentaram o primeiro conjunto de sondas de cromossomos inteiros de uma espécie do gênero, *Ctenomys flamarioni*. O objetivo deste trabalho foi analisar as diferenças entre as espécies parentais *C. flamarioni* e *C. minutus* ( $2n=46$ ) e os híbridos, além de investigar a origem dos híbridos (Kubiak et al. 2020). Este trabalho apresenta uma ferramenta genômica chave para desvendar a biologia-evolutiva dos roedores, principalmente do gênero *Ctenomys*.

#### 1.4 DNA repetitivo

O genoma dos eucariontes é composto por uma fração de DNA altamente repetitivo (Martins et al. 2010). As sequências repetitivas podem ser fonte de variabilidade genética entre espécies e até mesmo em indivíduos de uma mesma população, além de contribuir na replicação do DNA (Li et al. 2002), recombinação (Biet et al. 1999), expressão gênica (Liu et al. 2001), na diferenciação de cromossomos sexuais em plantas (Kubat et al. 2008), reptéis (Pokorná et al. 2011) e peixes (Cioffi et al. 2010; Yano et al. 2014), ou seja, na organização estrutural e funcional do genoma em geral. Estas sequências repetidas podem também estar envolvidas em rearranjos cromossômicos, tais como deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas, sendo responsáveis por proporções significativas das variações cariotípicas observadas em muitos grupos (Kidwell 2002). Estas consistem de sequências idênticas ou semelhantes, dispostas em *tandem* (lado a lado) ou dispersas por todo o genoma (Figura 5) (López-Flores and Garrido-Ramos 2012).

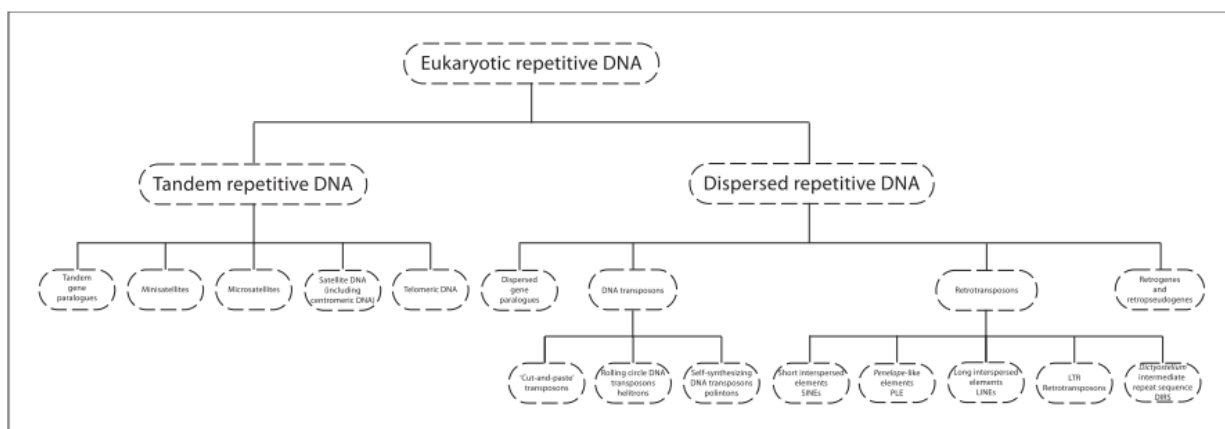


As sequências repetitivas in *tandem* incluem os DNA satélites que são sequências nucleotídicas com cerca de 100 a 300 pb diversas e altamente repetidas, variam em seu número de cópias nos genomas eucariotos, estão organizadas principalmente nas regiões dos telômeros e dos centrômeros e são o principal componente da heterocromatina (Martins 2007). Os minissatélites são repetições com cerca de 10 – 100 pb agrupadas geralmente próximos aos telômeros, comum a todos os eucariotos. Os microssatélites ou SSRs (repetições de sequências simples) são pequenas repetições de 1-6pb dispostas em *tandem* intercaladas em todo o genoma dos eucariotos, podem estar associadas à heterocromatina ou em regiões eucromáticas (Martins 2007). Esta classe de DNA repetitivo é utilizada para o mapeamento físico do genoma, contribuindo para o desenvolvimento de marcadores genéticos de fundamental importância para o conhecimento da estrutura cromossômica e da evolução em muitas espécies (Azevedo et al. 2005).

Enquanto que as sequências repetitivas dispersas englobam os elementos transponíveis (TEs) (Martins 2007; Wells and Feschotte 2020). Os TEs diferenciam dos outros tipos de sequências repetitivas devido sua capacidade intrínseca de se mobilizar no genoma hospedeiro (Wicker et al. 2007; Bourque et al. 2018; Wells and Feschotte 2020). Em mamíferos as sequências repetitivas podem constituir de 40% a 50% dos genomas, como em *Rattus norvegicus* e humanos, respectivamente (Gibbs et al. 2004). Em geral os roedores, possuem cerca de 30% de TEs, sendo aproximadamente 23% dos seus genomas são constituídos de elementos de classe I e 7% de classe II (Gibbs et al. 2004). Desses elementos de classe I, são observados predominantemente elementos LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements) e SINEs (Small Interspersed Nuclear Element). O elemento encontrado em maior abundância são os da superfamília *LINE-1* (Long Interspersed Nuclear Element 1; *L1*) que está presente na classe Mammalia desde sua radiação há aproximadamente 100 milhões de anos (Khan et al. 2006).

Os elementos *L1* de roedores possuem algumas particularidades como: das diferentes linhagens de *L1-like* existentes, apenas uma é ativa em roedores (Gibbs et al. 2004), e também diferentemente do que é observado no genoma dos outros mamíferos em algumas linhagens de roedores identificou-se inativação ou perda de *L1* (Casavant et al. 2000; Erickson et al. 2011). Outra observação interessante é que nas espécies em que há essa perda ou inativação de *L1* há também o aumento na

variabilidade de número de cromossomos detectados (Erickson et al. 2011). Se os *L1* desempenham uma função ou só são parasitas muito bem sucedidos ainda não está claro, mas a perda da sua atividade pode impactar profundamente na dinâmica de interações entre os elementos e o hospedeiro.



**FIGURA 5 - Classificação dos diferentes tipos de seqüências de DNA repetitivo encontrados em genomas eucarióticos.** Fonte: López-Flores e Garrido-Ramos (2012).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Contribuir no desenvolvimento do conhecimento sobre mecanismos de evolução cromossômica nas espécies eucarióticas, por meio de diferentes abordagens de análise, aprofundando o conhecimento sobre a organização genômica e cromossômica nas espécies de roedores do gênero *Ctenomys* presentes no Brasil.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Sumarizar os dados citogenéticos disponíveis para as espécies do gênero *Ctenomys*, além disso, entender o processo de evolução cromossômica durante a diversificação do grupo;

2. Caracterizar os cariótipos de diferentes espécies e linhagens *Ctenomys* da região Centro-oeste e Norte do Brasil, por meio de citogenética clássica, determinar o número diploide, morfologia dos cromossomos, localização de heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de núcleo, além de compreender os rearranjos ocorridos entre as espécies.

3. Compreender o papel das sequências repetitivas na formação dos diferentes citótipos de *Ctenomys minutus*, por meio de mapeamento cromossômico de diferentes classes de sequências repetitivas, microssatélites e *L1*;

4. Compreender quais os rearranjos cromossômicos ocorreram entre *Ctenomys minutus* e *Ctenomys lami* e como os mecanismos de especiação cromossômica levaram à diversidade cariotípica nestas espécies;

## CAPÍTULO 2

Neste capítulo será apresentado parte dos resultados obtidos na presente tese, corresponde ao manuscrito em preparação a ser submetido para publicação à revista *Genetics and Molecular Biology* (ISSN: 0100-8455; Impact Factor: 1.771) intitulado:

**Karyotype evolution of *Ctenomys*: a chromosomal review of Tuco-tuco**

### **CAPÍTULO 3**

Neste capítulo será apresentado parte dos resultados obtidos na presente tese, corresponde ao manuscrito em preparação a ser submetido para publicação à revista Journal of Mammalogy (ISSN: 1545-1542 (Online); Impact Factor: 2.416) intitulado:

**New Karyotypic Information for *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) from Midwest and Northern Brazil**

## CAPÍTULO 4

Neste capítulo será apresentado parte dos resultados obtidos na presente tese, corresponde ao artigo publicado na revista *Animals* (ISSN: 2076-2615; Impact Factor: 3.231) intitulado:

**Genomic organization of microsatellites and *LINE-1*-like retrotransposons: evolutionary implications for *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) cytotypes**

<https://doi.org/10.3390/ani12162091>



## Article

# Genomic Organization of Microsatellites and *LINE-1*-like Retrotransposons: Evolutionary Implications for *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) Cytotypes

Thays Duarte de Oliveira <sup>1,\*</sup> , Natasha Avila Bertocchi <sup>2</sup> , Rafael Kretschmer <sup>3</sup> , Edivaldo H. C. de Oliveira <sup>4,5</sup> , Marcelo de Bello Cioffi <sup>6</sup> , Thomas Liehr <sup>7,\*</sup> and Thales R. O. de Freitas <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 96010-900, Brazil

<sup>4</sup> Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Belém 66075-110, Brazil

<sup>5</sup> Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, SAMAM, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua 67030-000, Brazil

<sup>6</sup> Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos 13565-905, Brazil

<sup>7</sup> Institute of Human Genetics, University Hospital Jena, Friedrich Schiller University, 07747 Jena, Germany

\* Correspondence: thaysbiotec@gmail.com (T.D.d.O.); thomas.liehr@med.uni-jena.de (T.L.)



**Citation:** de Oliveira, T.D.; Bertocchi, N.A.; Kretschmer, R.; de Oliveira, E.H.C.; Cioffi, M.d.B.; Liehr, T.; de Freitas, T.R.O. Genomic Organization of Microsatellites and *LINE-1*-like Retrotransposons: Evolutionary Implications for *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) Cytotypes. *Animals* **2022**, *12*, 2091. <https://doi.org/10.3390/ani12162091>

Academic Editors: Pietro Parma and Ettore Olmo

Received: 8 June 2022

Accepted: 13 August 2022

Published: 16 August 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** In animals, several species contain substantial chromosomal and genomic variation among their populations, but as to what could have driven such diversification is still a puzzle for most cases. Here, we used molecular cytogenetic analysis to expose the main genomic elements involved in the population variation observed in the Neotropical underground rodents of the genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae), which harbor the most significant chromosomal variation among mammals ( $2n = 10$  to  $2n = 70$ ). These data provide evidence for a correlation between repetitive genomic content and localization of evolutionary breakpoint regions (EBRs) and highlight their direct impact in promoting chromosomal rearrangements.

**Abstract:** The Neotropical underground rodents of the genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) comprise about 65 species, which harbor the most significant chromosomal variation among mammals ( $2n = 10$  to  $2n = 70$ ). Among them, *C. minutus* stands out with 45 different cytotypes already identified, among which, seven parental ones, named A to G, are parapatrically distributed in the coastal plains of Southern Brazil. Looking for possible causes that led to such extensive karyotype diversification, we performed chromosomal mapping of different repetitive DNAs, including microsatellites and long interspersed element-1 (*LINE-1*) retrotransposons in the seven parental cytotypes. Although microsatellites were found mainly in the centromeric and telomeric regions of the chromosomes, different patterns occur for each cytotype, thus revealing specific features. Likewise, the *LINE-1*-like retrotransposons also showed a differential distribution for each cytotype, which may be linked to stochastic loss of *LINE-1* in some populations. Here, microsatellite motifs (A)<sub>30</sub>, (C)<sub>30</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CGG)<sub>10</sub>, (GA)<sub>15</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> could be mapped to fusion of chromosomes 20/17, fission and inversion in the short arm of chromosome 2, fusion of chromosomes 23/19, and different combinations of centric and tandem fusions of chromosomes 22/24/16. These data provide evidence for a correlation between repetitive genomic content and localization of evolutionary breakpoints and highlight their direct impact in promoting chromosomal rearrangements.

**Keywords:** chromosomal rearrangements; FISH; *LINE-1*; simple sequence repeats; retrotransposons

## 1. Introduction

Repetitive DNAs consist of identical or similar sequences arranged in tandem or dispersed throughout genomes, including transposable elements (TEs), multigene families, satellites, minisatellites, and microsatellites [1], representing 50% of the *Homo sapiens* [2] and 40% of the *Rattus norvegicus* genomes [3,4]. Even though it has been considered as “genomic junk” for a long time, it is now known that the repetitive fraction of the genome is composed of both functional and non-coding sequences. Its functionality is associated with gene expression regulation, recombination, sex chromosome differentiation, genomic instability, and chromosomal evolution [5–9].

Repetitive sequences can be distributed throughout the genome, but they are ubiquitously present in the heterochromatin [10], with a preferential location in the centromeric and pericentromeric regions in a wide variety of vertebrate groups such as fishes, reptiles, birds, and mammals including rodents [9,11–13]. However, TEs can be distributed in both euchromatic and heterochromatic regions of the chromosomes, depending on the characteristics of each TE group and independent of the host genome [14,15].

Retrotransposons can mobilize via RNA, and they are the most abundant TEs in vertebrate genomes, probably due to their “copy and paste” replication mechanism, resulting in new copies with each replication [16]. In mammals, the long interspersed element-1 (*LINE-1*) is the most abundant transposable element in the order of LINES (Long INter-spersed Elements) [17,18], and is potentially autonomous, since it has the coding for the enzymes needed for replication [16]. Although found in vertebrate genomes, *LINE-1* had a proliferative success in mammals, and is the only active LINE retrotransposon in humans [18,19]. *LINE-1* is believed to have harmful, neutral, and beneficial effects, as it is linked to heterochromatin formation, pseudogenes, chromosomal rearrangements, and human diseases [14,20–23]. As a result, *LINE-1* is generally associated with genome plasticity and chromosomal alterations [24].

Animal genomes present a great diversity in chromosomal number, size, and morphology. However, the diploid number ( $2n$ ) is generally constant within a species and often variable among species [25]. Notably, the subterranean rodents of the Neotropical genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) represent an exception to this general rule. This genus comprises approximately 65 species, showing the greatest chromosomal variation among mammals [26]. In fact, the  $2n$  values varies from 10 in *C. steinbachi* to 70 in *C. pearsoni* [27,28]. In addition, variations are also found within the same species as, for example, in *C. minutus* ( $2n = 42$  to 50), *C. talarum* ( $2n = 44$  to 48), and *C. lami* ( $2n = 54$  to 58) [29–33].

