

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Genômica Comparativa dos Roedores  
Akodontinos *Akodon cursor*, *A. montensis*  
e *Necromys lasiurus* (Cricetidae: Rodentia)**

ORIENTADA: **Naiara Pereira de Araújo**

ORIENTADORA: **Dra. Marta Svartman**

COORIENTADOR: **Dr. Gustavo Campos e Silva Kuhn**

BELO HORIZONTE

Fevereiro – 2014

Naiara Pereira de Araújo

**Genômica Comparativa dos Roedores  
Akodontinos *Akodon cursor*, *A. montensis*  
e *Necromys lasiurus* (Cricetidae: Rodentia)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Genética, área de concentração “Genética Evolutiva e de Populações”.

Orientadora: Dra. Marta Svartman

Coorientador: Dr. Gustavo Campos e Silva Kuhn

BELO HORIZONTE

Fevereiro – 2014

043 Araújo, Naiara Pereira de.

Genômica comparativa dos roedores Akodontinos *Akodon cursor*, *A. montensis* e *Necromys lasiurus* (Cricetidae : Rodentia) [manuscrito] / Naiara Pereira de Araújo. – 2014.

82 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Marta Svartman. Coorientador: Gustavo Campos e Silva Kuhn.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Cariótipos – Teses. 2. Genômica comparativa. 3. Hibridação genética. 4. Akodontini (Tribo). 5. Sequências teloméricas. 6. Retroelementos. 7. Genética – Teses. 8. Genética de populações – Teses. I. Svartaman, Marta. II. Kuhn, Gustavo Campos e Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575

Dedico à minha querida mãe, à minha irmã e ao meu grande amor.

Se eu fosse um rato eu me esconderia no lixo  
Se eu fosse um rato eu não sentiria pena dos “humanos”  
Se eu fosse um rato eu não pensaria  
Se eu fosse um rato eu não sofreria  
Se eu fosse um rato eu viveria sem ouvir os humanos  
Se eu fosse um rato eu não teria pesadelos dormindo e nem acordado

Mas, infelizmente eu sou um homem e tenho que conviver com os meus.  
Eu sinto pena das pessoas que vivem pior que um rato  
Eu sinto porque penso  
Eu sofro porque ouço o que os homens dizem  
Eu tenho pesadelos porque a humanidade é um pesadelo

Parabéns senhores ratos, vocês são o que são... E são: “FELIZES”.

Américo S. Rissato

## AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos àqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho:



Ao programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais;



À FAPEMIG e ao CNPq, pelo financiamento da pesquisa, e à CAPES pela bolsa de mestrado;



À minha querida orientadora, professora Marta Svartman, pela paciência, ensinamentos e até mesmo “puxões de orelha”. Muitíssimo obrigada pela oportunidade de desenvolver mais este trabalho sob sua orientação, pela preocupação com a minha formação profissional e pela convivência, seja durante os momentos de trabalho sério ou naqueles de descontração;



Ao professor Gustavo Kuhn, pela coorientação. Muito obrigada por ter me ajudado de várias formas a enriquecer o meu trabalho;




Aos atuais e ex- alunos do Laboratório de Citogenômica Evolutiva, por todos os auxílios e, principalmente, pela amizade e pelos momentos de diversão. Fica aqui registrado o meu muitíssimo obrigada a eles: Rodrigo, Natália, Daniel, Amanda, Letícia, Guilherme, Leonardo, Radarane, Pedro, Alice e Caio;




Aos técnicos Daniel e Paixão, que sempre estão dispostos a ajudar, além da boa convivência;




À equipe do Laboratório de Genética de Microorganismos e de Biodiversidade e Evolução Molecular que estiveram de portas abertas para eu fazer experimentos, tirar dúvidas e para os momentos de descontração.

 Às minhas amigas da faculdade de Ciências Biológicas: Déborah, Mariana e Rosane. Apesar de não nos vermos mais todos os dias, sei que sempre estão torcendo por mim;

 À minha vó, que sempre apoiou os meus estudos;

 Ao meu companheiro, Anézio, que, desde que nos conhecemos, sempre me dá muita força, tanto nos meus estudos, quanto na minha vida pessoal. Eu te amo demais!;

 À minha irmã, que sempre está na torcida por mim;

 À minha querida mãe, que nunca mediu esforços em ter duas filhas estudadas e felizes e que sempre está feliz pelas nossas realizações. O título de mestrado e demais conquistas no futuro sempre serão para você.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	iii
RESUMO .....	01
ABSTRACT .....	02
1. INTRODUÇÃO .....	03
1.1. Os Roedores Akodontini .....	03
1.2. A Citogenética de Akodontini .....	12
1.3. Elementos Transponíveis .....	15
1.3.1. Elementos Transponíveis e a Subfamília Sigmodontinae	19
2. OBJETIVOS .....	21
2.1. Objetivo Geral .....	21
2.2. Objetivos Específicos .....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1. Amostras Biológicas .....	22
3.2. Métodos .....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
MANUSCRITO .....	33
Title .....	33
Abstract .....	33
Introduction .....	34
Materials and Methods .....	39
Results and Discussion .....	41
Acknowledgements .....	51
References .....	52
5. CONCLUSÕES .....	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Subordens e famílias reconhecidas de roedores .....	04
Figura 2 Área de diferenciação (cladogênese) da tribo Akodontini .....	07
Figura 3 Distribuição aproximada das espécies do gênero <i>Akodon</i> .....	09
Figura 4 Roedores akodontinos .....	11
Figura 5 Distribuição aproximada de <i>Necromys lasiurus</i> .....	12
Figura 6 Cariótipo de um macho <i>Necromys lasiurus</i> (2n=34, NF=34) .....	15
Figura 7 Principais tipos de sequências repetitivas nos genomas dos eucariotos .....	16
Figura 8 Tipos estruturais dos elementos transponíveis da classe I .....	17
Figura 9 Diagrama da filogenia de Sigmodontinae, expansão de mysTR e inativação de LINE-1 e SINE-B1 .....	20
Figura 10 Principais etapas da hibridação <i>in situ</i> com DNA genômico total (GISH) .....	27

Manuscrito: Comparative genomic *in situ* hybridization and the role of transposable elements in the karyotype evolution in Akodontini

Figure 1 Correspondence between the GTG-banded chromosomes of Akodontini .....	63
Figure 2 FISH with a telomeric probe .....	64
Figure 3 Interspecific GISH among <i>Akodon cursor</i> (ACU), <i>Akodon montensis</i> (AMO) and <i>Necromys lasiurus</i> (NLA) .....	65
Figure 4 FISH with digoxigenin-labeled transposable elements and biotin-labeled telomeric sequences in cells of Akodontini .....	66
Figure 5 Correspondence between the SINE-B1 hybridized chromosomes of <i>Akodon cursor</i> (ACU), on the left, <i>A. montensis</i> (AMO), in the middle, and <i>Necromys lasiurus</i> (NLA), on the right .....	67
Supplementary Figure 1 Control GISH experiments .....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Gêneros reconhecidos de sigmodontinos .....	05
Tabela 2 Espécies de <i>Akodon</i> e sua alocação em grupos .....	08
Tabela 3 Roedores Akodontini analisados .....	22

Manuscrito: Comparative genomic *in situ* hybridization and the role of transposable elements in the karyotype evolution in Akodontini