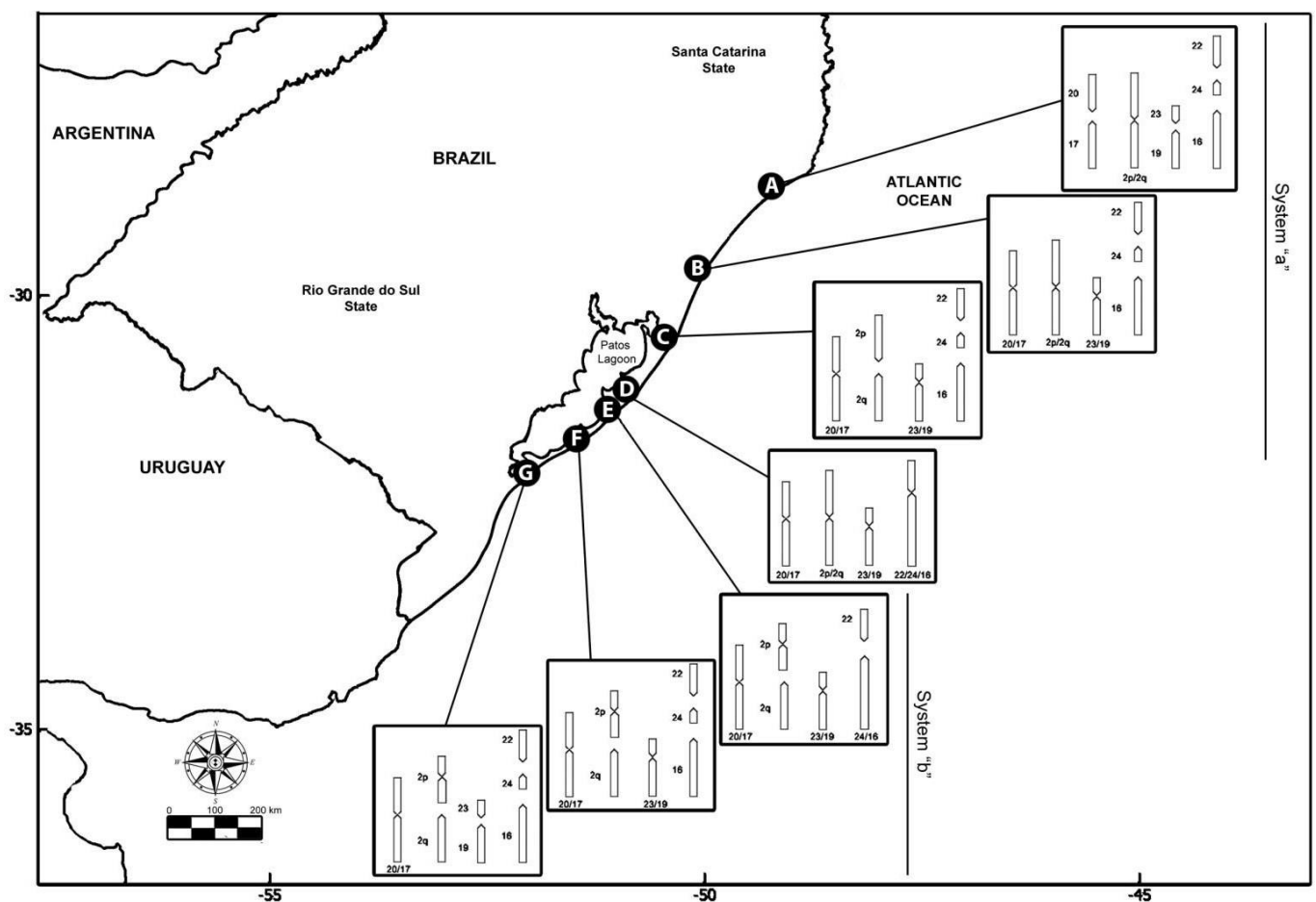
The species *C. minutus* is restricted to Southern Brazil, inhabiting the sandy fields and dunes of the coastal plains of the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul [34]. It presents a notable chromosomal variation, with 45 different karyotypes (cytotypes) already described, the largest variation detected for the genus so far [31,35–37]. Seven parapatric parental karyotypes, here designated as cytotypes A to G, have been identified [31,37,38], with six hybrid zones also documented [29,31,36–40]. The progressive decrease of  $2n$  from 50 to 42 chromosomes involved Robertsonian rearrangements, tandem fusions/fissions, and paracentric and pericentric inversions (Table 1 and Figure 1) [29,31,38,39], which were characterized by G-bands highlighting the chromosomal homologies among cytotypes [29,31,37]. Each cytotype is found in a particular geographic area, and the divergent populations can be separated by geographic barriers or have a contiguous distribution [29].



**Table 1.** Karyotype data with respective cytotype, diploid number (2n), karyotype, Fundamental Number (NF), and the main rearrangements involved in their differentiation.

Cytotype	2n	Karyotype	NF	Fusion	Fission
Cytotype A	50 a	28 sm + 20 a; XY	76		Standard
Cytotype B	46 a	32 sm + 12 a; XY	76	20/17; 23/19	-
Cytotype C	48 a	30 sm + 16 a; XY	76	20/17; 23/19	2p; 2q
Cytotype D	42	36 sm + 6 a; XY	78	20/17; 23/19; 22/24/16	-
Cytotype E	46 b	32 sm + 12 a; XY	76	20/17; 23/19; 24/16	2p*; 2q
Cytotype F	48 b	30 sm + 16 a; XY	76	20/17; 23/19	2p*; 2q
Cytotype G	50 b	28 sm + 20 a; XY	76	20/17	2p*; 2q

Cytotypes with the same 2n are described with “a” or “b”, due to the rearrangements in the different chromosomes, allowing them to be differentiated. System “b” chromosome 2 is fissioned, giving rise to two chromosomes (corresponding to 2p and 2q) and a pericentromeric inversion in the chromosome corresponds to 2p. sm = submetacentric; a = acrocentric; \* denotes inversion. The karyotype data and the rearrangements involved in their differentiation are by Freitas, Freygang et al., and Lopes et al. [29,31,37].



**Figure 1.** Geographic origin and karyotype rearrangements of the specimens of *Ctenomys min-utus* analyzed in this study. Map of the coastal plain of Southern Brazil was obtained from <https://earthobservatory.nasa.gov/map#6/-31.559/-48.011> (accessed on 12 June 2020), according to the NASA Image Use Policy (<https://earthobservatory.nasa.gov/image-use-policy> (accessed on 12 June 2020)).

What could have driven the extensive karyotype diversification observed in these populations? Although the mapping of repetitive sequences has been shown to be useful for detecting karyotypic changes during the chromosomal evolution [41,42], such analyses are still scarce among rodents. As an example, the main 96 repetitive DNA family responsible for rolling circle replication in *Ctenomys* was isolated and characterized [43,44]. The aim was to investigate the distribution of different repetitive DNAs in order to characterize

evolutionary breakpoint regions (EBRs) and to highlight their involvement in promoting chromosomal rearrangements among the seven parapatric parental cytotypes A–G. Additionally, chromosomal mapping of eight microsatellite sequence motifs and *LINE-1*-like retroelement was documented among the populations throughout their distribution area (coastal plains of Southern Brazil) here for the first time. Our results demonstrated that DNA satellites are tightly associated with mapped-in EBRs and most likely fostered the extensive karyotype diversification observed.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sample Collection

Thirteen individuals of *C. minutus* were collected in the states of Santa Catarina (SC) and Rio Grande do Sul (RS) (Table 2), using Oneida Victor® n°0 weft traps. Animals were euthanized following the guidelines of the Animal Care Committee of the American Society of Mammalogists [45]. The experiments were conducted with the approval of the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) n° 35,828 of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre-Brazil), and all field procedures had appropriate permissions from Brazil's Environmental Agency (IBAMA, Authorization n° 14690-1).

**Table 2.** Collection sites for the analyzed *C. minutus* cytotypes, together with the respective sample sizes.

Cytotype	Individuals/Sex	Locality	Geographic Coordinate
A	1 ♀	Jaguaruna (SC), Brazil	28°41'53.02" S 49°01'33.86" W
B	2 ♀	Praia do Barro (RS), Brazil	29°42'14.86" S 49°58'51.86" W
C	2 ♂♀	Bacupari (RS), Brazil	30°28'41.01" S 50°27'13.92" W
D	2 ♀	Mostardas (RS), Brazil	31°06'17" S 50°55'20" W
E	2 ♂♀	Tavares (RS), Brazil	31°17'58.9" S 51°05'47.6" W
F	2 ♀	Bojuru (RS), Brazil	31°39'10.7" S 51°26'14.8" W
G	2 ♀	São José do Norte (RS), Brazil	32°04'34.47" S 52°02'31.47" W

SC = Santa Catarina and RS = Rio Grande do Sul, Brazilian States.

### 2.2. Chromosomal Preparations

Chromosomal preparations were obtained from short-term fibroblast cultures [46], with modifications. Tissues from the kidney and/or the lung were disaggregated in collagenase type IV, cultured at 37 °C in DMEM—Dulbecco's Modified Eagle's Medium—high glucose (GIBCO™, Grand Island, NY, USA), enriched with 20% fetal bovine serum (GIBCO™, BRL), penicillin (100 units/mL), and streptomycin (100 mg/mL). Cells were grown to ~80–90% confluent. For further passages, cells were removed by adding Trypsin–EDTA (GIBCO™, USA), and up to five passages were performed. And at each passage, the chromosomes were obtained by standard protocols: cells were incubated for 3 h with colchicine, treated for 8 min in a hypotonic solution (0.075 M KCl), and fixed in a methanol and acetic acid (3:1) solution. To confirm the diploid number and check if there were no chromosomal alterations, approximately 30 metaphases of each individual were analyzed using 5% Giemsa staining in 0.07 M phosphate buffer (pH 6.8).

### 2.3. Probe Preparation and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

The oligonucleotide probes containing the microsatellite motifs (A)<sub>30</sub>, (C)<sub>30</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CGG)<sub>10</sub>, (GA)<sub>15</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> were directly labeled with Cy3 during synthesis (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and hybridized to *C. minutus* metaphases, according to Kubat et al. [47]. After denaturation, the probes were applied to the slides and incubated for 16 h at 37 °C in a humid chamber. The slides were washed twice in 2 ×

SSC, twice in 1xSSC and in PBS (phosphate-buffered saline), and then dehydrated in an ascending ethanol series (70, 90, and 100%) at room temperature. The chromosomes were counterstained by Fluoroshield™ with DAPI (Sigma–Aldrich).

The *LINE-1*-like retroelement was identified and amplified by the polymerase chain reaction (PCR) when using *C. minutus* (Cytotype A—50a) genomic DNA, which was isolated following [48] and with the set of primers as described by Casavant et al. [49]. The amplified product represented part of the TE reverse transcriptase. The amplicons of approximately 740 bp were purified with a GE Healthcare illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK), following the manufacturer’s recommendations, and then sent for sequencing at Macrogen Inc. (Seoul, Korea). BLAST searches were conducted using the sequencing product against GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed on 8 June 2020)) to confirm the identity of the element. Additionally, ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html> (accessed on 8 June 2020)) tools were utilized to verify the TE and the domains were identified using the Conserved Domain Database (CDD) platform <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> (accessed on 8 June 2020). The *LINE-1*-like retrotransposons (have been deposited in GenBank—OP068276) were used as a template for the PCR labeling; the probe for FISH probe was labeled directly by PCR using Biotin-16-dUTP (Jena Bioscience, Jena, Germany).

The slide preparations, *LINE-1*-like hybridization, and post-hybridization were performed according to Bertocchi et al. [15], with minor modifications. The hybridization was performed overnight at 37 °C in a humid chamber, and the post-hybridization washes were carried out at 37 °C in 50% formamide for 3 min, followed by two washes in 2× SSC for 5 min each, at 37 °C. The signal was detected using streptavidin-Cy3, and the chromosomes were counterstained by Fluoroshield™ with DAPI (Sigma–Aldrich). For both microsatellites and *LINE-1*-like FISH experiments, at least 30 metaphases per individual were analyzed to confirm the FISH results and we built karyotypes for each cytotype to ensure correct identification of each chromosome. The slides were analyzed using a Zeiss Axiophot epifluorescence microscope (Zeiss Inc. Carl Zeiss, Heidelberg, Germany), coupled with ZEN BLUE software. Figures were organized using Adobe Photoshop CS6.

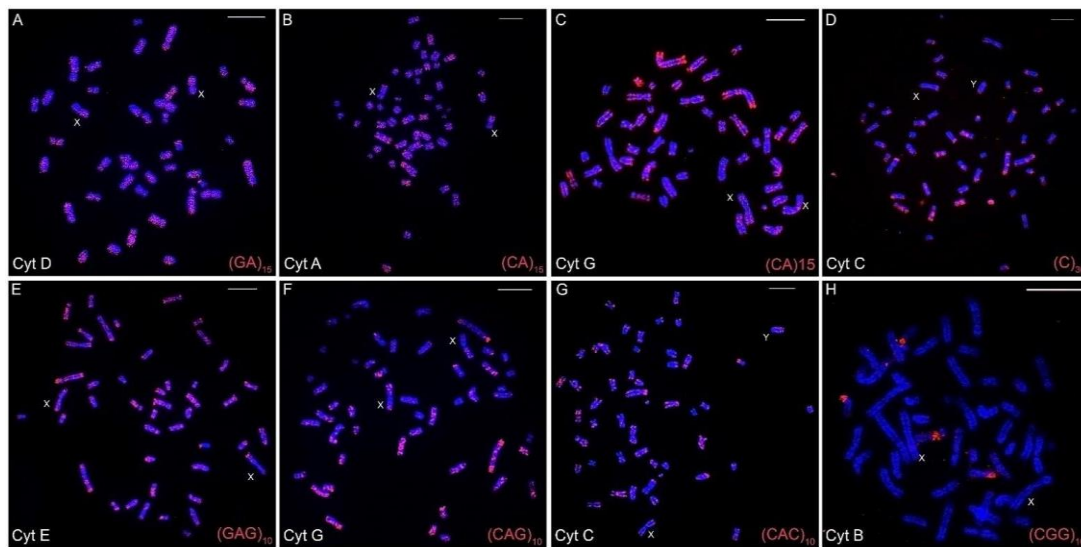
### 3. Results

The chromosomal mapping of the eight distinct microsatellite motifs revealed that distinct cytotype-specific patterns can occur, although they are generally accumulated in the centromeric and telomeric regions of the chromosomes (Table 3, Figures 2A–H, 3, 4 and S1–S7). Only for the (CGG)<sub>10</sub> probe, no signals of hybridization were observed in the sex chromosomes in any of the seven cytotypes; for the other seven microsatellite probes, signals were observed in the centromeric and terminal regions of the sex chromosomes in the seven cytotypes.

**Table 3.** Hybridization of eight microsatellites in seven cytotypes (A–G) of *Ctenomys minutus*.

Cytotypes	Motif Probes							
	(A) <sub>30</sub>	(C) <sub>30</sub>	(CA) <sub>15</sub>	(CAC) <sub>10</sub>	(CAG) <sub>10</sub>	(CGG) <sub>10</sub>	(GA) <sub>15</sub>	(GAG) <sub>10</sub>
Cyt A	Terminal and centromeric blocks on all chromosomes	Terminal blocks on all chromosomes and interstitial block on chr 1 and 8	Terminal and centromeric blocks on large chromosomes	Terminal blocks on all chromosomes and centromeric blocks on large chromosomes	Terminal and centromeric blocks on most chromosomes	Terminal blocks on large chromosomes and interstitial block on chr 8	Terminal blocks on all chromosomes	Terminal and centromeric blocks on all chromosomes
Cyt B	Terminal and centromeric blocks on all chromosomes	Terminal blocks on most chromosomes and interstitial block on chr 8	Terminal and centromeric blocks on all chromosomes	Terminal blocks on some chromosomes	Terminal blocks on some chromosomes	Terminal blocks on two chromosome pairs and interstitial block on chr 8	Terminal and interstitial blocks on all chromosomes	Terminal and interstitial blocks on some chromosomes
Cyt C	Terminal and centromeric blocks on all chromosomes	Terminal blocks on ten chromosome pairs and interstitial block on chr 1 and 8	Large blocks on all chromosomes	Terminal blocks on some chromosomes	Terminal and interstitial blocks on some chromosomes	Terminal blocks on some chromosomes and interstitial block on chr 8	Terminal and interstitial blocks on some chromosomes	Terminal and interstitial blocks on some chromosomes
Cyt D	Terminal and centromeric blocks on large chromosomes	Terminal blocks on all chromosomes and interstitial block on chr 8	Large blocks on large chromosomes	Terminal and interstitial blocks on some chromosomes	Terminal and interstitial blocks on some chromosomes	Terminal blocks on ten chromosome pairs and interstitial block on chr 8	Terminal and interstitial blocks on all chromosomes	Terminal and interstitial blocks on all chromosomes
Cyt E chromosome	Terminal block on some chromosomes and centromeric block on some large	Terminal blocks on all chromosomes and interstitial block on chr 8	Large blocks in the q arm on all chromosomes	Terminal and proximal blocks on all chromosomes	Terminal and interstitial blocks on some chromosomes	Terminal blocks on four chromosome pairs and interstitial block on chr 8	Terminal and interstitial blocks on all chromosomes	Terminal and interstitial blocks on some chromosomes
Cyt F	Terminal block on some chromosomes and centromeric block on large chromosome	Terminal blocks on eight chromosome pairs and interstitial block on chr 1 and 8	Terminal blocks on some chromosomes	Terminal blocks on all chromosomes	Terminal blocks on some chromosomes	Interstitial block on chr 8	Terminal blocks on some chromosomes	Terminal blocks on some chromosomes
Cyt G	Terminal block on some chromosomes and centromeric block on large chromosomes	Terminal blocks on six chromosome pairs and interstitial block on chr 8	Terminal and centromeric blocks on all chromosomes	Terminal and proximal blocks on all chromosomes	Terminal and proximal blocks on all chromosomes	Terminal blocks on four chromosome pairs and interstitial block on chr 8	Terminal and proximal blocks on all chromosomes	Terminal block on all chromosomes and centromeric blocks on chr 1

Chr = chromosome.

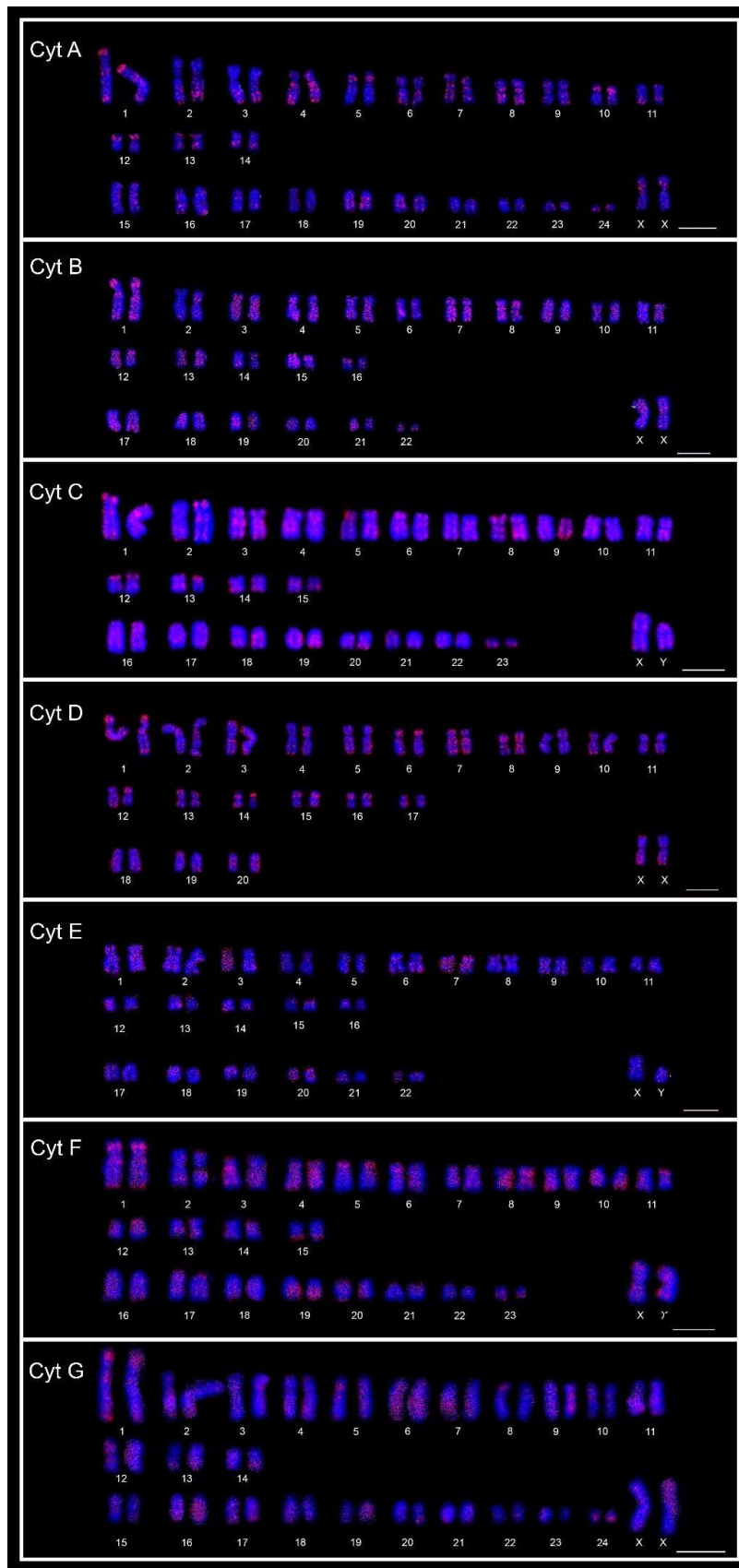


**Figure 2.** Fluorescence in situ hybridizations with varied microsatellites motifs in the different cytotypes (A–H) of *Ctenomys minutus*. The sex chromosomes are indicated for each metaphase. Bar = 10  $\mu$ m.

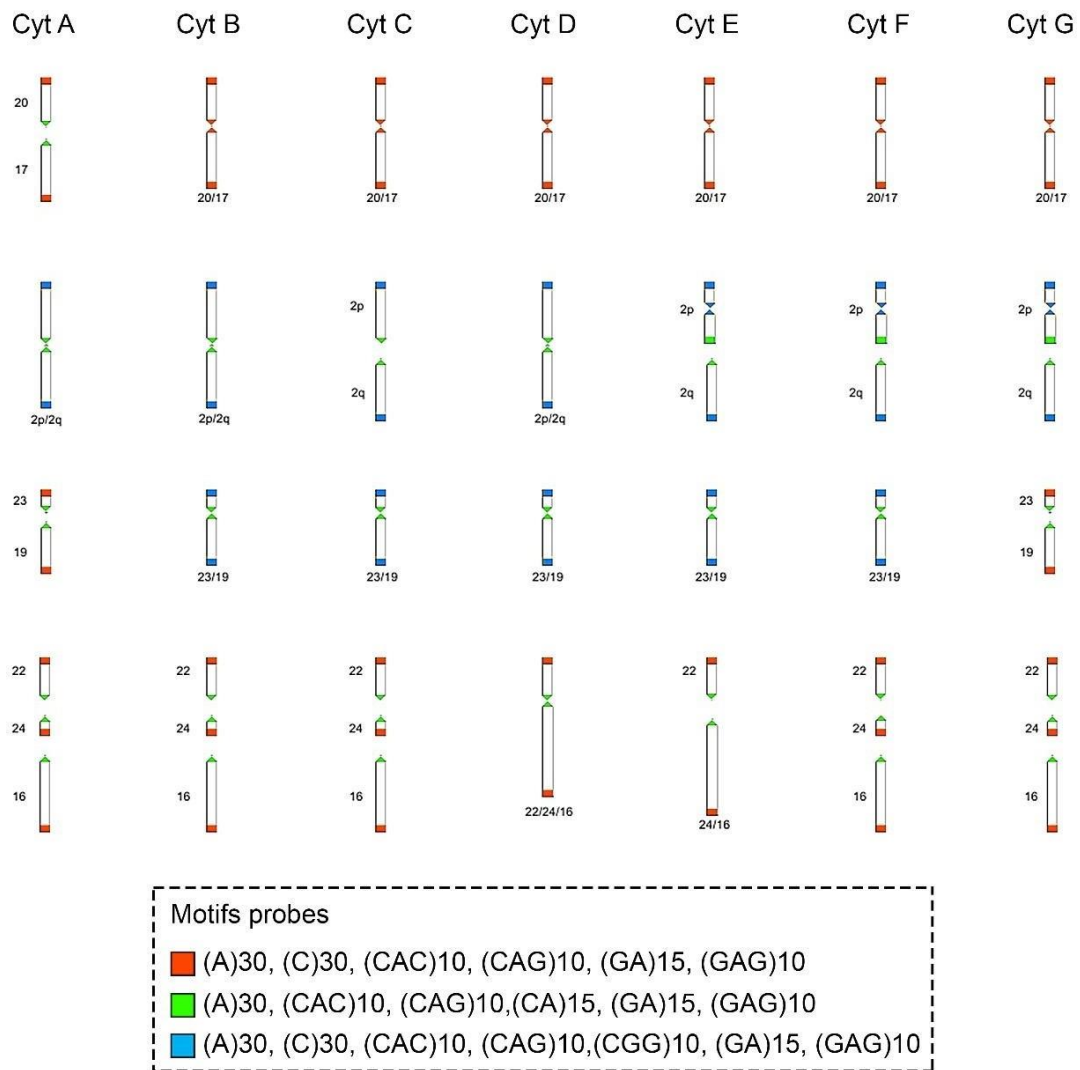
The (CA)<sub>15</sub> microsatellite shows hybridization signals spread over the entire length of the chromosomes, mainly in the largest ones (Figure 2B,C). However, the signals varied according to cytotypes. Cytotypes from the north of the geographic distribution present a different distribution when compared to cytotypes from the southern distribution. This difference can be seen, for example, when the distribution of (CA)<sub>15</sub> in the cytotype A (50a) is compared with the distribution in the cytotype G (50b). Cytotype A visibly presents more and larger (CA)<sub>15</sub> blocks, in contrast to cytotype G (Table 3, Figure 2B and Figure 2C, respectively, and Figures S1–S7).

On the other hand, the microsatellites (C)<sub>30</sub>, (GAG)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, and (CAC)<sub>10</sub> show aspread distribution, with a preferential accumulation in the telomeric, centromeric, and pericentromeric regions of almost all of the chromosomes, with no significant differences among cytotypes (Table 3, Figures 2 and S1–S7). Otherwise, the (CGG)<sub>10</sub> microsatellite motif was found on chromosome pair 8 with secondary constrictions (i.e., nucleolus organizer region (NOR) carriers) in all cytotypes, and in a few additional chromosomal pairs other than in cytotype F. Additionally, (CGG)<sub>10</sub> represents the only motif that did not accumulate in the sex chromosomes (Table 3, Figure 2).

The motifs (GA)<sub>15</sub> and (A)<sub>30</sub> (Figures 2A, 3 and 4, respectively) are in the telomeric, centromeric, and pericentromeric regions of most of the chromosomes, with more extensive blocks in the largest chromosome pairs of karyotypes, in all cytotypes (Table 3 and Figures S1–S7). No cytotype-specific signals appear to occur for these motifs. In summary, at least six microsatellite motifs are accumulated in near all chromosomes involved in rearrangements previously described and directly involved in the origin of the different cytotypes, as shown in Figure 4. In the fusion points of chromosomes 20/17, we showed the motifs (A)<sub>30</sub>, (C)<sub>30</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (GA)<sub>15</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> (Figure 4, line 1—blocks in red). In the fission of chromosome 2, the motifs involved are (A)<sub>30</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> (Figure 4, line 2—blocks in green) and in the inversion in the short arm of chromosome 2, the motifs involved are (A)<sub>30</sub>, (C)<sub>30</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CGG)<sub>10</sub>, (GA)<sub>15</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> (Figure 4, line 2—blocks in blue). In the fusion of chromosomes 23/19, the motifs involved are (A)<sub>30</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> (Figure 4, line 3—blocks in green). Furthermore, in different combinations of centric and tandem fusions of chromosomes 22/24/16, the motifs observed are (A)<sub>30</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> (Figure 4—blocks in green), and (A)<sub>30</sub>, (C)<sub>30</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (GA)<sub>15</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> (Figure 4—blocks in red).

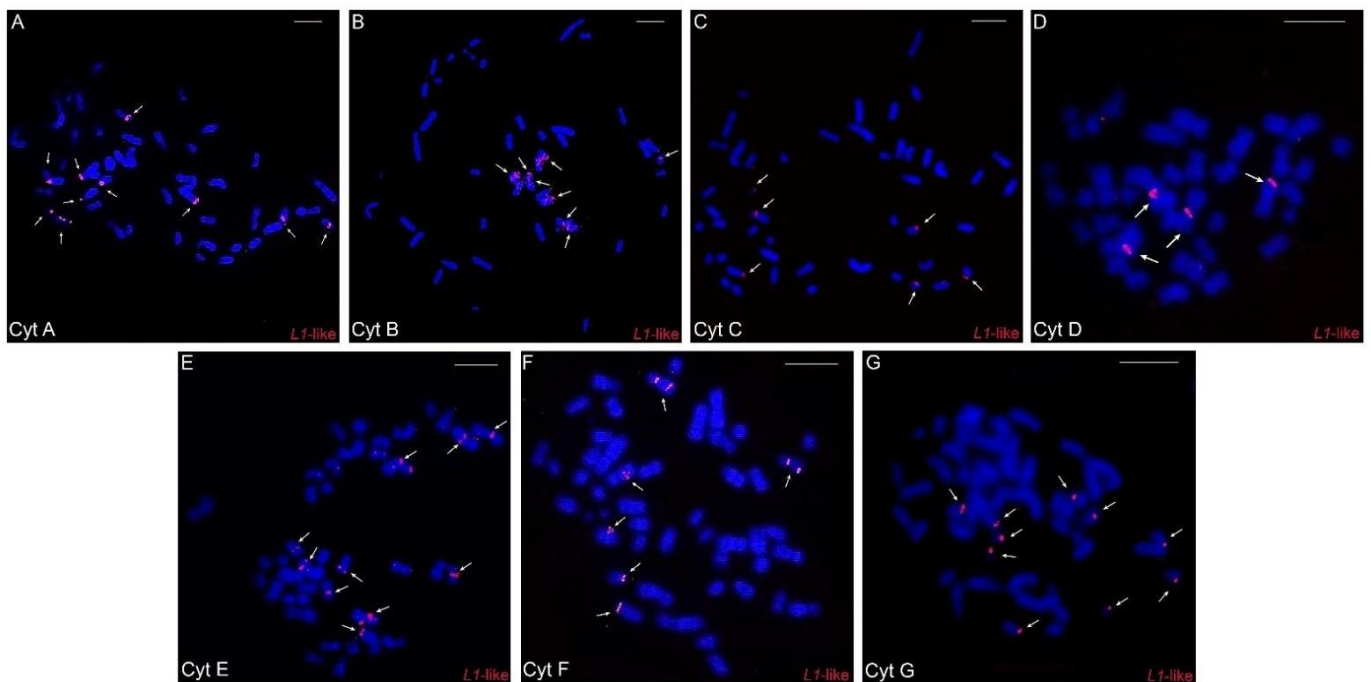


**Figure 3.** FISH karyotypes of the seven cytotypes (Cyt A–G) of *Ctenomys minutus* with the A<sub>30</sub> motif probe. Bar = 10 μm.



**Figure 4.** Schematic representation of the hybridization pattern of the microsatellite motif probes on the chromosomes of *Ctenomys minutus*. Comparison of the chromosomal rearrangements found among the cytotypes (Cyt A–G). The cytotype A was used as a standard to compare the chromosomal rearrangements in the other cytotypes. Modified from Freitas, Freygang et al., and Lopes et al. [29,31,37]. In the fusion 20/17 (line 1), the motifs involved are (A)<sub>30</sub>, (C)<sub>30</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (GA)<sub>15</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> (blocks in red). In the fission of chromosome 2 (line 2), the motifs involved are (A)<sub>30</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> (blocks in green) and in the inversion in the short arm of chromosome 2 (line 2), the motifs involved are (A)<sub>30</sub>, (C)<sub>30</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CGG)<sub>10</sub>, (GA)<sub>15</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> (blocks in blue). In the fusion 23/19 (line 3), the motifs involved are (A)<sub>30</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> (blocks in green). In different combinations of centric and tandem fusions 22/24/16, the motifs involved are (A)<sub>30</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> (blocks in green), and (A)<sub>30</sub>, (C)<sub>30</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (GA)<sub>15</sub>, and (GAG)<sub>10</sub> (blocks in red).

Concerning *LINE-1*-like repeats, in general, few hybridization signals were observed, with a preferential location in one of the distal chromosomal regions: in five pairs in cytotypes A, F, and G, in four pairs in cytotype B, in three pairs in cytotypes C and E, and in only two pairs in cytotype D (Figure 5A–G).