Table 1 Specimens analyzed .....	61
Table 2 Correspondences of GTG-banded chromosomes of <i>Akodon cursor</i> (ACU; 2n=14, FN=19), <i>Akodon montensis</i> (AMO; 2n=24, FN=42) and <i>Necromys lasiurus</i> (NLA; 2n=34, FN=34) .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

2n – Número diplóide

ACU – *Akodon cursor*

AgRONS – Marcação das regiões organizadoras de nucléolos pela prata

AMO – *Akodon montensis*

ASP – *Akodon* sp

CBG – Padrões de bandas obtidos por bário e corados com giemsa

CCD – Dispositivo de carga acoplado

cDNA – DNA complementar

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindole

DNA – Ácido desoxirribonucléico

FISH – Hibridação *in situ* fluorescente

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GAG – Proteína do capsídeo

GISH – Hibridação *in situ* fluorescente com DNA genômico total

GTG – Padrões de bandas obtidos por tripsina e giemsa

INT - Integrase

ITS (IT) – Sinais teloméricos intersticiais

Kb - Kilobases

LINE – Elementos nucleares interdispersos longos

LTR – Repetições terminais longas

MCN-M – Coleção taxonômica da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

NF (FN) – Número de braços autossômicos

NLA – *Necromys lasiurus*

ORF – Fase de leitura aberta

p – Braço curto do cromossomo

pb (bp) – Pares de base

PBS – Tampão salina-fosfato

PBT – Tampão salina-fosfato com Tween 20

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PR - Protease

q – Braço longo do cromossomo

RAPD – DNA amplificado aleatoriamente

RFLP – Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição

RONs – Regiões organizadoras de nucléolos

RNA – Ácido ribonucléico

RnaseH – Ribonuclease H

RT – Transcriptase reversa

SINE – Elementos nucleares interdispersos curtos

TE – Elementos transponíveis

## RESUMO

A tribo Akodontini caracteriza-se por altos níveis de polimorfismos cromossômicos devido a rearranjos Robertsonianos e inversões pericêntricas. Os cariótipos de *Akodon cursor* ( $2n=14$ ,  $NF=19$ ), *A. montensis* ( $2n=24$ ,  $NF=42$ ) e *Necromys lasiurus* ( $2n=34$ ,  $NF=34$ ) foram comparativamente analisados após aplicação dos padrões de bandeamento GTG e CBG. Uma grande homeologia entre os cromossomos das três espécies foi confirmada após bandeamento GTG. Após bandeamento CBG, foi possível evidenciar pouca heterocromatina centromérica na maioria dos cromossomos das três espécies. Experimentos de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando a sequência  $(TTAGGG)_n$  como sonda evidenciaram sinais teloméricos nas regiões terminais dos três cariótipos. Adicionalmente, foram verificados sinais intersticiais que sugerem origem por fusões dos pares 3, 4 e 7 de *A. montensis* e sinais mais intensos associados à heterocromatina constitutiva nos cromossomos 3, 15 e X e a parte eucromática do par 16 de *N. lasiurus*. Dessa forma, os cariótipos analisados diferiam principalmente devido a rearranjos Robertsonianos, inversões pericêntricas, reposicionamento centromérico e variação no conteúdo heterocromático.

Comparações genômicas, utilizando a técnica de hibridação *in situ* com DNA genômico total de cada espécie como sonda (GISH), demonstraram conservação da porção eucromática do genoma das espécies de *Akodon* e *Necromys*. Além disso, foi observada similaridade entre as sequências repetitivas que compõem as regiões heterocromáticas dos pares 1, 3 e 6 e do cromossomo X de *A. cursor* e do par 11 e do cromossomo X de *A. montensis*. Esses resultados mostram uma extrema conservação entre os genomas das espécies analisadas e sugerem que as diferenças estão nas regiões heterocromáticas.

Foi também verificada por FISH a distribuição dos elementos transponíveis LINE-1 (elementos nucleares interdispersos longos), SINE-B1 (elementos nucleares interdispersos curtos) e do retrovírus endógeno *mysTR* no genoma dos Akodontini analisados. Os resultados sugerem que os elementos transponíveis podem estar relacionados à enorme variação cromossômica encontrada na tribo.

**Palavras-chave:** Evolução cariotípica, GISH, Akodontini, sequências teloméricas, retroelementos

## ABSTRACT

The Akodontini tribe is characterized by a high level of chromosomal polymorphisms due to Robertsonian rearrangements and pericentric inversions. The karyotypes of *Akodon cursor* (2n=14, FN=19), *A. montensis* (2n=24, FN=42) and *Necromys lasiurus* (2n=34, FN=34) were comparatively analyzed after GTG- and CBG-banding. A great homeology between the chromosomes of the three species was confirmed after GTG banding. CBG-banding revealed few centromeric heterochromatic regions in most chromosomes of the three species. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using the (TTAGGG)<sub>n</sub> sequence as probe showed telomeric signals in the terminal regions of all chromosomes in the three karyotypes. Additionally, interstitial signals that suggest the origin by fusion in pairs 3, 4 and 7 of *A. montensis* and intensely bright signals associated with the constitutive heterochromatin of chromosomes 3, 15 and X and in the euchromatin of pair 16 of *N. lasiurus* were observed. Thus, the karyotypes analyzed differed mainly due to Robertsonian rearrangements, pericentric inversions, centromere repositioning and heterochromatin variation.

Genomic comparisons using *in situ* hybridization with total genomic DNAs of each species as probe (GISH) showed conservation of the euchromatic portion of the genomes of the *Akodon* species and *Necromys*. Furthermore, a similarity between the repetitive sequences comprising the heterochromatic regions of pairs 1, 3 and 6 and the X chromosome of *A. cursor* and pair 11 and the X chromosome of *A. montensis* were observed. These results show an extreme conservation among the genomes of the species analyzed, suggesting that the differences are in the heterochromatic regions.

The distribution of the transposable elements LINE-1 (long interspersed repetitive elements), SINE-B1 (short interspersed repetitive elements) and of the endogenous retrovirus *mystTR* was also checked by FISH in the Akodontini analyzed. The results suggest that these transposable elements may be related to the great chromosomal variation found in the tribe.

**Key-words:** Karyotype evolution, GISH, Akodontini, telomeric sequences, retroelements

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Os Roedores Akodontini

A ordem Rodentia compreende mais de 40% dos mamíferos vivos, ou cerca de 2280 espécies, com grande diversidade de formas e comportamentos (Myers 2000; Carleton e Musser 2005; Kay e col. 2008). Os roedores estão distribuídos por todo o planeta, com exceção da Antártica. Originalmente, estavam ausentes na Nova Zelândia e em algumas ilhas oceânicas, onde foram introduzidos pelo homem. Apresentam uma extraordinária variedade de adaptações ecológicas, suportando climas extremos, tanto nas regiões de maior revestimento florístico, como nas mais estérteis (Myers 2000). Tal sucesso ecológico pode ser atribuído em grande parte: (1) ao pequeno tamanho (com exceção da capivara, que pode alcançar 1,3 metros de altura), o que permite a ocupação de ambientes inexplorados por animais maiores; (2) ao comportamento rápido e esquivo, o que facilita a proteção contra predadores; (3) à flexibilidade alimentar e (4) à grande capacidade reprodutiva. Todos estes fatores contribuem para torná-los os mais numerosos e mais bem-sucedidos dentre os mamíferos (Kay e col. 2008). Alguns roedores são considerados bons bioindicadores ambientais e a sua escassez pode ser atribuída a processos de degradação.