**Figure 5.** Fluorescence in situ hybridization experiments with the *LINE-1*-like probes in the different cytotypes (A–G) of *Ctenomys minutus*. The arrows indicate the *LINE-1*-like hybridization signals. Bar = 10  $\mu$ m.

#### 4. Discussion

In mammals, chromosomal structural changes are usually related to repetitive and mobile sequences [50], especially in fragile sites [51], which consist of tandem sequences and TEs that can induce chromosomal breaks [52,53]. Indeed, in humans, primates, and mice, several EBRs have been found, evidencing that genomic reorganizations occur mainly in such regions where duplications/expansion of repetitive sequences occur [52,54–57]. Despite the importance of repetitive sequences in chromosomal evolution, the extensive karyotype variability found in *C. minutus* is still poorly investigated under a molecular cytogenetic approach.

Our current data show that at least six microsatellite motifs are altered in the chromosomes of *C. minutus* (Figure 4), principally in centromeric and telomeric regions, whose rearrangements were previously described [31]. The creation of loops and/or the mispairing of tandem repeats, which result in disruption-induced replication instability disorders primarily at telomeres, centromeres, and microsatellites, have been demonstrated to be associated with some neurological disorders in humans [58]. In addition, there are several examples and causes of instability of tandem repeats, owing to their intrinsic composition of sequences, secondary DNA structures, topological and physical aspects of tandem repeats, and other characteristics that can influence cellular processes and repair pathways, promoting rapid mutagenesis of the tandem repeats (see review in [59]). It has been shown that tandem repeats can mainly affect the replication mechanism during DNA synthesis, causing instability in the genome [60]. Some genomic sequences/motifs temporarily slow or stop the replication fork, increasing the likelihood of a double-strand break [61].

It is known that common fragile sites are enriched with A/T sequences and they can form secondary structures that enable chromosomal instability [52,62,63]. The A/T pairing tends to be more fragile, not only because of the number of connections, but also because of the stacking of bases [64]. Although specific repetitive sequences have not yet been seen as uniquely responsible for karyotype instability, our results showed that different microsatellite DNA motifs are found at the breakpoints in *C. minutus*, as observed with the monomer (A)<sub>30</sub>, which is localized in all breakpoints of all cytotypes (Figures 2A–G, 3 and 4).



The distribution of the *LINE-1*-like retrotransposons does not have a preferential location in heterochromatic regions, as seen with other retrotransposons such as *Rex1*, *Rex3*, and *Rex6* in fish genomes ([65], reviewed in [66]), *CR1* in the woodpecker genome [15], and SINE-B1 in rodents of the genus *Proechimys* [67]. The dispersed chromosomal distribution of *LINE-1* may be a common characteristic for rodents, since this distribution has also been observed in other species such as *Tatera gambiana* (Muridae, Gerbillinae), *Acomys* sp. (Muridae, Deomyiinae), *Cricetomys* sp. (Nesomyidae, Cricetomyiinae), *Microtus arvalis* (Cricetidae, Arvicolinae), *Phodopus roborovskii*, and *P. sungorus* (Cricetidae, Cricetinae) [68]. The presence of *LINE-1* in both eu- and heterochromatic chromosomal regions may be due to its involvement with the repetitive tandem DNA (satellites, microsatellites, and minisatellites). Furthermore, its distribution in the euchromatin may indicate the occurrence of active *LINE-1* copies [50,69].

A differential distribution of the *LINE-1*-like element was observed for each cytotype. It is more accumulated in cytotypes A, F, and G (larger 2n) than in others (Figure 5A–G), with cytotype D (smallest 2n) having the lowest number of signals. (Figure 5A–G). Thus, we observed that there is an association between the number of *LINE-1*-like signals and 2n, an association similar to the one that occurs between 2n and the geographic distribution of the species, where the extremities have higher numbers and there is a progressive decrease along the distribution and then a further progressive increase (Figure 5). Here, we suggest that such an uneven distribution may be linked to a vertical transmission of *LINE-1*-like signals to all populations of *C. minutus*, since the presence of this retroelement precedes the divergence of marsupials and eutherians [17]. Considering that the *LINE-1* element was present in a *Ctenomys* ancestor, it is likely that it has mutated, progressively producing fewer active copies. As a result, the occurrence of retroelements is decreasing in the populations and, probably, undergoing an extinction process in *Ctenomys*.

Our results also indicate that the number of *LINE-1*-like elements has an association with the diploid number of cytotypes (Figure 5A–G). Our results do not suggest that *L1* hybridization regions on the chromosomes are breakpoints, but rather that the lack of *L1* may have provided the ideal environment for such breaks. Considering the variation in the number of signals between the different cytotypes seen in our FISH experiments (Figure 5A–G) and that *LINE-1* plays an important role in the DNA repair [66], we raised the hypothesis: considering that the cytotype A is more similar to the ancestor of *C. minutus* [29], the *LINE-1* sequences were possibly lost or are very degenerated in the other cytotypes, thus favoring chromosomal rearrangements and the emergence of other cytotypes. Previous studies have also reported that the loss or inactivation of *LINE-1* increased the chromosomal diversity, as found in the rodents of the Muroid group [70], and *Oryzomys* and *Holochilus* [49]. In addition, species with large numbers of sequenced genomes, e.g., humans from different geographic origins, showed drastic variation in the activity of some *L1*-like elements, contributing to human genetic variability [71]; all these observations corroborate our hypothesis.

## 5. Conclusions

This study provided evidence for a direct spatial correlation between the repetitive DNA and EBRs, highlighting their direct impact in promoting chromosomal rearrangements and the divergence of cytotypes of *C. minutus*. Recently, similar observations were made for songbirds of genus *Senna* [72]. However, although the first step towards understanding the coevolution between *LINE-1* and the host genome has also been taken, it is still necessary to deepen the knowledge about the structural characteristics of *LINE-1* copies, such as Southern blot, ORF isolation, and the estimation of the age of the youngest elements, to better understand this question within the *Ctenomys* model.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani12162091/s1>, Figure S1: Fluorescence in situ hybridization experiments with motif probes in cytotype A of *Ctenomys minutus*. Probes used are indicated in the lower right corner of the images and the cytotype in the lower left corner of the images. Figure S2:

Fluorescence in situ hybridization experiments with motif probes in cytotype B of *Ctenomys minutus*. Probes used are indicated in the lower right corner of the images and the cytotype in the lower left corner of the images. Figure S3: Fluorescence in situ hybridization experiments with motif probes in cytotype C of *Ctenomys minutus*. Probes used are indicated in the lower right corner of the images and the cytotype in the lower left corner of the images. Figure S4: Fluorescence in situ hybridization experiments with motif probes in cytotype D of *Ctenomys minutus*. Probes used are indicated in the lower right corner of the images and the cytotype in the lower left corner of the images. Figure S5: Fluorescence in situ hybridization experiments with motif probes in cytotype E of *Ctenomys minutus*. Probes used are indicated in the lower right corner of the images and the cytotype in the lower left corner of the images. Figure S6: Fluorescence in situ hybridization experiments with motif probes in cytotype F of *Ctenomys minutus*. Probes used are indicated in the lower right corner of the images and the cytotype in the lower left corner of the images. Figure S7: Fluorescence in situ hybridization experiments with motif probes in cytotype G of *Ctenomys minutus*. Probes used are indicated in the lower right corner of the images and the cytotype in the lower left corner of the images.

**Author Contributions:** Formal analysis, T.D.d.O. and N.A.B.; investigation, T.D.d.O., N.A.B., R.K., E.H.C.d.O., M.d.B.C., T.L. and T.R.O.d.F.; methodology, T.D.d.O., N.A.B., R.K. and M.d.B.C.; project administration, T.R.O.d.F.; resources, T.R.O.d.F.; supervision, T.R.O.d.F.; validation, N.A.B., R.K., E.H.C.d.O., M.d.B.C., T.L. and T.R.O.d.F.; visualization, T.D.d.O., R.K., E.H.C.d.O., M.d.B.C., T.L. and T.R.O.d.F.; writing—original draft, T.D.d.O.; writing—review and editing, N.A.B., R.K., E.H.C.d.O., M.d.B.C., T.L. and T.R.O.d.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL (FAPERGS), grant number 16/0485-4.

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL -UFRGS (protocol code 35828 and approval 10/01/2018).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), process number 88882.439377/2019-01 (TDO), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), process number 166809/2017-9 (NAB) and process number PDJ 153212/2018-7 (RK), for granting scholarships. We are grateful to Luiz Antonio Carlos Bertollo for his inspiring comments on the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

## References

1. López-Flores, I.; Garrido-Ramos, M.A. The Repetitive DNA Content of Eukaryotic Genomes. *Genome Dyn.* **2012**, *7*, 1–28. [[CrossRef](#)]
2. Liehr, T. Repetitive Elements in Humans. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2072. [[CrossRef](#)]
3. Gibbs, R.A.; Weinstock, G.M.; Metzker, M.L.; Muzny, D.M.; Sodergren, E.J.; Scherer, S.; Scott, G.; Steffen, D.; Worley, K.C.; Burch, P.E.; et al. Genome Sequence of the Brown Norway Rat Yields Insights into Mammalian Evolution. *Nature* **2004**, *428*, 493–520. [[CrossRef](#)]
4. de Koning, A.P.J.; Gu, W.; Castoe, T.A.; Batzer, M.A.; Pollock, D.D. Repetitive Elements May Comprise Over Two-Thirds of the Human Genome. *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1002384. [[CrossRef](#)]
5. Biet, E.; Sun, J.-S.; Dutreix, M. Conserved Sequence Preference in DNA Binding among Recombination Proteins: An Effect of SsDNA Secondary Structure. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 596–600. [[CrossRef](#)]
6. Liu, Z.; Li, P.; Kocabas, A.; Karsi, A.; Ju, Z. Microsatellite-Containing Genes from the Channel Catfish Brain: Evidence of Trinucleotide Repeat Expansion in the Coding Region of Nucleotide Excision Repair Gene RAD23B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *289*, 317–324. [[CrossRef](#)]
7. Kidwell, M.G. Transposable Elements and the Evolution of Genome Size in Eukaryotes. *Genetica* **2002**, *115*, 49–63. [[CrossRef](#)]
8. Li, Y.; Korol, A.B.; Fahima, T.; Beiles, A.; Nevo, E. Microsatellites: Genomic Distribution, Putative Functions and Mutational Mechanisms: A Review. *Mol. Ecol.* **2002**, *11*, 2453–2465. [[CrossRef](#)]
9. De Oliveira, T.D.; Kretschmer, R.; Bertocchi, N.A.; Degrandi, T.M.; De Oliveira, E.H.C.; De Cioffi, M.B.; Garnerio, A.D.V.; Gunski, R.J. Genomic Organization of Repetitive DNA in Woodpeckers (Aves, Piciformes): Implications for Karyotype and ZW Sex Chromosome Differentiation. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169987. [[CrossRef](#)]

10. Martins, C. Chromosomes and Repetitive DNAs: A Contribution to the Knowledge of the Fish Genome. In *Fish Cytogenetics*; Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B., Eds.; Science Publisher: New York, NY, USA, 2007; pp. 421–432.
11. Komissarov, A.S.; Gavrilo, E.V.; Demin, S.J.; Ishov, A.M.; Podgornaya, O.I. Tandemly Repeated DNA Families in the Mouse Genome. *BMC Genom.* **2011**, *12*, 531. [[CrossRef](#)]
12. Pokorná, M.; Kratochvíl, L.; Kejnovský, E. Microsatellite Distribution on Sex Chromosomes at Different Stages of Heteromorphism and Heterochromatinization in Two Lizard Species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genet.* **2011**, *12*, 90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cioffi, M.d.B.; Bertollo, L.A.C. Chromosomal Distribution and Evolution of Repetitive DNAs in Fish. *Repetitive DNA* **2012**, *7*, 197–221. [[CrossRef](#)]
14. Paço, A.; Adegá, F.; Chaves, R. *LINE-1* Retrotransposons: From ‘Parasite’ Sequences to Functional Elements. *J. Appl. Genet.* **2014**, *56*, 133–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bertocchi, N.A.; de Oliveira, T.D.; del Valle Garnero, A.; Coan, R.L.B.; Gunski, R.J.; Martins, C.; Torres, F.P. Distribution of *CR1*-like Transposable Element in Woodpeckers (Aves Piciformes): Z Sex Chromosomes Can Act as a Refuge for Transposable Elements. *Chromosom. Res.* **2018**, *26*, 333–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Wicker, T.; Sabot, F.; Hua-Van, A.; Bennetzen, J.L.; Capy, P.; Chalhoub, B.; Flavell, A.; Leroy, P.; Morgante, M.; Panaud, O.; et al. A Unified Classification System for Eukaryotic Transposable Elements. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 973–982. [[CrossRef](#)]
17. Burton, F.H.; Loeb, D.D.; Voliva, C.F.; Martin, S.L.; Edgell, M.H.; Hutchison, C.A. Conservation throughout Mammalia and Extensive Protein-Encoding Capacity of the Highly Repeated DNA Long Interspersed Sequence One. *J. Mol. Biol.* **1986**, *187*, 291–304. [[CrossRef](#)]
18. Boissinot, S.; Chevret, P.; Furano, A.V. *L1 (LINE-1)* Retrotransposon Evolution and Amplification in Recent Human History. *Mol. Biol. Evol.* **2000**, *17*, 915–928. [[CrossRef](#)]
19. Furano, A.; Duvernell, D.; Boissinot, S. *L1 (LINE-1)* Retrotransposon Diversity Differs Dramatically between Mammals and Fish. *Trends Genet.* **2004**, *20*, 9–14. [[CrossRef](#)]
20. Brattbauer, G.L.; Cardiff, R.D.; Fanning, T.G. Expression of *LINE-1* Retrotransposons in Human Breast Cancer. *Cancer* **1994**, *73*, 2333–2336. [[CrossRef](#)]
21. Esnault, C.; Maestre, J.; Heidmann, T. Human *LINE* Retrotransposons Generate Processed Pseudogenes. *Nat. Genet.* **2000**, *24*, 363–367. [[CrossRef](#)]
22. Ovchinnikov, I.; Troxel, A.B.; Swergold, G.D. Genomic Characterization of Recent Human *LINE-1* Insertions: Evidence Supporting Random Insertion. *Genome Res.* **2001**, *11*, 2050–2058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Acosta, M.J.; Marchal, J.A.; Fernández-Espartero, C.H.; Bullejos, M.; Sánchez, A. Retroelements (*LINEs* and *SINEs*) in *Vole* Genomes: Differential Distribution in the Constitutive Heterochromatin. *Chromosom. Res.* **2008**, *16*, 949–959. [[CrossRef](#)]
24. Dobigny, G.; Ozouf-Costaz, C.; Waters, P.D.; Bonillo, C.; Coutanceau, J.P.; Volobouev, V. *LINE-1* Amplification Accompanies Explosive Genome Repatterning in Rodents. *Chromosom. Res.* **2005**, *12*, 787–793. [[CrossRef](#)]
25. Appels, R.; Morris, R.; Gill, B.S.; May, C.E. Chromosome Morphology and Number. In *Chromosome Biology*; Springer: Boston, MA, USA, 1998; pp. 67–84.
26. Teta, P.; D’Elia, G. Uncovering the Species Diversity of Subterranean Rodents at the End of the World: Three New Species of Patagonian Tuco-Tucos (Rodentia, Hystricomorpha, *Ctenomys*). *PeerJ* **2020**, *8*, e9259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Reig, O.A.; Bush, C.; Ortells, M.O.; Contreras, J.R. An Overview of Evolution, Systematic, Population Biology, Cytogenetics, Molecular Biology and Speciation in *Ctenomys*. In *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Level*; Nevo, E., Reig, O.A., Eds.; Alan R. Liss: New York, NY, USA, 1990; pp. 71–96.
28. Freitas, T.R.O. Family Ctenomyidae (Tuco-Tucos). In *Handbook of the Mammals of the World. Lagomorphs and Rodents I*; Wilson, D., Lacer, T., Mittermeier, R., Eds.; Lynx Edicions Publications: Barcelona, Spain, 2016; Volume 6, pp. 498–534. ISBN 978-84-941892-3-4.
29. Freitas, T.R.O. De Chromosome Polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia-Octodontidae). *Braz. J. Genet.* **1997**, *20*, 1–7. [[CrossRef](#)]
30. Massarini, A.; Mizrahi, D.; Tiranti, S.; Toloza, A.; Luna, F.; Schleich, C.E. Extensive Chromosomal Variation in *Ctenomys talarum talarum* from the Atlantic Coast of Buenos Aires Province, Argentina (Rodentia: Octodontidae). *Mastozool. Neotrop.* **2002**, *9*, 199–207.
31. Freygang, C.C.; Marinho, J.R.; de Freitas, T.R.O. New Karyotypes and Some Considerations about the Chromosomal Diversification of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) on the Coastal Plain of the Brazilian State of Rio Grande Do Sul. *Genetica* **2004**, *121*, 125–132. [[CrossRef](#)]
32. Freitas, T.R.O. *Ctenomys lami*: The Highest Chromosome Variability in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) Due to a Centric Fusion/Fission and Pericentric Inversion System. *Acta Theriol.* **2007**, *52*, 171–180. [[CrossRef](#)]
33. Fernandes, F.; Fernández-Stolz, G.; Lopes, C.; Freitas, T. The Conservation Status of the Tuco-Tucos, Genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae), in Southern Brazil. *Braz. J. Biol.* **2007**, *67*, 839–847. [[CrossRef](#)]
34. Freitas, T.R.O. Geographic Distribution and Conservation of Four Species of the Genus *Ctenomys* in Southern Brazil. *Stud. Neotrop. Fauna Environ.* **1995**, *30*, 53–59. [[CrossRef](#)]
35. Gava, A.; de Freitas, T.R.O. Characterization of a Hybrid Zone Between Chromosomally Divergent Populations of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae). *J. Mammal.* **2002**, *83*, 843–851. [[CrossRef](#)]