Uma característica comum a todos os roedores é a habilidade de roer devido à presença de um par de incisivos proeminentes de crescimento contínuo nos maxilares inferior e superior (Myers 2000; Carleton e Musser 2005). Atualmente, os roedores são divididos em cinco subordens e 33 famílias (Fig. 1). Dentre elas, encontra-se a família Cricetidae Fischer, 1817, a segunda maior da classe Mammalia, com 681 espécies descritas (Tabela 1) (Carleton e Musser 2005; D'Elia e col. 2007; Percequillo e col. 2011; Pine e col. 2012). Os cricetídeos distribuem-se nas Américas do Norte e do Sul, Europa e quase toda a Ásia (Nowak 1999; Carleton e Musser 2005).

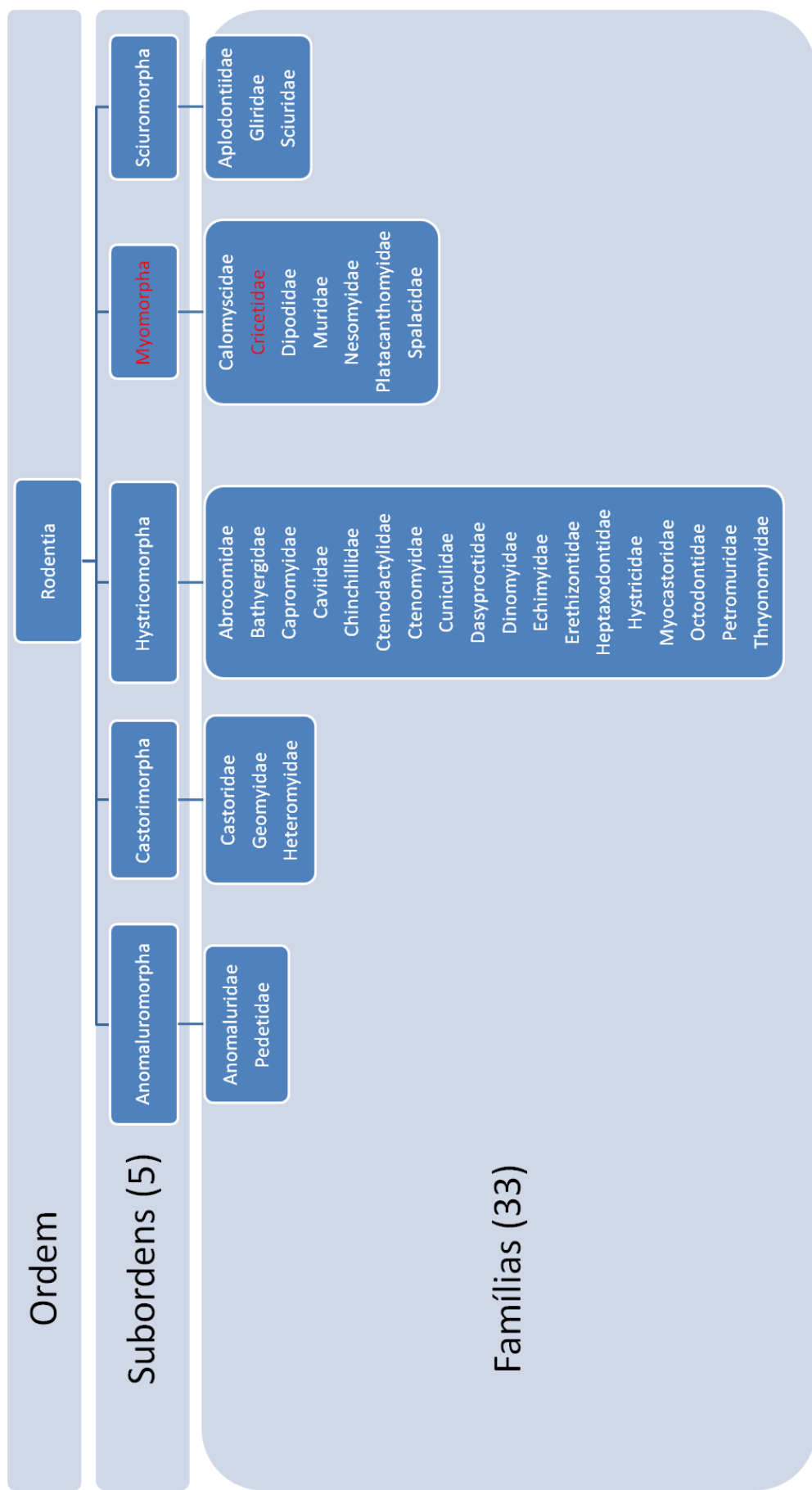


Figura 1 Subordens e famílias reconhecidas de roedores. Dados baseados em Carleton e Musser (2005).



Tabela 1 Gêneros reconhecidos de sigmodontinos.

**Ordem Rodentia**

**Subordem Myomorpha**

**Família Cricetidae (130 gêneros, 681 espécies)**

**Subfamília Sigmodontinae (82 gêneros, 413 espécies)**

**Tribo Abrotrichini (5, 15)**

- Gênero *Abrothrix* (9)
- Gênero *Chelemys* (3)
- Gênero *Geoxus* (1)
- Gênero *Notiomys* (1)
- Gênero *Pearsonomys* (1)

**Tribo Akodontini (14, 93)**

- Gênero *Akodon* (43)
- Gênero *Bibimys* (3)
- Gênero *Blarinomys* (1)
- Gênero *Brucepattersonius* (8)
- Gênero *Deltamys* (1)
- Gênero *Juscelinomys* (3)
- Gênero *Kunsia* (2)
- Gênero *Lenoxus* (1)
- Gênero *Necomys* (9)
- Gênero *Oxymycterus* (16)
- Gênero *Podoxymys* (1)
- Gênero *Scapteromys* (2)
- Gênero *Thalpomys* (2)
- Gênero *Thaptomys* (1)

**Tribo Ichthyomyini (5, 16)**

- Gênero *Anotomys* (1)
- Gênero *Chibchanomys* (2)
- Gênero *Ichthyomys* (4)
- Gênero *Neusticomys* (5)
- Gênero *Rheomys* (4)

**Tribo Oryzomyini (28, 150)**

- Gênero *Aegialomys* (2)
- Gênero *Amphinectomys* (1)
- Gênero *Cerradomys* (4)
- Gênero *Drymoreomys* (1)
- Gênero *Eremoryzomys* (1)
- Gênero *Euryoryzomys* (6)
- Gênero *Handleyomys* (2)
- Gênero *Holochilus* (3)
- Gênero *Hylaeamys* (7)
- Gênero *Lundomys* (1)
- Gênero *Melanomys* (3)
- Gênero *Microryzomys* (2)
- Gênero *Mindomys* (1)
- Gênero *Neacomys* (8)
- Gênero *Nectomys* (5)
- Gênero *Nephelomys* (7)
- Gênero *Nesoryzomys* (4)
- Gênero *Oecomys* (15)
- Gênero *Oligoryzomys* (21)

- Gênero *Oreoryzomys* (1)
- Gênero *Oryzomys* (43)
- Gênero *Pseudoryzomys* (1)
- Gênero *Scolomys* (3)
- Gênero *Sigmodontomys* (2)
- Gênero *Sooretamys* (1)
- Gênero *Tanyuromys* (1)
- Gênero *Transandinomys* (2)
- Gênero *Zygodontomy* (2)