36. Gava, A.; Freitas, T.R.O. De Microsatellite Analysis of a Hybrid Zone Between Chromosomally Divergent Populations of *Ctenomys minutus* from Southern Brazil (Rodentia: Ctenomyidae). *J. Mammal.* **2004**, *85*, 1201–1206. [[CrossRef](#)]
37. Lopes, C.M.; Ximenes, S.S.F.; Gava, A.; de Freitas, T.R.O. The Role of Chromosomal Rearrangements and Geographical Barriers in the Divergence of Lineages in a South American Subterranean Rodent (Rodentia: Ctenomyidae: *Ctenomys minutus*). *Heredity* **2013**, *111*, 293–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Freitas, T.R.O. De Cytogenetics Status of Four *Ctenomys* Species in the South of Brazil. *Genetica* **2006**, *126*, 227–235. [[CrossRef](#)]
39. Gava, A.; Freitas, T.R.O. Inter and Intra-Specific Hybridization in Tuco-Tucos (*Ctenomys*) from Brazilian Coastal Plains (Rodentia: Ctenomyidae). *Genetica* **2003**, *119*, 11–17. [[CrossRef](#)]
40. Fornel, R.; Cordeiro-Estrela, P.; de Freitas, T.R.O. Skull Shape and Size Variation within and between *mendocinus* and *torquatus* Groups in the Genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) in Chromosomal Polymorphism Context. *Genet. Mol. Biol.* **2018**, *41*, 263–272. [[CrossRef](#)]
41. Ditcharoen, S.; Bertollo, L.A.C.; Ráb, P.; Hnátková, E.; Molina, W.F.; Liehr, T.; Tanomtong, A.; Triantaphyllidis, C.; Ozouf-Costaz, C.; Tongnunui, S.; et al. Genomic Organization of Repetitive DNA Elements and Extensive Karyotype Diversity of Silurid Catfishes (Teleostei: Siluriformes): A Comparative Cytogenetic Approach. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3545. [[CrossRef](#)]
42. Sember, A.; De Oliveira, E.A.; Ráb, P.; Bertollo, L.A.C.; De Freitas, N.L.; Viana, P.F.; Yano, C.F.; Hatanaka, T.; Marinho, M.M.F.; De Moraes, R.L.R.; et al. Centric Fusions behind the Karyotype Evolution of Neotropical *Nannostomus pencilfishes* (Characiforme, Lebiasinidae): First Insights from a Molecular Cytogenetic Perspective. *Genes* **2020**, *11*, 91. [[CrossRef](#)]
43. Rossi, M.S.; Pesce, C.G.; Reig, O.A.; Kornblihtt, A.R.; Zorzópulos, J. Retroviral-like Features in the Monomer of the Major Satellite DNA from the South American Rodents of the Genus *Ctenomys*. *Mitochondrial DNA* **1993**, *3*, 379–381. [[CrossRef](#)]
44. Novello, A.; Cortinas, M.N.; Suárez, M.; Musto, H. Cytogenetic and Molecular Analysis of the Satellite DNA of the Genus *Ctenomys* (Rodentia Octodontidae) from Uruguay. *Chromosom. Res.* **1996**, *4*, 335–339. [[CrossRef](#)]
45. Sikes, R.S. The animal care and use committee of the American Society of mammalogists 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the Use of Wild Mammals in Research and Education. *J. Mammal.* **2016**, *97*, 663–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Verma, R.; Babu, A. Human Chromosomes: Principles & Techniques. *Mol. Reprod. Dev.* **1996**, *43*, 134. [[CrossRef](#)]
47. Kubat, Z.; Hobza, R.; Vyskot, B.; Kejnovsky, E. Microsatellite Accumulation on the Y Chromosome in *Silene latifolia*. *Genome* **2008**, *356*, 350–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochem. Bull.* **1987**, *19*, 11–15.
49. Casavant, N.C.; Scott, L.; Cantrell, M.A.; Wiggins, L.E.; Baker, R.J.; Wichman, H.A. The End of the *LINE*? Lack of Recent *L1* Activity in a Group of South American Rodents. *Genetics* **2000**, *154*, 1809–1817. [[CrossRef](#)]
50. Richard, G.-F.; Kerrest, A.; Dujon, B. Comparative Genomics and Molecular Dynamics of DNA Repeats in Eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 686–727. [[CrossRef](#)]
51. Liehr, T.; Kosayakova, N.; Schröder, J.; Ziegler, M.; Kreskowski, K.; Pohle, B.; Bhatt, S.; Theuss, L.; Wilhelm, K.; Weise, A.; et al. Evidence for Correlation of Fragile Sites and Chromosomal Breakpoints in Carriers of Constitutional Balanced Chromosomal Rearrangements. *Balk. J. Med. Genet.* **2011**, *14*, 13–16. [[CrossRef](#)]
52. Ruiz-Herrera, A.; Castresana, J.; Robinson, T.J. Is Mammalian Chromosomal Evolution Driven by Regions of Genome Fragility? *Genome Biol.* **2006**, *7*, R115. [[CrossRef](#)]
53. Ferguson-Smith, M.A.; Trifonov, V. Mammalian Karyotype Evolution. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 950–962. [[CrossRef](#)]
54. Fan, Y.; Newman, T.; Linardopoulou, E.; Trask, B.J. Gene Content and Function of the Ancestral Chromosome Fusion Site in Human Chromosome 2q13-2q14.1 and Paralogous Regions. *Genome Res.* **2002**, *12*, 1663–1672. [[CrossRef](#)]
55. Kehrer-Sawatzki, H.; Schreiner, B.; Tänzer, S.; Platzer, M.; Müller, S.; Hameister, H. Molecular Characterization of the Pericentric Inversion That Causes Differences between Chimpanzee Chromosome 19 and Human Chromosome 17. *Am. J. Hum. Genet.* **2002**, *71*, 375–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Locke, D.P.; Archidiacono, N.; Misceo, D.; Cardone, M.F.; Deschamps, S.; Roe, B.; Rocchi, M.; Eichler, E.E. Refinement of a Chimpanzee Pericentric Inversion Breakpoint to a Segmental Duplication Cluster. *Genome Biol.* **2003**, *4*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Kehrer-Sawatzki, H.; Sandig, C.A.; Goidts, V.; Hameister, H. Breakpoint Analysis of the Pericentric Inversion between Chimpanzee Chromosome 10 and the Homologous Chromosome 12 in Humans. *Cytogenet. Genome Res.* **2005**, *108*, 91–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Leffak, M. Break-Induced Replication Links Microsatellite Expansion to Complex Genome Rearrangements. *BioEssays* **2017**, *39*, 1700025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Balzano, E.; Pelliccia, F.; Giunta, S. Genome (in)Stability at Tandem Repeats. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2021**, *113*, 97–112. [[CrossRef](#)]
60. Gadgil, R.Y.; Romer, E.J.; Goodman, C.C.; Dean Rider, S.; Damewood, F.J.; Barthelmy, J.R.; Shin-Ya, K.; Hanenberg, H.; Leffak, M. Replication Stress at Microsatellites Causes DNA Double-Strand Breaks and Break-Induced Replication. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 15378–15397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Feng, W.; Di Rienzi, S.C.; Raghuraman, M.K.; Brewer, B.J. Replication Stress-Induced Chromosome Breakage Is Correlated with Replication Fork Progression and Is Preceded by Single-Stranded DNA Formation. *G3 Genes Genomes Genet.* **2011**, *1*, 327–335. [[CrossRef](#)]
62. Glover, T.W. Common Fragile Sites. *Cancer Lett.* **2006**, *232*, 4–12. [[CrossRef](#)]
63. Schwartz, M.; Zlotorynski, E.; Kerem, B. The Molecular Basis of Common and Rare Fragile Sites. *Cancer Lett.* **2006**, *232*, 13–26. [[CrossRef](#)]

64. Yakovchuk, P.; Protozanova, E.; Frank-kamenetskii, M.D. Base-Stacking and Base-Pairing Contributions into Thermal Stability of the DNA Double Helix. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 564–574. [[CrossRef](#)]
65. Volff, J.; Körting, C.; Meyer, A.; Schartl, M. Evolution and Discontinuous Distribution of *Rex3* Retrotransposons in Fish. *Mol. Biol. Evol.* **2001**, *18*, 427–431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Ferreira, D.C.; Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Foresti, F. Transposable Elements as a Potential Source for Understanding the Fish Genome. *Mob. Genet. Elements* **2011**, *1*, 112–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Araújo, N.P.; Sena, R.S.; Bonvicino, C.R.; Kuhn, G.C.S.; Svartman, M. *SINE-B1* Distribution and Chromosome Rearrangements in the South American *Proechimys gr. goeldii* (Echimyidae, Rodentia). *Cytogenet. Genome Res.* **2021**, *161*, 6–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Vieira-da-Silva, A.; Adegas, F.; Guedes-Pinto, H.; Chaves, R. *LINE-1* Distribution in Six Rodent Genomes Follow a Species-Specific Pattern. *J. Genet.* **2016**, *95*, 21–33. [[CrossRef](#)]
69. Slamovits, C.H.; Cook, J.A.; Lessa, E.P.; Susana Rossi, M. Recurrent Amplifications and Deletions of Satellite DNA Accompanied Chromosomal Diversification in South American Tuco-Tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): A Phylogenetic Approach. *Mol. Biol. Evol.* **2001**, *18*, 1708–1719. [[CrossRef](#)]
70. Erickson, I.K.; Cantrell, M.A.; Scott, L.; Wichman, H.A. Retrofitting the Genome: L1 Extinction Follows Endogenous Retroviral Expansion in a Group of Muroid Rodents. *J. Virol.* **2011**, *85*, 12315–12323. [[CrossRef](#)]
71. Feschotte, C.; Pritham, E.J. Mobile DNA: Genomes under the Influence. *Genome Biol.* **2006**, *7*, 12315–12323. [[CrossRef](#)]
72. Waminal, N.E.; Pellerin, R.J.; Kang, S.H.; Kim, H.H. Chromosomal Mapping of Tandem Repeats Revealed Massive Chromosomal Rearrangements and Insights Into *Senna tora* Dysploidy. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 629898. [[CrossRef](#)]

## CAPÍTULO 5

Neste capítulo será apresentado parte dos resultados obtidos na presente tese, corresponde ao manuscrito em preparação a ser submetido para publicação à revista PLOS ONE (ISSN: 1932-6203; Impact Factor: 3.752) intitulado:

**Comparative chromosome painting clarifies the intraspecific chromosomal variation in two *Ctenomys* species (Rodentia: Ctenomyidae)**

## CAPÍTULO 6

Neste capítulo será apresentada as conclusões obtidas a partir dos resultados apresentados nos capítulos 2, 3, 4 e 5 desta tese.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta dessa tese foi ponderar a diferenciação cromossômica do gênero *Ctenomys*, com enfoque para as espécies com distribuição no Brasil. Procurando investigar o caminho evolutivo e os processos que dão origem a grande variação cromossômica inter- e intraespecífica para o gênero, utilizando tanto técnicas de citogenética clássica, como de citogenética molecular. Para tanto, foi realizada uma revisão sobre os dados citogenéticos, além das análises cromossômicas clássicas para espécies com distribuição no centro-oeste e norte do Brasil; foi realizado o mapeamento citogenético de seqüências de DNAs repetitivos em diferentes citótipos de *Ctenomys minutus*, espécie endêmica do sul do Brasil; assim como a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) nos cromossomos de *C. minutus* e *C. lami*, espécies com uma das maiores variações cariotípicas para o gênero com a utilização de um novo conjunto de sondas cromossômicas derivadas de *C. flamarioni*.

Os recentes avanços na citogenética, especialmente na citogenética molecular, têm proporcionado resultados importantes no estudo da evolução cromossômica, onde a localização de seqüências repetitivas de DNA e o mapeamento cromossômico são técnicas importantes para atingir esse objetivo. Portanto, usando esses métodos, esta tese, permitiu avançar significativamente no conhecimento dos processos que levam à diferenciação do diferentes citótipos tanto em *C. minutus* como em *C. lami*.

No capítulo 2, foi possível sintetizar os estudos citogenéticos disponíveis para o gênero *Ctenomys*, além de associar a evolução cromossômica com diversificação do grupo, concluindo assim que a evolução cromossômica é independente da filogenia das espécies. Além disso, realizamos uma reconstrução ancestral, onde foi possível identificar os passos para a evolução dos cromossomos no grupo. Ademais, observamos uma lacuna nos estudos citogenéticos deste grupo, havendo poucos estudos utilizando citogenética molecular e citogenômica, e sobre a relação

filogenética e cromossômica dessas espécies, não havendo ainda a discussão sobre um possível cariótipo ancestral para o gênero.

No capítulo 3, foram descritos novos cariótipos para o centro-oeste do Brasil, encontramos o cariótipo  $2n=34$  cromossomos para a linhagem denominada *C. sp.* “xingu”, para a linhagem *C. sp.* “central” com  $2n=34$  e  $36$ , confirmamos o número diploide de *C. nattereri*,  $2n=36$  cromossomos e para *C. bicolor*, com  $2n=40$  cromossomos. Além do cariótipo apresentamos informações sobre a distribuição da heterocromatina constitutiva nos diferentes cariótipos, e da região organizadora de nucléolo (NORs) em um par nas duas espécies e nas duas linhagens. Ademais identificamos por bandeamento G, os rearranjos que ocorreram durante a evolução cromossômica destas espécies e firmando duas possíveis explicações para a evolução cromossômica das espécies brasileiras do grupo *boliviensis*: I) todos os cariótipos apareceram independentemente; e II) o  $2n=40$  apareceu inicialmente e duas fusões produzidas deram origem ao  $2n=36$  e uma fusão independente deu origem ao  $2n=34$ .