**Tribo Phyllotini (10, 44)**

- Gênero *Andalgalomys* (3)
- Gênero *Auliscomys* (3)
- Gênero *Calomys* (12)
- Gênero *Eligmodontia* (4)
- Gênero *Galenomys* (1)
- Gênero *Graomys* (4)
- Gênero *Loxodontomys* (2)
- Gênero *Phyllotis* (13)
- Gênero *Salinomys* (1)
- Gênero *Tapecomys* (1)

**Tribo Reithrodontini (1, 2)**

- Gênero *Reithrodon* (2)

**Tribo Sigmodontini (1, 14)**

- Gênero *Sigmodon* (14)

**Tribo Thomasomyini (5, 58)**

- Gênero *Aepeomys* (2)
- Gênero *Chilomys* (1)
- Gênero *Rhagomys* (2)
- Gênero *Rhipidomys* (17)
- Gênero *Thomasomys* (36)

**Tribo Wiedomyini (1, 1)**

- Gênero *Wiedomys* (1)

***Incertae sedis* (12, 20)**

- Gênero *Abrawayaomys* (1)
- Gênero *Andinomys* (1)
- Gênero *Chinchillula* (1)
- Gênero *Delomys* (3)
- Gênero *Euneomys* (4)
- Gênero *Irenomys* (1)
- Gênero *Juliomys* (2)
- Gênero *Neomicroxus* (2)
- Gênero *Neotomys* (1)
- Gênero *Phaenomys* (1)
- Gênero *Punomys* (2)
- Gênero *Wilfredomys* (1)

Os números entre parênteses após o nome de cada tribo representam, respectivamente, o número de gêneros e o número de espécies. Os números após o nome de cada gênero representam o número de espécies reconhecidas. Dados baseados em Carleton e Musser (2005), D'Elía e col. (2007), Percequillo e col. (2011) e Pine e col. (2012).

Os Sigmodontinae exibem uma grande diversidade morfológica, genética e ecológica, com estilos de vida que variam de semiaquático a fossorial, arbóreo, cursorial e escansorial (Reig 1984; Carleton e Musser 2005; D'Elía e col. 2007; D'Elía e col. 2008). Sua taxonomia é complexa e muitos aspectos das suas relações filogenéticas ainda não foram resolvidos. Por exemplo, apesar de estarem divididos em nove tribos, alguns gêneros ainda são considerados *incertae sedis*, já que não puderam ser claramente relacionados a uma tribo específica, uma vez que dados morfológicos e moleculares podem ser divergentes (Tabela 1) (Reig 1984; D'Elía 2003; D'Elía e col. 2007). A relação filogenética entre os sigmodontíneos começou a ser estudada com dados moleculares no início dos anos 1990 (Smith e Patton 1991, 1993, 1999; Patton e Smith 1992; Geise e col. 2001). Inicialmente, a maioria desses estudos baseava-se em análises de sequências do gene citocromo *b* do DNA mitocondrial, mas posteriormente outras regiões do genoma, como genes nucleares, passaram a ser incluídas nas análises (Weksler 2003; D'Elía 2003; D'Elía e col. 2006).

A tribo Akodontini representa a segunda tribo em número de espécies da subfamília Sigmodontinae (Tabela 1) (Carleton e Musser 2005; D'Elía e col. 2007). Estudos moleculares, incluindo análises de sequências de genes mitocondriais e nucleares, juntamente com dados morfológicos, citogenéticos, de alozimas, paleontológicos e distribucionais, têm contribuído para o entendimento das relações filogenéticas dos gêneros pertencentes à tribo Akodontini (Smith e Patton 1991; Barrantes e col. 1993; Geise e col. 1998; Barros e col. 2009). Tais estudos também levaram à exclusão de táxons historicamente incluídos nesta tribo, como por exemplo, as espécies *Akodon latebricola* e *A. bogotensis* que recentemente foram alocadas ao gênero *Neomicroxus* (Alvarado-Serrano e D'Elía 2013). Análises de sequências parciais do gene citocromo *b* permitiram propor relações filogenéticas entre *Akodon cursor*, *A. montensis*, *A. mystax*, *A. lindberghi* e *A. serrensis* e sugerir que essas espécies formam um grupo monofilético (Geise e col. 2001). Barros e col. (2009) fizeram o primeiro estudo relacionando dados de filogenia molecular com informações cariotípicas e de distribuição geográfica, buscando compreender a evolução cromossômica e a filogeografia dos akodontinos brasileiros. Os autores concluíram que a evolução cromossômica em Akodontini ocorreu através de uma redução de números diplóides a partir de um

cariótipo  $2n=52$  até um de  $2n=10$ . Além disso, também propuseram a ocorrência, ao longo da história da tribo, de pelo menos quatro eventos de dispersão, dos Andes até o sudeste do Brasil (Fig. 2). Reig (1984) mostrou através da frequência de táxons em áreas geográficas determinadas que a maioria dos akodontinos apresenta sobreposição de distribuição na região andina (região em cinza da Fig. 2), o que sugere ser esta a região mais provável de diversificação (cladogênese) dos gêneros que compõem a tribo.



Figura 2 Área de diversificação (cladogênese) da tribo Akodontini (em cinza). As setas indicam as principais rotas de dispersão e diferenciação secundária. Figura adaptada de Reig (1984).

O gênero *Akodon* é considerado um dos mais complexos e especiosos dentre os Sigmodontinae. Ocorre em toda a América do Sul e possui 43 espécies divididas em quatro clados (Tabela 2; Fig. 3) (Smith e Patton 1993; Carleton e Musser 2005; Smith e Patton 2007; Braun e col. 2010; Jayat e col. 2010; Coyner e col. 2013; Alvarado-Serrano e D'Elía 2013). As espécies do grupo *aerosus* são encontradas das encostas andinas florestadas do sul do Peru até o norte da Argentina. As espécies do grupo *boliviensis* ocorrem no Peru, em locais de elevação alta da Bolívia e de elevações médias a altas na Argentina. O terceiro grupo, *cursor*, é representado por espécies que habitam as costas do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina e aquelas do grupo *dolores* se distribuem pelas terras baixas da Argentina, Bolívia e Paraguai (Smith e Patton 2007; Braun e col. 2008; Coyner e col. 2013). Espécies que não foram incluídas nos grupos acima (*incertae sedis*) distribuem-se na Argentina, Paraguai, Uruguai e extremo sul do Brasil (*A. azarae*); do sudeste do Peru à região central da Bolívia (*A. mimus*); na província de Misiones, Argentina (*A. philipmyersi*) e no sudeste do Brasil (*A. serrensis*) (Carleton e Musser 2005).

Tabela 2 Espécies de *Akodon* e sua alocação em grupos.