No capítulo 4, discutimos sobre a importância do DNA repetitivo (em tandem e dispersos) e seu impacto nos genomas. Evidenciamos, com os experimentos de FISH com sondas de sete motifs microssatélites e do elemento transponível, *L1*, a correlação entre as sequências repetitivas e os pontos de quebras e rearranjos cromossômicos que dão origem aos diferentes citótipos de *C. minutus*. Além disso, identificamos a perna de *L1-like* nos diferentes citótipos de *C. minutus*, o que pode ser uma das causas da instabilidade cromossômica que acarreta o grande número de rearranjos e diferentes citótipos para a espécie.

No capítulo 5, utilizamos o conjunto de sondas cromossômicas de *C. flamarioni*, na aplicação da técnica de FISH em duas espécies com alto grau de variação cariotípica, *C. minutus* e *C. lami*. Comparamos os 7 citótipos parentais de *C. minutus* e os 4 citótipos parentais de *C. lami* onde corroboramos os rearranjos anteriormente propostos por Freitas (1997, 2006) utilizando dados de citogenética clássica. A partir dos mapas comparativos entre as duas espécies, analisamos os mecanismos de especiação cromossômica que agem na diversificação destas espécies, visto que são espécies irmãs e que estas diferenças cariotípicas não são suficientes para agirem



como barreira efetiva para a reprodução entre as duas espécies. Além disso este é o segundo trabalho de pintura cromossômica em espécies de *Ctenomys*.

Além disso, foi possível testar e reforçar o grande potencial do gênero, *Ctenomys*, como organismo modelo para o estudo da evolução cromossômica, como havia sido sugerido por (Bidau et al. 2003), abrindo portas para novos estudos em *Ctenomys*, principalmente, utilizando citogenética molecular e relacionando dados citogenéticos e filogenias.

Ademais durante o período do doutorado foram realizadas colaborações em com outros pesquisadores resultando em duas publicações que podem ser vistas na sessão apêndices desta tese.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson S, Yates TL and Cook J a (1987) Notes on Bolivian Mammals 4: The Genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the Eastern Lowlands. *Am Museum Novit* 2891:1–20.

Araújo NP, Sena RS, Bonvicino CR, Kuhn GCS and Svartman M (2021) SINE-B1 Distribution and Chromosome Rearrangements in the South American *Proechimys* gr. *goeldii* (Echimyidae, Rodentia). *Cytogenet Genome Res* 161:6–13. doi: 10.1159/000513106

Argüelles CF, Suárez P, Giménez MD and Bidau CJ (2001) Intraspecific chromosome variation between different populations of *Ctenomys dorbignyi* (Rodentia, ctenomyidae) from Argentina. *Acta Theriol (Warsz)* 46:363–373. doi: 10.1007/bf03192443

Azevedo MFC De, Oliveira C, Pardo BG, Martínez P and Foresti F (2005) Chromosome banding and 18S rDNA in situ hybridization analysis of seven species of the family Achiridae (Teleostei: Pleuronectiformes). *Genetica* 125:125–132. doi: 10.1007/s10709-005-4921-7

Baker RJ and Bickham JW (1986) Speciation by monobrachial centric fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:8245–8248. doi: 10.1073/pnas.83.21.8245

Baker RJ and Bickham JW (1980) Karyotypic evolution in bats: Evidence of extensive and conservative chromosomal evolution in closely related tax a. *Syst Biol* 29:239–253. doi: 10.1093/sysbio/29.3.239

Bakloushinskaya I, Lyapunova EA, Saidov AS, Romanenko SA, O'Brien PCM, Serdyukova NA, Ferguson-Smith MA, Matveevsky SN and Bogdanov AS (2019) Rapid chromosomal evolution in enigmatic mammal with XX in both sexes, the Alay mole vole *Ellobius alaicus* Vorontsov et al., 1969 (Mammalia, Rodentia). *Comp Cytogenet* 13:147–177. doi: 10.3897/compcytogen.v13i2.34224

Bakloushinskaya I, Romanenko S, Serdukova N, Graphodatsky A and Lyapunova E (2013) A new form of the mole vole *Ellobius tancrei* Blasius, 1884 (Mammalia, Rodentia) with the lowest chromosome number. *Comp Cytogenet* 7:163–169. doi:

10.3897/compcytogen.v7i2.5350

Barton NH (1979) Gene flow past a cline. *Heredity (Edinb)* 43:333–339. doi: 10.1038/hdy.1979.86

Beklemisheva VR, Romanenko SA, Biltueva LS, Trifonov VA, Vorobieva N V., Serdukova NA, Rubtsova N V., Brandler O V., O'Brien PCM, Yang F et al. (2011) Reconstruction of karyotype evolution in core Glires. I. The genome homology revealed by comparative chromosome painting. *Chromosom Res* 19:549–565. doi: 10.1007/s10577-011-9210-y

Bidau CJ and de Avila-Pires FD (2009) On the type locality of *Ctenomys bicolor miranda ribeiro*, 1914 (Rodentia: Ctenomyidae). *Mastozool Neotrop* 16:445–447.

Bidau CJ, Martí DA and Gliménez MD (2003) Two exceptional South American models for the study of chromosomal evolution: the tucura *Dicroplus pratensis* and the tucotucos of the genus *Ctenomys*. *Hist Nat* 11:53–72.

Biet E, Sun J-S and Dutreix M (1999) Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Res* 27:596–600. doi: 10.1093/nar/27.2.596

Bourque G, Burns KH, Gehring M, Gorbunova V, Seluanov A, Hammell M, Imbeault M, Izsvák Z, Levin HL, Macfarlan TS et al. (2018) Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biol* 19:1–12. doi: 10.1186/s13059-018-1577-z

Caraballo DA and Rossi MS (2018) Spatial and temporal divergence of the torquatus species group of the subterranean rodent *Ctenomys*. *Contrib to Zool* 87:11–24. doi: 10.1163/18759866-08701002

Carleton MD and Musser GG (2005) Order rodentia. In: Wilson D and Reeder D (eds) *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, USA, pp 745–1601

Carnovale CS, Fernández GP, Merino ML and Mora MS (2021) Redefining the Distributional Boundaries and Phylogenetic Relationships for Ctenomids From Central Argentina. *Front Genet* 12:1–16. doi: 10.3389/fgene.2021.698134

Casavant NC, Scott L, Cantrell MA, Wiggins LE, Baker RJ and Wichman HA (2000)

The end of the LINE?: lack of recent L1 activity in a group of South American rodents. *Genetics* 154:1809–17.

Cioffi MB, Martins C, Bertollo LACC, Vicari MR, Rebordinos L and Bertollo LACC (2010) Differentiation of the XY sex chromosomes in the fish *hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae): Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. *Chromosom Res* 9:176–185. doi: 10.1159/000309726

Contreras LC, Torres-Mura JC and Spotorno AE (1990) The largest known chromosome number for a mammal, in a South American desert rodent. *Experientia* 46:506–508.

Cook J a, Anderson S and Yates TL (1990) Bolivian Mammals 6. The Genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the highlands. *Am Museum Novit* 2980:1–27.

Cook JAC and Salazar-Ravo J (2004) Heterochromatin Variation Among the Chromosomally Diverse Tuco-Tucos ( Rodentia : Ctenomyidae ) From Bolivia. In: SÁNCHEZ-CORDERO V and MEDELLÍN RA (eds) *Contribuciones Mastozoológicas en homenaje a Bernardo Villa*. Instituto de Biología e Instituto de Ecología, UNAM, México, pp 129–142

Coşkun Y, Ulutürk S and Yürümez G (2006) Chromosomal diversity in mole-rats of the species *Nannospalax ehrenbergi* (Rodentia: Spalacidae) from South Anatolia, Turkey. *Mamm Biol* 71:244–250. doi: 10.1016/j.mambio.2006.02.005

Coyne JA and Allen Orr H (1998) The evolutionary genetics of speciation. *Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci* 353:287–305. doi: 10.1098/rstb.1998.0210

Coyne JA, Meyers W, Crittenden AP and Sniegowski P (1993) The fertility effects of pericentric inversions in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 134:487–496. doi: 10.1093/genetics/134.2.487

de Freitas TRO, Fernandes FA, Fornel R and Roratto PA (2012) An endemic new species of tuco-tuco, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae), with a restricted geographic distribution in southern Brazil . *J Mammal* 93:1355–1367. doi: 10.1644/12-mamm-a-007.1

De Santi NA, Verzi DH, Olivares AI, Piñero P, Álvarez A and Morgan CC (2021) A new

Pleistocene *Ctenomys* and divergence dating of the hyperdiverse South American rodent family Ctenomyidae. *J Syst Palaeontol* 19:377–392. doi: 10.1080/14772019.2021.1910583

Del Valle JC, Lohfelt MI, Comparatore VM, Cid MS and Busch C (2001) Feeding selectivity and food preference of *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). *Mamm Biol* (früher *Zeitschrift für Säugetierkunde*) 66:165–173.

Deuve JL, Bennett NC, Brien PCMO and Faulkes CG (2006) Complex evolution of X and Y autosomal translocations in the giant mole-rat , *Cryptomys mechowi* (Bathyergidae). *Chromosom Res* 14:681–691.

Deuve JL, Bennett NC and Robinson TJ (2008) Chromosomal phylogeny and evolution of the African mole-rats (Bathyergidae). *Chromosom Res* 16:57–74. doi: 10.1007/s10577-007-1200-8

Dobzhansky T (1933) On the Sterility of the Interracial Hybrids in *Drosophila Pseudoobscura*. *Proc Natl Acad Sci* 19:397–403. doi: 10.1073/pnas.19.4.397

Erickson IK, Cantrell MA, Scott L and Wichman HA (2011) Retrofitting the Genome: L1 Extinction Follows Endogenous Retroviral Expansion in a Group of Muroid Rodents. *J Virol* 85:12315–12323. doi: 10.1128/JVI.05180-11

Eroğlu HE (2017) The comparison of the Felidae species with karyotype symmetry/asymmetry index (S/AI). *Punjab Univ J Zool* 32:229–235.

Fabre PH, Hautier L, Dimitrov D and P Douzery EJ (2012) A glimpse on the pattern of rodent diversification: A phylogenetic approach. *BMC Evol Biol*. doi: 10.1186/1471-2148-12-88

Ferguson-Smith MA, Yang F and O'Brien PC (1998) Comparative Mapping Using Chromosome Sorting and Painting. *ILAR J* 39:68–76.

Fernandes F, Fernández-Stolz G, Lopes C and Freitas T (2007) The conservation status of the tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae), in southern Brazil. *Brazilian J Biol* 67:839–847. doi: 10.1590/S1519-69842007000500006

Ferreira DC, Porto-Foresti F, Oliveira C and Foresti F (2011) Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. *Mob Genet Elements* 1:112–

117. doi: 10.4161/mge.1.2.16731

Fornel R, Cordeiro-Estrela P and de Freitas TRO (2018) Skull shape and size variation within and between mendocinus and torquatus groups in the genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) in chromosomal polymorphism context. *Genet Mol Biol* 41:263–272. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2017-0074

Fredga K and Bulmer MG (1988) Aberrant Chromosomal Sex-Determining Mechanisms in Mammals, with Special Reference to Species with XY Females. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 322:83–95.

Freitas TRO De (2006) Cytogenetics status of four *Ctenomys* species in the south of Brazil. *Genetica* 126:227–235. doi: 10.1007/s10709-005-1451-2

Freitas TRO De (1997) Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia-Octodontidae). *Brazilian J Genet* 20:1–7. doi: 10.1590/S0100-84551997000100001

Freitas TRO De (1994) Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia-Octodontidae) and its cytogenetic relationships with other species of the genus. *Cytogenet Cell Genet* 67:193–198.

Freitas TRO (2007) *Ctenomys lami*: The highest chromosome variability in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) due to a centric fusion/fission and pericentric inversion system. *Acta Theriol (Warsz)* 52:171–180.

Freitas TRO (1995) Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. *Stud Neotrop Fauna Environ* 30:53–59. doi: 10.1080/01650529509360941

Freitas TRO (2001) Tuco-tucos (Rodentia, Octodontidae) in Southern Brazil: *Ctenomys lami* spec. nov. Separated from *C. minutus* Nehring 1887. *Stud Neotrop Fauna Environ* 36:1–8. doi: 10.1076/snfe.36.1.1.8882

Freitas TRO (2021) Speciation Within the Genus *Ctenomys*: An Attempt to Find Models. In: Freitas TRO de, Gonçalves GL and Maestri R (eds) *Tuco-Tucos*. Springer International Publishing, Cham, pp 43–66

Freitas TRO and Lessa EP (1984) Cytogenetics and Morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Octodontidae). *J Mammal* 65:637–642.

- Freygang CC, Marinho JR and de Freitas TRO (2004) New Karyotypes and Some Considerations about the Chromosomal Diversification of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) on the Coastal Plain of the Brazilian State of Rio Grande do Sul. *Genetica* 121:125–132. doi: 10.1023/B:GENE.0000040376.56321.be
- Futuyma DJ and Mayer GC (1980) Non-Allopatric Speciation in Animals. *Syst Zool* 29:254. doi: 10.2307/2412661
- Gallardo M (1979) Las especies chilenas de *Ctenomys* Octodontidae ). I . Estabilidad cariotípica. *Arch Biol Med Exper* 12:71–82.
- Gallardo MH (1991) Karyotypic Evolution in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae). *J Mammal* 72:11–21.
- García F, Ruiz-Herrera A, Egozcue J, Ponsà M and Garcia M (2002) Chromosomal homologies between *Cebus* and *Ateles* (Primates) based on ZOO-FISH and G-banding comparisons. *Am J Primatol* 57:177–188. doi: 10.1002/ajp.10047
- Garcia L, Ponsà M, Egozcue J and Garcia M (2000) Comparative chromosomal analysis and phylogeny in four *Ctenomys* species (Rodentia, Octodontidae). *Biol J Linn Soc* 69:103–120. doi: 10.1006/bijl.1999.0314
- Gardner AL and Patton J (1976) Karyotypic Variation In Oryzomyine Rodents (Cricetinae) With Comments On Chromosomal Evolution In The Neotropical Cricetine Complex. *Occas Pap Museum Nat Sci Louisiana State Univ*. doi: 10.31390/opmns.049
- Gava A and Freitas TRO De (2004) Microsatellite Analysis of a Hybrid Zone Between Chromosomally Divergent Populations of *Ctenomys minutus* from Southern Brazil (Rodentia: Ctenomyidae). *J Mammal* 85:1201–1206. doi: 10.1644/BEL-017.1
- Gava A and Freitas TRO (2003) Inter and intra-specific hybridization in tuco-tucos (*Ctenomys*) from Brazilian coastal plains (Rodentia: Ctenomyidae). *Genetica* 119:11–17. doi: 10.1023/A:1024465429856
- Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, Scott G, Steffen D, Worley KC, Burch PE et al. (2004) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428:493–520. doi: 10.1038/nature02426

Gimenez MD, Bidau CJ, Argüelles CF and Contreras JR (1999) Chromosomal characterization and relationship between two new species of *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) from northern Córdoba province, Argentina. *Mamm Biol* (früher *Zeitschrift für Säugetierkunde*) 64:91–106.

Giménez MD, Mirol PM, Bidau CJ and Searle JB (2002) Molecular analysis of populations of *Ctenomys* (Caviomorpha, Rodentia) with high karyotypic variability. *Cytogenet Genome Res* 96:130–136.