Grupos	<i>aerosus</i>	<i>boliviensis</i>	<i>cursor</i>	<i>dolores</i>	<i>Incertae sedis</i>
<b>Espécies</b>	<i>A. aerosus</i>	<i>A. aliquantulus</i>	<i>A. cursor</i>	<i>A. dayi</i>	<i>A. azarae</i>
	<i>A. affinis</i>	<i>A. boliviensis</i>	<i>A. lindberghi</i>	<i>A. dolores</i>	<i>A. mimus</i>
	<i>A. albiventer</i>	<i>A. fumeus</i>	<i>A. montensis</i>	<i>A. iniscatus</i>	<i>A. philipmyersi</i>
	<i>A. budini</i>	<i>A. juninensis</i>	<i>A. mystax</i>	<i>A. molinae</i>	<i>A. serrensis</i>
	<i>A. glaucinus</i>	<i>A. kofordi</i>	<i>A. paranaensis</i>	<i>A. neocenus</i>	
	<i>A. mollis</i>	<i>A. leucolimnaeus</i>	<i>A. reigi</i>	<i>A. oenos</i>	
	<i>A. orophilus</i>	<i>A. lutescens</i>	<i>A. sanctipaulensis</i>	<i>A. toba</i>	
	<i>A. siberiae</i>	<i>A. pervalens</i>			
	<i>A. simulator</i>	<i>A. polopi</i>			
	<i>A. surdus</i>	<i>A. spegazzinii</i>			
	<i>A. tartareus</i>	<i>A. subfuscus</i>			
	<i>A. torques</i>	<i>A. sylvanus</i>			
	<i>A. varius</i>				

*Akodon* apresenta muitos problemas taxonômicos, sendo que algumas espécies, como *A. azarae* e *A. mimus*, ainda não foram incluídas em nenhum dos grupos reconhecidos (Tabela 2). Análises filogenéticas realizadas com base no gene do citocromo *b* revelaram uma grande divergência entre *Akodon serrensis* e

outras espécies do gênero (D'Elía 2003; D'Elía e col. 2003; Smith e Patton 2007; D'Elía e col. 2007; Coyner e col. 2013). A partir disto, D'Elía (2003) sugeriu que novos estudos, incluindo comparações morfológicas e moleculares, seriam necessários para determinar se *A. serrensis* deveria ser alocado ao gênero *Thaptomys* ou até mesmo a um gênero próprio.

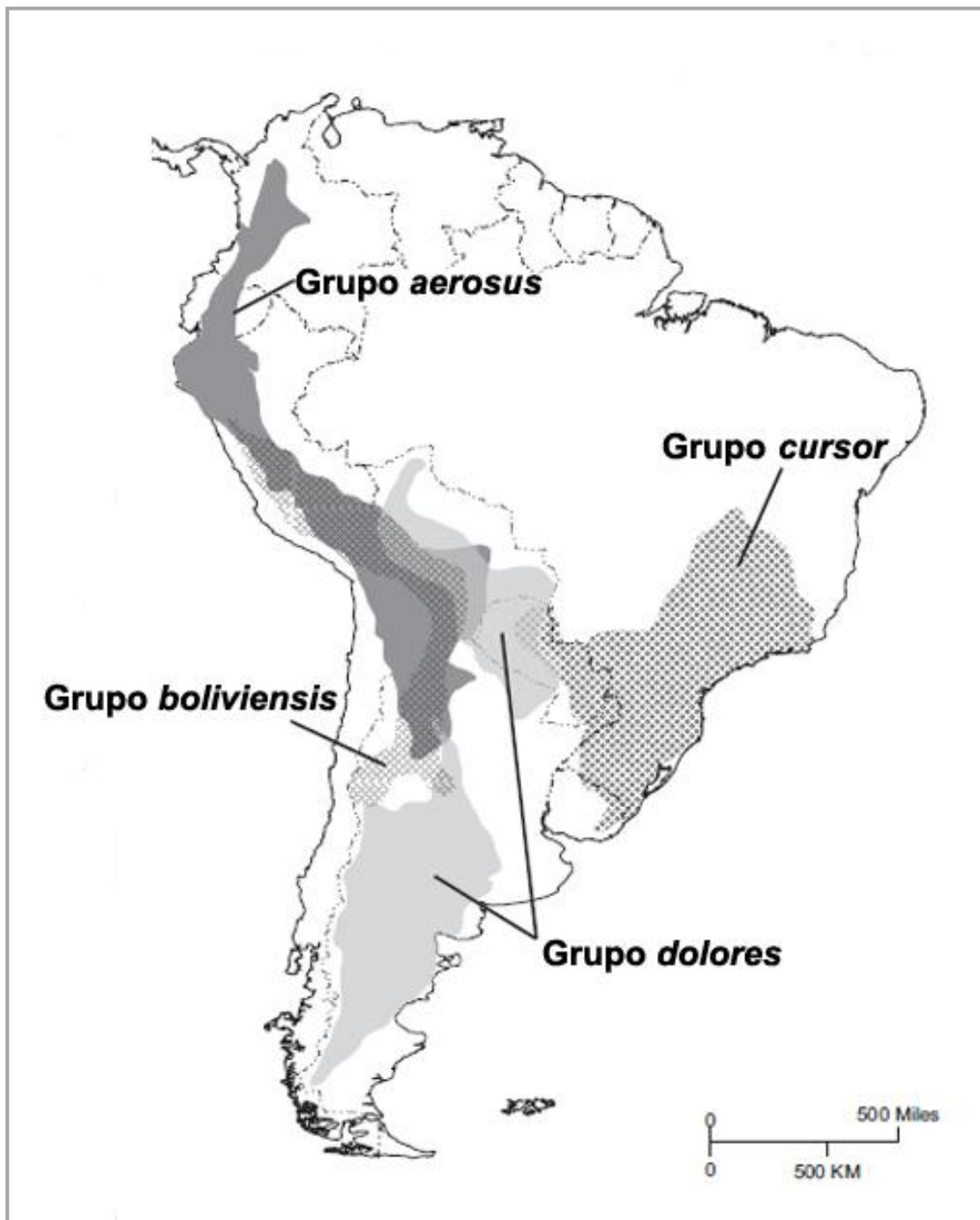


Figura 3 Distribuição aproximada das espécies do gênero *Akodon*. Figura adaptada de Coyner e col. (2013).

No Brasil, exemplares de *Akodon* habitam formações florestais e áreas abertas adjacentes, campos de altitude ao longo de toda a Mata Atlântica, Campos do Sul, áreas florestais da Caatinga e formações vegetais abertas e fechadas do Cerrado (Silva e Yonenaga-Yassuda 1998; Bonvicino e col. 2008). Quatro espécies ocorrem em Minas Gerais: *A. cursor* (Fig. 4a), *A. montensis* (Fig. 4b), *A. lindberghi* e *A. mystax* (Bonvicino e col. 2008). A distinção morfológica entre espécies filogeneticamente próximas do gênero é às vezes impossível. Na prática, a diagnose pode ser feita através da análise do cariótipo ou de outros dados genéticos, como sequências de DNA mitocondrial, polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) ou de DNA amplificado aleatoriamente (RAPD) (Fagundes e Nogueira 2007; Nogueira e Fagundes 2008; Yazbeck e col. 2011). A análise do cariótipo ainda é de fundamental importância para a identificação taxonômica de *Akodon* sp. n. ( $2n=10$ ), *A. cursor* e *A. montensis*, que ocorrem em simpatria e que, com base na morfologia, são espécies crípticas (Fagundes e Nogueira 2007). O uso de um marcador molecular por PCR-RFLP também possibilita a distinção entre estas três espécies e pode ser usado como ferramenta taxonômica, auxiliando na identificação de animais em coleções (Fagundes e Nogueira 2007; Nogueira e Fagundes 2008). Morfologicamente, *A. cursor* e *A. montensis* também podem ser diferenciados após análise da vesícula biliar, que está presente na primeira espécie e ausente na segunda (Geise e col. 2004).