Grant V (1981) *Plant Speciation*. doi: 10.7312/gran92318

Graphodatsky A, Ferguson-Smith MA and Stanyon R (2012) A short introduction to cytogenetic studies in mammals with reference to the present volume. *Cytogenet Genome Res* 137:83–96. doi: 10.1159/000341502

Graphodatsky AS, Perelman PL and O'Brien SJ (2020) *Atlas of Mammalian Chromosomes*. doi: 10.1002/9781119418061

Graphodatsky AS, Trifonov VA and Stanyon R (2011) The genome diversity and karyotype evolution of mammals. *Mol Cytogenet* 4:22. doi: 10.1186/1755-8166-4-22

Graphodatsky AS, Yang F, Dobigny G, Romanenko SA, Biltueva LS, Perelman PL, Beklemisheva VR, Alkalaeva EZ, Serdukova NA, Ferguson-Smith MA et al. (2008) Tracking genome organization in rodents by Zoo-FISH. *Chromosom Res* 16:261–274. doi: 10.1007/s10577-007-1191-5

Grützner F, Himmelbauer H, Paulsen M, Ropers HH and Haaf T (1999) Comparative mapping of mouse and rat chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 55:306–13. doi: 10.1006/geno.1998.5658

Guilly M-N, Fouchet P, Chamisso P, Schmitz A and Dutrillaux B (1999) Comparative karyotype of rat and mouse using bidirectional chromosome painting. *Chromosom Res* 7:213–221. doi: 10.1023/A

Howell WM and Black D a (1980) Department of Biology, Samford University, Birmingham (Alabama 35209, USA), 14 January 1980 Effects of anesthesia, surgical manipulation and dehydration on the nucleic acid and protein content of the pituitary and hypothalamus of the frog ~ *Institut. Experientia* 1014–1015. doi:



10.1007/BF01953855

Khan H, Smit A and Boissinot S (2006) Molecular evolution and tempo of amplification of human LINE-1 retrotransposons since the origin of primates. *Genome Res* 16:78–87. doi: 10.1101/gr.4001406

Kiblicky P and Reig OA (1966) Variation in Chromosome Number within the Genus *Ctenomys* and Description of the Male Karyotype of *Ctenomys talarum talarum* Thomas. *Nature* 212:436–438. doi: 10.1038/212436a0

Kidwell MG (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115:49–63. doi: 10.1023/A:1016072014259

Kubat Z, Hobza R, Vyskot B and Kejnovsky E (2008) Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. 356:350–356. doi: 10.1139/G08-024

Kubiak BB, Kretschmer R, Leipnitz LT, Maestri R, de Almeida TS, Borges LR, Galiano D, Pereira JC, de Oliveira EHC, Ferguson-Smith MA et al. (2020) Hybridization between subterranean tuco-tucos (Rodentia, Ctenomyidae) with contrasting phylogenetic positions. *Sci Rep* 10:1–14. doi: 10.1038/s41598-020-58433-5

Lacey E, Patton J and Cameron G (2000) *Life Underground*. Chicago, Illinois Univ. Chicago Press.

Lande R (1985) The fixation of chromosomal rearrangements in a subdivided population with local extinction and colonization. *Heredity (Edinb)* 54:323–332. doi: 10.1038/hdy.1985.43

Lanzone C, Bidau CJ, Giménez MD and Santos JL (2002) Synaptic behaviour and morphological modifications of the X and Y chromosomes during pachytene in three species of *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). *Genome* 45:1110–1115. doi: 10.1139/g02-075

Le Scouarnec S and Gribble SM (2012) Characterising chromosome rearrangements: Recent technical advances in molecular cytogenetics. *Heredity (Edinb)* 108:75–85. doi: 10.1038/hdy.2011.100

Leipnitz LT, Fornel R, Ribas LEJ, Kubiak BB, Galiano D and de Freitas TRO (2018) Lineages of Tuco-Tucos (Ctenomyidae: Rodentia) from Midwest and Northern Brazil:

Late Irradiations of Subterranean Rodents Towards the Amazon Forest. *J Mamm Evol.* doi: 10.1007/s10914-018-9450-0

Lemskaya NA, Romanenko SA, Golenishchev FN, Rubtsova N V., Sablina O V., Serdukova NA, O'Brien PCM, Fu B, Yiğit N, Ferguson-Smith MA et al. (2010) Chromosomal evolution of Arvicolinae (Cricetidae, Rodentia). III. Karyotype relationships of ten *Microtus* species. *Chromosom Res* 18:459–471. doi: 10.1007/s10577-010-9124-0

Lewis H (1966) Speciation in Flowering Plants. *Science* (80- ) 152:167–172. doi: 10.1126/science.152.3719.167

Li Y, Korol AB, Fahima T, Beiles A and Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11:2453–2465. doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x

Liu Z, Li P, Kocabas A, Karsi A and Ju Z (2001) Microsatellite-Containing Genes from the Channel Catfish Brain: Evidence of Trinucleotide Repeat Expansion in the Coding Region of Nucleotide Excision Repair Gene RAD23B. *Biochem Biophys Res Commun* 289:317–324. doi: 10.1006/bbrc.2001.5978

Lizarralde M, Deferrari G, Álvarez S, Escobar J, Evolutiva D, *Ctenomys* EN, Variación M, Cromosómicas BDEF, Lizarralde M, Deferrari G et al. (2001) DIFERENCIACIÓN EVOLUTIVA EN *Ctenomys* ALOZÍMICA Y CONSIDERACIONES. *Interciencia* 26:13–17.

Londoño-Gaviria M, Teta P, Ríos SD and Patterson BD (2019) Redescription and phylogenetic position of *Ctenomys dorsalis* Thomas 1900, an enigmatic tuco tuco (Rodentia, Ctenomyidae) from the Paraguayan Chaco. *Mammalia* 83:227–236. doi: 10.1515/mammalia-2018-0049

Lopes CM, Ximenes SSF, Gava A and de Freitas TRO (2013) The role of chromosomal rearrangements and geographical barriers in the divergence of lineages in a South American subterranean rodent (Rodentia: Ctenomyidae: *Ctenomys minutus*). *Heredity* (Edinb) 111:293–305. doi: 10.1038/hdy.2013.49

López-Flores I and Garrido-Ramos MA (2012) The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Genome Dyn* 7:1–28. doi: 10.1159/000337118

Malizia AI, Zenuto RR and Busch C (1995) Demographic and reproductive attributes of dispersers in two populations of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tucutuco). *Can J Zool* 73:732–738.

Martins C (2007) Chromosomes and Repetitive DNAs: A Contribution to the Knowledge of the Fish Genome. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F and Kapoor B (eds) *Fish Cytogenetics*. Science Publisher, USA, pp 421–432

Martins C, Cabral-de-mello DC, Valente T, Mazzuchelli J and Oliveira SG De (2010) Cytogenetic Mapping and Contribution to the Knowledge of Animal Genomes Chromosomes as a Tool for Understanding. In: Urbano K V. (ed) *Advances in Genetics Research*. Nova Science Publishers, pp 1–81

Mascheretti S, Mirol PM, Giménez MD, Bidau CJ, Contreras JR and Searle JB (2000) Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys* (Ctenomyidae, Octodontoidea), based on mitochondrial cytochrome b sequences. *Biol J Linn Soc* 70:361–376. doi: 10.1006/bijl.1999.0394

Massarini A, Mizrahi D, Tiranti S, Toloza A, Luna F and Schleich CE (2002) Extensive chromosomal variation in *Ctenomys talarum talarum* from the Atlantic Coast of Buenos Aires Province, Argentina (Rodentia: Octodontidae). *Mastozool Neotrop* 9:199–207.

Massarini AI, Barros MA, Ortells MO and Reig OA (1991) Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina (Rodentia: Octodontidae). *Genetica* 83:131–144. doi: 10.1007/BF00058530

Massarini AI, Barros MA, Ortells MO and Reig OA (1995) Variabilidad cromosómica en *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae) de Argentina. *Rev Chil Hist Nat* 68:207–214.

Miranda Ribeiro A (1914) *História Natural: Zoologia*. Comissão de Linhas Telegráficas Estratégicas de Matto-Grosso ao Amazonas, Rio de Janeiro

Musser GG, Carleton MD, Brothers EM and Gardner AL (1998) Systematic studies of oryzomyine rodents (Muridae, Sigmodontinae): Diagnoses and distributions of species formerly assigned to *Oryzomys* “Capito.” *Bull Am Museum Nat Hist* 1–337.

Navarro A and Barton NH (2003a) Accumulating postzygotic isolation genes in

parapatry: A new twist on chromosomal speciation. *Evolution* (N Y) 57:447–459. doi: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb01537.x

Navarro A and Barton NH (2003b) Chromosomal speciation and molecular divergence - Accelerated evolution in rearranged chromosomes. *Science* (80- ) 300:321–324. doi: 10.1126/science.1080600

Nevo E (1979) Adaptive Convergence and Divergence of Subterranean Mammals. *Annu Rev Ecol Syst* 10:269–308. doi: 10.1146/annurev.es.10.110179.001413

Noor MAF, Gratos KL, Bertucci LA and Reiland J (2001) Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12084–12088. doi: 10.1073/pnas.221274498

Novello A, Cortinas MN, Suárez M and Musto H (1996) Cytogenetic and molecular analysis of the satellite DNA of the genus *Ctenomys* (Rodentia Octodontidae) from Uruguay. *Chromosom Res* 4:335–339. doi: 10.1007/BF02257268

Novello A and Lessa EP (1986) G-Band homology in 2 karyomorphs of the *Ctenomys pearsoni* complex (Rodentia; Octodontidae) of neotropical fossorial rodents. *Z Säugetierkd* 51:378–380.

Novello A and Villar S (2006) Chromosome plasticity in *Ctenomys* (Rodentia Octodontidae): Chromosome 1 evolution and heterochromatin variation. *Genetica* 127:303–309. doi: 10.1007/s10709-005-5048-6

Ortells M (1995) Phylogenetic analysis of G-banded karyotypes among the South American subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae), with special reference to chromosomal evolution and speciation. *Biol J Linn Soc* 54:43–70. doi: 10.1016/0024-4066(95)90036-5

Ortells MO, Contreras JR and Reig OAI (1990) New *Ctenomys* karyotypes ( Rodentia , Octodontidae ) from north-eastern Argentina. 189–201.

Parada A, D'Elfa G, Bidau CJ and Lessa EP (2011) Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *J Mammal* 92:671–682. doi: 10.1644/10-MAMM-A-121.1

Patton JL (1967) Chromosome studies of certain pocket mice, genus *Perognathus*

(Rodentia: heteromyidae). *J Mammal* 48:27–37. doi: 10.2307/1378167

Patton JL, Pardiñas UFJ and D’Elía G (2015) *Mammals of South America, Volume 2*. Nature. doi: 10.7208/chicago/9780226169606.001.0001

Patton JL and Sherwood SW (1983) Chromosome evolution and speciation in rodents. *Annu Rev Ecol Syst* 14:139–158. doi: 10.1016/j.pbi.2007.01.001

Patton JL and Sherwood SW (1982) Genome evolution in pocket gophers (genus *Thomomys*). *Chromosoma* 85:149–162. doi: 10.1007/BF00327464

Pavlova S V., Lebedev VS, Yakushov VD, Zhu Y, Fang Y, Sun YH and Sheftel BI (2021) High diversity of small insectivorous mammals on Qinghai–Tibet Plateau and first description of karyotype for four endemics of China. *Sci Rep* 11:1–11. doi: 10.1038/s41598-021-03809-4

Petit D, Couturier J, Viegas-Péquignot E, Lombard M and Dutrillaux B (1984) Great degree of homology between the ancestral karyotype of squirrels (rodents) and that of primates and carnivores. *Ann génétique* 27:201–12.

Pokorná M, Kratochvíl L and Kejnovský E (2011) Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genet* 12:90. doi: 10.1186/1471-2156-12-90

Reig OA (1989) Karyotypic repatterning as a triggering factor in cases of explosive speciation. *Evol Biol unstable Popul* 246–289.

Reig OA, Bush C, Ortells MO and Contreras JR (1990) An overview of evolution, systematic, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. [In: *Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular level*. E. Nevo and O. A. Reig, eds]. Alan R. Liss, New York. In: Nevo E and Reig OA (eds) *Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular level*. New York, pp 71–96

Reig OA and Kiblicky P (1968) Chromosomes in four species of rodents of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) from Argentina. *Experientia* 24:274–276. doi: 10.1007/BF02152816

Reig OA and Kiblicky P (1969) Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) - A Progress Report. *Chromosoma*. doi: 10.1007/BF00331531

Reig OA, Massarini AI, Ortells MO, Barros MA, Dyzenchouz FJ and Tiranti SI (1992) New karyotypes and C-banding patterns of the subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. *Mammalia* 56:603–624. doi: 10.1515/mamm.1992.56.4.603

Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *TRENDS Ecol Evol* 16:351–358.

Rocchi M, Archidiacono N, Schempp W, Capozzi O and Stanyon R (2012) Centromere repositioning in mammals. *Heredity (Edinb)* 108:59–67. doi: 10.1038/hdy.2011.101

Romanenko SA, Lyapunova EA, Saidov AS, O'Brien PCM, Serdyukova NA, Ferguson-Smith MA, Graphodatsky AS and Bakloushinskaya I (2019) Chromosome Translocations as a Driver of Diversification in Mole Voles *Ellobius* (Rodentia, Mammalia). *Int J Mol Sci* 20:4466. doi: 10.3390/ijms20184466

Romanenko SA, Perelman PL, Trifonov VA and Graphodatsky AS (2012) Chromosomal evolution in Rodentia. *Heredity (Edinb)* 108:4–16. doi: 10.1038/hdy.2011.110

Romanenko SA, Perelman PL, Trifonov VA, Serdyukova NA, Li T, Fu B, O'Brien PCM, Ng BL, Nie W, Liehr T et al. (2015) A First Generation Comparative Chromosome Map between Guinea Pig (*Cavia porcellus*) and Humans. *PLoS One* 10:e0127937. doi: 10.1371/journal.pone.0127937

Romanenko SA, Serdyukova NA, Perelman PL, Pavlova S V., Bulatova NS, Golenishchev FN, Stanyon R and Graphodatsky AS (2017) Intrachromosomal rearrangements in rodents from the perspective of comparative region-specific painting. *Genes (Basel)* 8:1–10. doi: 10.3390/genes8090215

Romanenko SA, Sitnikova NA, Serdukova NA, Perelman PL, Rubtsova N V., Bakloushinskaya IY, Lyapunova EA, Just W, Ferguson-Smith MA, Yang F et al. (2007) Chromosomal evolution of Arvicolinae (Cricetidae, Rodentia). II. the genome homology of two mole voles (genus *Ellobius*), the field vole and golden hamster revealed by

comparative chromosome painting. *Chromosom Res* 15:891–897. doi: 10.1007/s10577-007-1171-9

Roratto PA, Fernandes FA and de Freitas TRO (2015) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys torquatus*: An evaluation of the riverine barrier hypothesis. *J Biogeogr* 42:694–705. doi: 10.1111/jbi.12460

Rosi MI, Cona MI, Videla F, Puig S and Roig VG (2000) Architecture of *Ctenomys* (Rodentia) burrows from two habitats differing in abundance and complexity of vegetation. *Acta Theriol (Warsz)* 45:491–505.

Sakamoto Y and Zacaro AA (2009) LEVAN, an ImageJ Plugin for Morphological Cytogenetic Analysis of Mitotic and Meiotic Chromosomes.