O gênero *Necromys*, também pertencente à Tribo Akodontini, possui nove espécies reconhecidas (Tabela 1). Com base em dados morfológicos e de sequências de DNA mitocondrial, esse gênero é considerado filogeneticamente próximo ao gênero *Akodon* (Smith e Patton 1999). As espécies atualmente reconhecidas de *Necromys* foram alocadas no passado aos gêneros *Akodon*, *Bolomys*, *Calomys*, *Cabreramys*, *Chalcomys* e *Zygodontomys* (D'Elía e col. 2008). A única espécie que ocorre no Brasil é *Necromys lasiurus* (Fig. 4c), que apresenta uma das distribuições mais amplas dentre os sigmodontíneos e já foi amostrada desde o estado do Pará e Mata Atlântica brasileira até o sul da província de Buenos Aires e a Sierra de Ambato, nos Andes argentinos, além da Bolívia, Paraguai e Peru (Fig. 5) (Carleton e Musser 2005; Bonvicino e col. 2008; D'Elía e col. 2008).

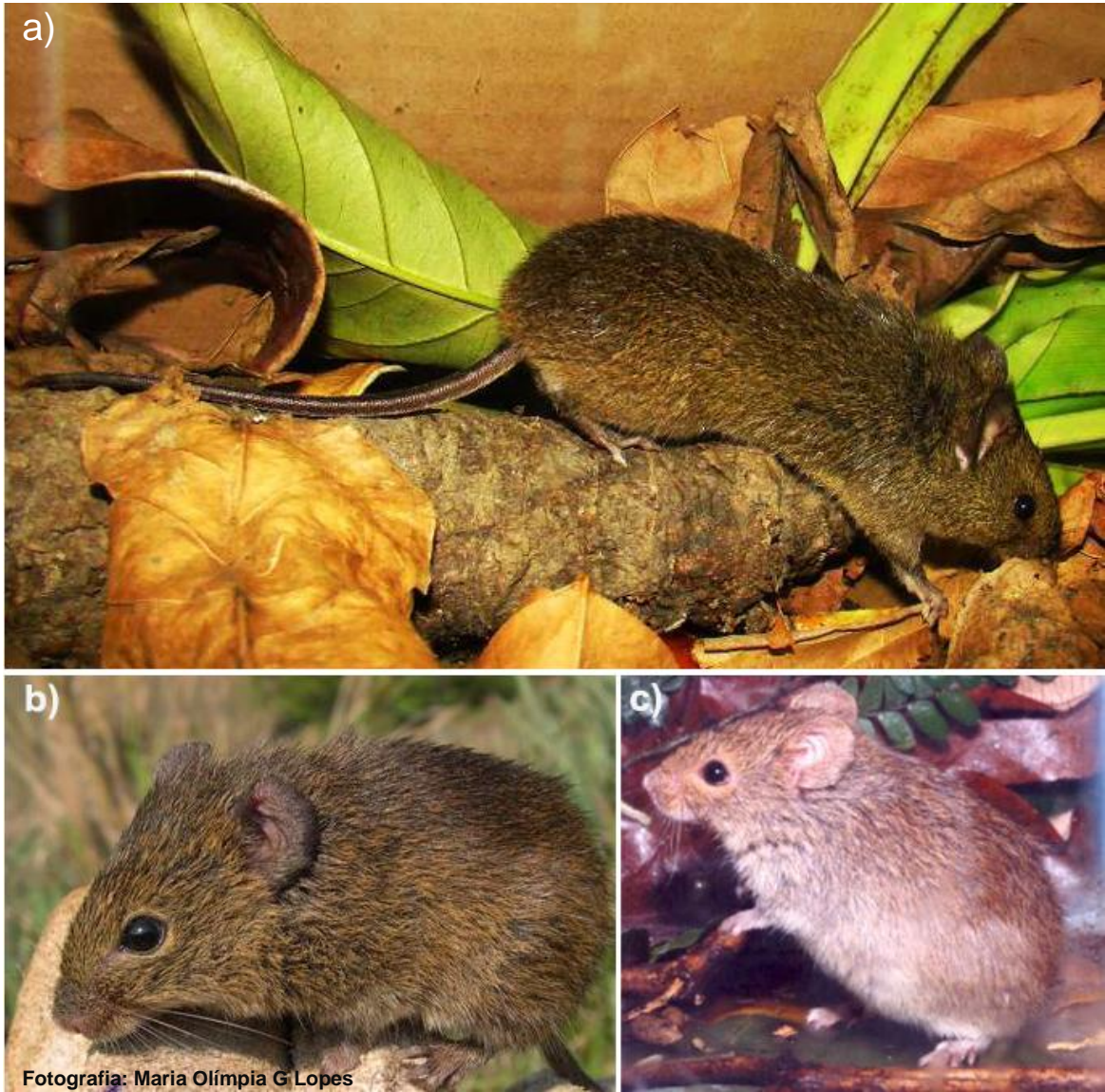


Figura 4 Roedores akodontinos: a) *Akodon cursor* (foto extraída de Geise 2012); b) *A. montensis* e c) *Necromys lasiurus* (foto extraída de Bonvicino e col. 2008).



Figura 5 Distribuição aproximada de *Necromys lasiurus*. Adaptada de <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=2859>.

## 1.2. A Citogenética de Akodontini

Estudos citogenéticos em roedores revelaram uma extrema variabilidade do número diplóide ( $2n$ ), que varia de  $2n=9-10$  (*Akodon* sp. n.) a  $2n=102$  (*Tympanoctomys barrarae*), inúmeros casos de polimorfismos cromossômicos devido a rearranjos cromossômicos variados, presença de cromossomos B e de cromossomos sexuais incomuns (Contreras e col. 1990; Silva e Yonenaga-Yassuda 1998; revisão em Romanenko e col. 2012).



No gênero *Akodon*, a citogenética é de extrema importância na identificação de espécies e na tentativa de resolução de questões taxonômicas, especialmente em casos de espécies crípticas (Silva e col. 2006). *Akodon* se destaca pela alta variabilidade cromossômica, sendo que os números diplóides variam de  $2n=9-10$  em *A. sp. n.* a  $2n=46$  em *A. serrensis*, com predominância de números diplóides baixos (Kasahara e Yonenaga-Yassuda 1984; Svartman e Almeida 1994; Sbalqueiro e Nascimento 1996; Fagundes e col. 1998; Geise e col. 1998; Silva e Yonenaga-Yassuda 1998). A grande variabilidade cariotípica do gênero se deve principalmente a eventos de fusões/fissões cêntricas e inversões pericêntricas, evidenciadas por análises comparativas de bandeamento GTG (Sbalqueiro e Nascimento 1996; Fagundes e col. 1997a; Fagundes e Yonenaga-Yassuda 1998; Geise e col. 1998; Silva e col. 2006). As espécies brasileiras de *Akodon* que tiveram seus cariótipos descritos são: *Akodon sp. n.* ( $2n=9-10$ ), *A. cursor* ( $2n=14-16$ ), *A. montensis* ( $2n=23-26$ ), *A. azarae* ( $2n=38$ ), *A. lindberghi* ( $2n=42$ ), *A. toba* ( $2n=42-43$ ), *A. mystax* ( $2n=44$ ), *A. paranaensis* ( $2n=44$ ), *A. reigi* ( $2n=44$ ) e *A. serrensis* ( $2n=46$ ).

*Akodon cursor* apresenta variação no número diplóide de  $2n=14$  a 16 devido a um complexo rearranjo envolvendo os cromossomos 1 e 3, no qual inversões pericêntricas seguidas de fusões cêntricas deram origem a um cariótipo com 15 cromossomos, quando em heterozigose, e com 14 cromossomos, quando em homozigose. Além disso, também foi observada uma variação no número fundamental (NF) de 18 a 26 braços autossômicos devido a inversões pericêntricas nos pares 2, 4 e 6 e a presença de fêmeas X0. Esses rearranjos são responsáveis por uma extensa variação intraespecífica com 28 formas cariotípicas já descritas (Yonenaga-Yassuda 1979; Yonenaga-Yassuda e col. 1983; Sbalqueiro e Nascimento 1996; Fagundes e col. 1998). Após bandeamento CBG, evidenciou-se heterocromatina constitutiva nas regiões centroméricas de todos os cromossomos, com exceção do par 4 e do cromossomo Y. Além disso, o par 1 apresentou uma banda intersticial no braço longo (Yonenaga-Yassuda 1979). Após coloração com nitrato de prata, o número e localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) também se mostraram extremamente variáveis entre os espécimes analisados. Mais comumente, houve marcação nos pares 3q, 4q e 5p. Além disso,

os cromossomos X das fêmeas e dos machos também possuíam RONS ativas (Yonenaga-Yassuda e col. 1983).

*Akodon montensis* tem um cariótipo básico com  $2n=24$  e variação no número diplóide ( $2n=25/26$ ) atribuída à presença de um ou dois cromossomos supernumerários (cromossomos B) (Yonenaga e col. 1975; Kasahara e Yonenaga-Yassuda 1982). Foi descrito um macho com  $2n=23/24$ , no qual a redução do número diplóide resultou da eliminação do cromossomo Y em células somáticas (Yonenaga e col. 1976). Além disso, é comum a ocorrência de heteromorfismo do cromossomo X em populações naturais devido à variação de heterocromatina pericentromérica (Yonenaga e col. 1975; Kasahara e Yonenaga-Yassuda 1982; Fagundes e col. 1997b). Há pouca heterocromatina na região centromérica de todos os autossomos e o cromossomo Y é quase totalmente heterocromático (Kasahara e Yonenaga-Yassuda 1982). Fagundes e col. (2000) descreveram cinco fêmeas XY férteis, que tinham um cromossomo X com uma grande porção do cromossomo Y resultante de translocação e um cromossomo Y normal. Os autores também verificaram por PCR que pelo menos uma cópia do gene *Sry* estava presente nestas fêmeas (Fagundes e col. 2000). A existência de fêmeas XY viáveis e férteis foi demonstrada em outras oito espécies de *Akodon*: *A. azarae*, *A. boliviensis*, *A. kofordj*, *A. mollis*, *A. puer*, *A. subfuscus*, *A. torques* e *A. varius* (revisão em Bianchi 2002). Nessas fêmeas, o desenvolvimento de ovários férteis não foi atribuído à deleção do *Sry* ou a mutações nos segmentos analisados, mas sim à expressão anormal desse gene durante o estágio de diferenciação das gônadas (Bianchi e col. 1993). Diferentes espécimes de *A. montensis* foram analisados após marcação das RONS pela prata. Os braços dos cromossomos 2q, 3p, 6p, 7q e 10q tinham RONS ativas. Além disso, houve marcação em cromossomos B de exemplares com  $2n=25$  (Yonenaga-Yassuda e col. 1992).

Estudos citogenéticos em *Necomys lasiurus* de vários estados brasileiros revelaram polimorfismos em algumas populações devido a uma translocação robertsoniana heterozigota envolvendo os cromossomos 6 e 7, que gerou números diplóides de  $2n=33$  e  $2n=34$ , com conservação do número fundamental de 34 braços autossômicos (Fig. 6). Também foram descritos polimorfismos no conteúdo heterocromático dos cromossomos X e Y e monossomia do cromossomo X (Yonenaga 1975; Kasahara e Yonenaga-Yassuda 1983; Svartman e Almeida

1993). Espécimes analisados após marcação das RONS pela prata tinham pelo menos quatro pares com RONS ativas nos braços longos (região telomérica) e dois pares com marcação nos braços curtos (Kasahara e Yonenaga-Yassuda 1983).

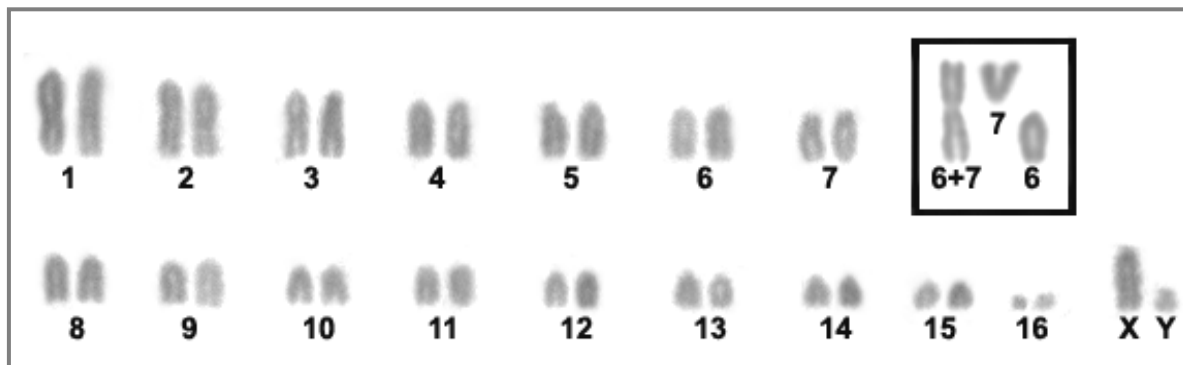


Figura 6 Cariótipo de um macho *Necromys lasiurus* ( $2n=34$ ,  $NF=34$ ). No destaque, os cromossomos 6 e 7 de um exemplar com  $2n=33$ .

Os gêneros *Akodon* e *Necromys* representam clados muito próximos dentro da tribo Akodontini. Análises comparativas de bandeamento GTG revelaram que fusões cêntricas e em *tandem* e inversões pericêntricas foram mecanismos importantes de divergência cariotípica entre esses dois gêneros (Fagundes e Yonenaga-Yassuda 1998; Geise e col. 1998).

### 1.3. Elementos Transponíveis

Uma grande fração dos genomas de eucariotos consiste de sequências repetidas de DNA (Britten e Kohne 1968; Charlesworth e col. 1994; Richard e col. 2008). Essas sequências estão relacionadas à variação do tamanho do genoma dos eucariotos e podem ser classificadas em dois grupos principais (Fig. 7). O primeiro grupo é composto por repetições em *tandem* e inclui, por exemplo, os DNAs satélites, micro e minissatélites. O segundo grupo inclui as sequências dispersas pelo genoma, como os elementos transponíveis (TEs) (revisão em Richard e col. 2008).

Os TEs, descobertos por Bárbara McClintock nos anos 1950s, foram considerados “DNA lixo”, já que suas funções eram desconhecidas (Doolittle e Sapienza 1980; Orgel e Crick 1980). Entretanto, ao longo dos últimos anos esta

visão tem mudado devido ao acúmulo de dados que demonstram a importância desses elementos nos genomas de eucariotos. De fato, os TEs são hoje considerados como grandes promotores de diversidade genômica e biológica nos vertebrados e possivelmente desempenham importante papel nos eventos de especiação e em mudanças evolutivas de grande escala (Böhne e col. 2008). Esses elementos, em geral, podem ser encontrados em diversos compartimentos genômicos, tais como a heterocromatina pericentromérica, os telômeros, regiões reguladoras, éxons e íntrons.