Schemske DW (2000) Understanding the Origin of Species. *Evolution (N Y)* 54:1069. doi: 10.1554/0014-3820(2000)054[1069:utoos]2.3.co;2

Scherthan H, Cremer T, Arnason U, Weier H, Lima-de-Faria A and Fronicke L (1994) Comparative chromosome painting discloses homologous segments in distantly related mammals. *Nat Genet* 6:340–344. doi: 10.1038/ng1294-340

Seabright M (1972) The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. *Chromosoma* 36:204–210. doi: 10.1007/BF00285214

Searle JB (1998) Speciation, Chromosomes, and Genomes. *Genome Res* 8:1–3. doi: 10.1101/gr.8.1.1

Shaw DD, Coates DJ and Wilkinson P (1986) Estimating the genic and chromosomal components of reproductive isolation within and between subspecies of the grasshopper *Caledia captiva*. *Can J Genet Cytol* 28:686–695. doi: 10.1139/g86-098

Sikes RS and The animal Care and use committee of the American Society of mammalogists (2016) 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education: *J Mammal* 97:663–688. doi: 10.1093/jmammal/gyw078

Silva MJ and Yonenaga-Yassuda Y (1998) Karyotype and chromosomal polymorphism of an undescribed *Akodon* from Central Brazil, a species with the lowest known diploid

chromosome number in rodents. *Cytogenet Cell Genet* 81:46–50. doi: 10.1159/000015006

Silva MJJ and Yonenaga-Yassuda Y (2004) B chromosomes in Brazilian rodents. *Cytogenet Genome Res* 106:257–263. doi: 10.1159/000079296

Sites JW and Moritz C (1987) Chromosomal Evolution and Speciation Revisited. *Syst Zool* 36:153–174. doi: 10.2307/2413266

Sitnikova NA, Romanenko SA, O'Brien PCM, Perelman PL, Fu B, Rubtsova N V., Serdukova NA, Golenishchev FN, Trifonov VA, Ferguson-Smith MA et al. (2007) Chromosomal evolution of Arvicolinae (Cricetidae, Rodentia). I. The genome homology of tundra vole, field vole, mouse and golden hamster revealed by comparative chromosome painting. *Chromosom Res* 15:447–456. doi: 10.1007/s10577-007-1137-y

Slamovits CH, Cook JA, Lessa EP and Susana Rossi M (2001) Recurrent Amplifications and Deletions of Satellite DNA Accompanied Chromosomal Diversification in South American Tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): A Phylogenetic Approach. *Mol Biol Evol* 18:1708–1719. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003959

Stanyon R, Yang F, Cavagna P, O'Brien PC, Bagga M, Ferguson-Smith M a and Wienberg J (1999) Reciprocal chromosome painting shows that genomic rearrangement between rat and mouse proceeds ten times faster than between humans and cats. *Cytogenet Cell Genet* 84:150–5. doi: 15244

Stebbins GL (1958) The Inviability, Weakness, and Sterility of Interspecific Hybrids. pp 147–215

Stolz JFB, Gonçalves GL, Leipnitz L and Freitas TRO (2013) DNA-based and geometric morphometric analysis to validate species designation: A case study of the subterranean rodent *Ctenomys bicolor*. *Genet Mol Res* 12:5023–5037. doi: 10.4238/2013.October.25.1

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304–306. doi: 10.1016/0014-4827(72)90558-7



Svartman M, Stone G and Stanyon R (2005) Molecular cytogenetics discards polyploidy in mammals. *Genomics* 85:425–430. doi: 10.1016/j.ygeno.2004.12.004

Templeton AR (1981) Mechanisms of Speciation - A Population Genetic Approach. *Annu Rev Ecol Syst* 12:23–48. doi: 10.1146/annurev.es.12.110181.000323

Teta P and D'Elía G (2020) Uncovering the species diversity of subterranean rodents at the end of the World: three new species of Patagonian tuco-tucos (Rodentia, Hystricomorpha, Ctenomys) . *PeerJ* 8:e9259. doi: 10.7717/peerj.9259

Thomson RL, Westerman M and Murray ND (1984) B chromosomes in *Rattus fuscipes* I. Mitotic and meiotic chromosomes and the effects of B chromosomes on chiasma frequency. *Heredity (Edinb)* 52:355–362. doi: 10.1038/hdy.1984.43

Tomasco IH and Lessa EP (2007) Phylogeography of the tuco-tuco *Ctenomys pearsoni*: mtDNA variation and its implications for chromosomal differentiation. *quintessential Nat Honor life Leg Oliver P Pearson* 859–882.

Trifonov VA, Kosyakova N, Romanenko SA, Stanyon R, Graphodatsky AS and Liehr T (2010) New insights into the karyotypic evolution in muroid rodents revealed by multicolor banding applying murine probes. *Chromosom Res* 18:265–275. doi: 10.1007/s10577-010-9110-6

Trifonov VA, Perelman PL, Kawada SI, Iwasa MA, Oda SI and Graphodatsky AS (2002) Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonoides* (Carnivora). *Chromosom Res* 10:109–116. doi: 10.1023/A:1014940800901

Upham NS and Patterson BD (2015) Evolution of caviomorph rodents: a complete phylogeny and timetree for living genera. *Biol Caviomorph Rodents Divers Evol* 1:63–120.

Van Daele PAAG, Dammann P, Meier JL, Kawalika M, Van De Woestijne C and Burda H (2004) Chromosomal diversity in mole-rats of the genus *Cryptomys* (Rodentia: Bathyergidae) from the Zambezian region: With descriptions of new karyotypes. *J Zool* 264:317–326. doi: 10.1017/S0952836904005825

Verma R and Babu A (1996) Human Chromosomes: Principles & Techniques. *Mol*

Reprod Dev 43:134–134. doi: 10.1002/mrd.1996.1080430105

Viegas-PÉquignot E, Petit D, Benazzou T, Prod'homme M, Lombard M, Hoffschir F, Descailleaux J and Dutrillaux B (1986) Phylogénie chromosomique chez les Sciuridae, Gerbillidae et Muridae, et étude d'espèces appartenant à d'autres familles de Rongeurs. *Mammalia* 50:163–202. doi: 10.1515/mamm.1986.50.s1.163

Villar S, Martínez S and Novello A (2014) G-banding patterns of the genus *Ctenomys* from Uruguay (Rodentia Ctenomyidae): high karyotype variation but chromosome arm conservation. *Caryologia* 67:178–184. doi: 10.1080/00087114.2014.931640

Volff J, Körting C, Meyer A and Scharl M (2001) Evolution and Discontinuous Distribution of Rex3 Retrotransposons in Fish. *Mol Biol Evol* 18:427–431. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003819

Walsh JB (1982) Rate of accumulation of reproductive isolation by chromosome rearrangements. *Am Nat* 120:510–532. doi: 10.1086/284008

Ward OG, Graphodatsky AS, Wursterhill DH, Eremina VR, Park JP and Yu Q (1991) Cytogenetics of Beavers - a Case of Speciation by Monobrachial Centric Fusions. *Genome* 34:324–328.

Warren WC, Jasinska AJ, García-pérez R, Svardal H, Tomlinson C, Rocchi M, Archidiacono N, Capozzi O, Minx P, Montague MJ et al. (2015) The genome of the vervet (*Chlorocebus aethiops sabaesus*). *Genome Res* 4:1921–1933.

Wells JN and Feschotte C (2020) A Field Guide to Eukaryotic Transposable Elements. *Annu Rev of Genetics A* 54:1–23. doi: 10.1002/9781118500156.ch2

White MJD (1978) *Modes of Speciation*. San Francisco

White MJD (1973) *Animal cytology and evolution*. Cambridge University Press

Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O et al. (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 8:973–982. doi: 10.1038/nrg2165-c4

Wilson DE and Reeder DM (2005) *Mammal Species of the World*. Editora Johns Hopkins University.

Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T and Cioffi MB (2014) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): insights into the differentiation of the Z and W chromosomes. PLoS One 9:e90946. doi: 10.1371/journal.pone.0090946

Zenuto R and Busch C (1995) Influence of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (Tuco-tuco) in a sand-dune grassland. Int J Mamm Biol 60:277–285.

## APÊNDICES

Outras publicações científicas realizadas em colaboração ao longo do doutorado.

### Artigo 1





Publicado na revista *Genetics and Molecular Biology* parte da dissertação de mestrado de Anelise Fernandes e Silva, versão completa disponível em <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2021-0213>.



*Genetics and Molecular Biology*, 45, 2, e20210213 (2022)  
Copyright © Sociedade Brasileira de Genética.  
DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2021-0213>

Research Article  
Animal Genetics

## Study of four Neotropical species of tree crickets *Oecanthus* Serville, 1831 (Orthoptera, Gryllidae) using cytogenetic and molecular markers

Anelise Fernandes e Silva<sup>1,2</sup>, Thays Duarte de Oliveira<sup>1</sup> , Natasha Ávila Bertocchi<sup>2</sup> ,  
Vera Lúcia da Silva Valente<sup>1,2</sup> , Edison Zefa<sup>3</sup> and Maríndia Deprá<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Departamento de Zoologia, Ecologia e Genética, Capão do Leão, RS, Brazil.

### Abstract

Karyotypes in the worldwide subfamily Oecanthinae show variations in diploid number, chromosome morphology, and sex-chromosome system. This study described the chromosome set and phylogenetic relationships of four Neotropical species, *Oecanthus lineolatus*, *O. valensis*, *O. pallidus*, and *O. pictus*. We used classical cytogenetics and Bayesian Inference for phylogenetic reconstruction, using the mitochondrial genes *COI*, *12S rRNA*, and *16S rRNA*; and analyzed the phylogenetic patterns of changes in chromosome numbers, using ChromEvol. We observed differences in chromosome number among species and two different sex-chromosome systems. *Oecanthus pictus* showed  $2n = 21$ ,  $X0♂/22, XX♀$ ; *O. lineolatus*,  $2n = 20$ ,  $XY♂/XX♀$ ; and *O. valensis* and *O. pallidus*,  $2n = 18$ ,  $XY♂/XX♀$ . The karyotype of *Oecanthus* was asymmetric, one group with large chromosomes and variation in heterochromatin distribution, and another with small acrocentric chromosomes. The phylogenetic tree recovered two main groups: one with the Palearctic species and another with species from different bioregions, but with low posterior probability. The Neotropical species grouped separately, *O. valensis* and *O. pictus* with Nearctic and Ethiopian species, and *O. pallidus* and *O. lineolatus* in another, well-supported clade. Together, the phylogenetic and chromosome data suggest descending dysploidy events during the evolution of the group.

**Keywords:** Insect, karyotype, Chromosome, Bayesian Inference, Oecanthinae.

Received: July 22, 2021; Accepted: January 31, 2022.

## Artigo 2

Publicado na revista *Genetics and Molecular Biology* parte da tese de doutorado de Natasha Avila Bertocchi, versão completa disponível em <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2021-0287>.








*Genetics and Molecular Biology*, 45, 2, e20210287 (2022)  
Copyright © Sociedade Brasileira de Genética.  
DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2021-0287>

Research Article

Animal Genetics

## Interpopulation variation of transposable elements of the *hAT* superfamily in *Drosophila willistoni* (Diptera: Drosophilidae): *in-situ* approach

Natasha Ávila Bertocchi<sup>1</sup> , Thays Duarte de Oliveira<sup>2</sup> , Maríndia Deprá<sup>1,2</sup> , Beatriz Goñi<sup>3</sup>   
and Vera Lúcia S. Valente<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.



### Abstract

Transposable elements are abundant and dynamic part of the genome, influencing organisms in different ways through their presence or mobilization, or by acting directly on pre- and post-transcriptional regulatory regions. We compared and evaluated the presence, structure, and copy number of three *hAT* superfamily transposons (*hobo*, *BuT2*, and *mar*) in five strains of *Drosophila willistoni* species. These *D. willistoni* strains are of different geographical origins, sampled across the north-south occurrence of this species. We used sequenced clones of the *hAT* elements in fluorescence *in-situ* hybridizations in the polytene chromosomes of three strains of *D. willistoni*. We also analyzed the structural characteristics and number of copies of these *hAT* elements in the 10 currently available sequenced genomes of the *willistoni* group. We found that *hobo*, *BuT2*, and *mar* were widely distributed in *D. willistoni* polytene chromosomes and sequenced genomes of the *willistoni* group, except for *mar*, which is restricted to the subgroup *willistoni*. Furthermore, the elements *hobo*, *BuT2*, and *mar* have different evolutionary histories. The transposon differences among *D. willistoni* strains, such as variation in the number, structure, and chromosomal distribution of *hAT* transposons, could reflect the genomic and chromosomal plasticity of *D. willistoni* species in adapting to highly variable environments.

**Keywords:** Transposable elements, *Drosophila willistoni*, *hAT* superfamily, polytene chromosomes.

Received: September 10, 2021; Accepted: January 31, 2022.

## ANEXOS

	<b>U F R G S</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	<b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA</b> Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 35828  
Título: Evolução cromossômica em *Ctenomys minutus* e *Ctenomys lami* (Rodentia; Ctenomyidae)

Vigência: 01/10/2018 à 30/06/2022

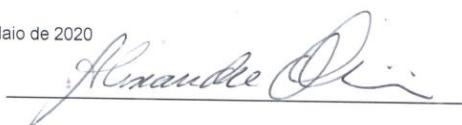
Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

THALES RENATO OCHOTORENA DE FREITAS - coordenador desde 01/10/2018  
Thays Duarte de Oliveira - Aluno de Doutorado desde 01/10/2018

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 45 indivíduos da espécie *Ctenomys minutus* e *Ctenomys lami*, provenientes da planície costeira do Estado do Rio Grande do Sul, com a finalidade de coleta, possuindo autorização da IBAMA/ICMBIO N° 14690, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Terça-Feira, 26 de Maio de 2020



ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA  
Coordenador da comissão de ética

1



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 14690-5	Data da Emissão: 23/02/2022 15:53:51	Data da Revalidação*: 01/01/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Thales Renato Ochotorena de Freitas	CPF: 238.934.600-63
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	CNPJ: 92.969.856/0001-98

#### Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Deve-se observar as as recomendações de prevenção contra a COVID-19 das autoridades sanitárias locais e das Unidades de Conservação a serem acessadas.
3	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
4	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta licença permanente NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
7	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
8	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
9	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
10	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
11	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
12	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
13	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
14	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0146900520220223

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 14690-5	Data da Emissão: 23/02/2022 15:53:51	Data da Revalidação*: 01/01/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Thales Renato Ochotorena de Freitas	CPF: 238.934.600-63
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	CNPJ: 92.969.856/0001-98

#### Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Fora de UC Federal
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal
3	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
4	Marcação de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal

#### Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	Gênero	Animalia > Chordata > Mammalia > Rodentia > Ctenomyidae > Ctenomys

*Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).*

Código de autenticação: 0146900520220223

Página 2/3





Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 14690-5	Data da Emissão: 23/02/2022 15:53:51	Data da Revalidação*: 01/01/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Thales Renato Ochotorena de Freitas	CPF: 238.934.600-63
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	CNPJ: 92.969.856/0001-98

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0146900520220223

Página 3/3



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Certidão**

**Cadastro nº A03D152**

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A03D152**  
 Usuário: **UFRGS**  
 CPF/CNPJ: **92.969.856/0001-98**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

**Espécie**

**Ctenomys Ctenomys minutus**

Título da Atividade: **Padrões filogenéticos e filogeográficos em Ctenomys minutus na Planície Costeira do Sul do Brasil**

**Equipe**

<b>Thales Renato Ochotorena de Freitas</b>	<b>UFRGS</b>
<b>Rodrigo Fornel</b>	<b>UFRGS</b>
<b>Bruno Busnello Kubiak</b>	<b>UFRGS</b>
<b>Daniel Galiano</b>	<b>UFRGS</b>
<b>Carla Martins Lopes</b>	<b>UFRGS</b>
<b>Adriana Gava</b>	<b>UFRGS</b>
<b>Cristina Claumann Freygang</b>	<b>UFRGS</b>
<b>Jorge Reppold Marinho</b>	<b>UFRGS</b>

Data do Cadastro: **05/11/2018 10:37:17**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 15:24 de 29/08/2022.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**

**Cadastro nº A03D152**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A03D152**  
 Usuário: **UFRGS**  
 CPF/CNPJ: **92.969.856/0001-98**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

**Espécie**

**Ctenomys Ctenomys minutus**

Título da Atividade: **Padrões filogenéticos e filogeográficos em Ctenomys minutus na Planície Costeira do Sul do Brasil**

**Equipe**

<b>Thales Renato Ochotorena de Freitas</b>	<b>UFRGS</b>
<b>Rodrigo Fornel</b>	<b>UFRGS</b>
<b>Bruno Busnello Kubiak</b>	<b>UFRGS</b>
<b>Daniel Galiano</b>	<b>UFRGS</b>
<b>Carla Martins Lopes</b>	<b>UFRGS</b>
<b>Adriana Gava</b>	<b>UFRGS</b>
<b>Cristina Claumann Freygang</b>	<b>UFRGS</b>
<b>Jorge Reppold Marinho</b>	<b>UFRGS</b>

Data do Cadastro: **05/11/2018 10:37:17**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **15:22** de **29/08/2022**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**