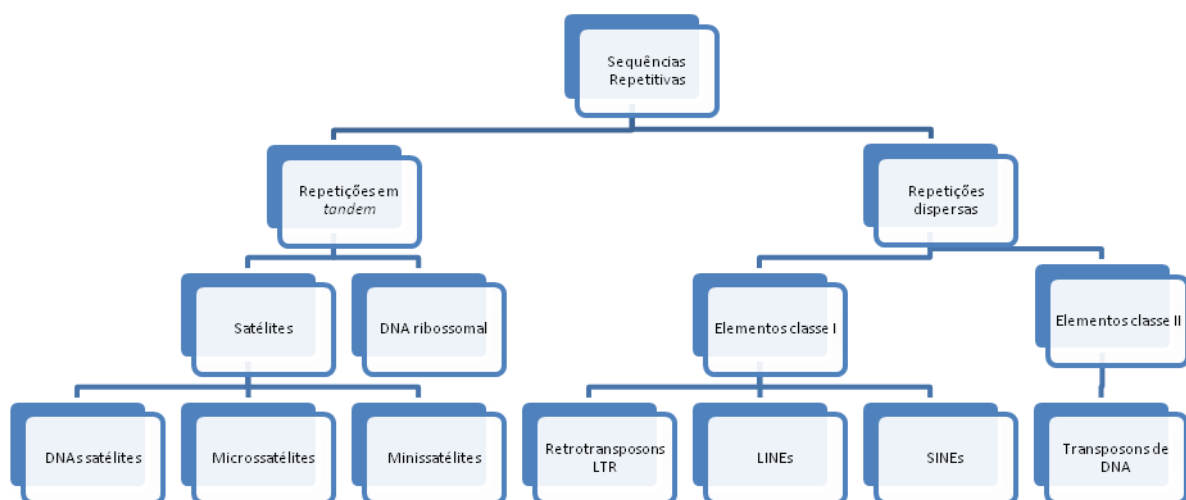


Figura 7 Principais tipos de sequências repetitivas presentes nos genomas dos eucariotos. Adaptada de Richard e col. (2008).

De acordo com o mecanismo de transposição a novos sítios no genoma, os TEs são divididos em duas classes (Fig. 7). Os transposons de DNA (classe II) codificam uma transposase que excisa a sequência parental, reintegrando-a em outro local. Este mecanismo de transposição também é chamado de “cortar e colar” (ou *cut-and-paste*). Por outro lado, os retrotransposons (classe I) se movem de forma indireta via um intermediário de RNA, através do mecanismo de “copiar e colar” (ou *copy-and-paste*) (Wicker e col. 2007). Dessa forma, como a cópia original continua no mesmo local, o mecanismo de transposição dos retroelementos faz com que o aumento no número de cópias seja mais rápido do que o dos transposons de DNA. Adicionalmente, os retroelementos também são classificados de acordo com sua estrutura e seu mecanismo de transposição (Fig. 8).

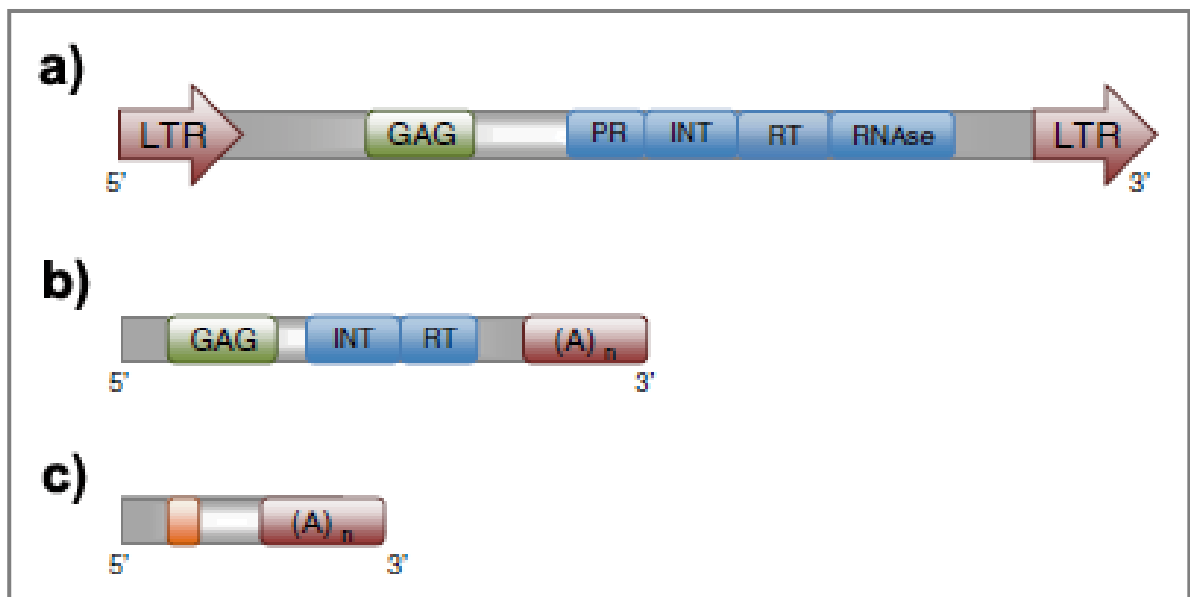


Figura 8 Tipos estruturais dos elementos transponíveis da classe I: (a) Retrotransposons com repetições terminais longas (LTR); Retrotransposons não-LTR: (b) LINE; (c) SINE. (A)<sub>n</sub> = regiões variáveis; GAG = proteína do capsídeo; PR = protease; INT = integrase; RT = transcriptase reversa; RnaseH = ribonuclease H. Figura modificada de Parisod e col. (2009).

Retroelementos autônomos contêm genes que codificam proteínas estruturais e enzimáticas necessárias para a transposição, como, por exemplo, os retrovírus endógenos e os LINEs (elementos nucleares interdispersos longos). Por outro lado, retroelementos não-autônomos são incapazes de catalisar suas próprias transposições, necessitando de proteínas codificadas pelos elementos autônomos para se mover, como os SINEs (elementos nucleares interdispersos curtos). Estruturalmente, os retroelementos podem possuir Repetições Terminais Longas (LTRs – *long terminal repeats*) em orientação direta, como, por exemplo, os retrovírus endógenos, ou não as possuir, como nos casos dos LINEs e SINEs (Fig. 8) (Wessler 2006).

Os retrotransposons LTRs são compostos por longas repetições nucleotídicas nas extremidades 5' e 3'. Essas repetições flanqueiam uma ORF (*Open Reading Frame*) chamada *pol*, que codifica enzimas necessárias para a transposição: protease, transcriptase reversa (copia o RNA do retrotransposon em cDNA), RnaseH (degrada a fita de RNA no heterodúplex DNA/RNA) e integrase (integra o cDNA no genoma) (Fig. 8). Além da ORF *pol*, há também a ORF *gag*,

que codifica uma proteína estrutural (Böhne e col. 2008). Como exemplo de retrotransposons LTRs, podem-se citar os retrovírus endógenos. Muitos vírus, ao infectar células da linhagem germinativa, podem ser integrados aos cromossomos de seus hospedeiros e, assim, tornarem-se retrovírus endógenos. Uma vez incorporado ao material genético da célula hospedeira, o retrovírus endógeno é transmitido verticalmente e, se fixado na população, contribui para a evolução do genoma hospedeiro (Gifford e Tristem 2003; Feschotte e Gilbert 2012). A análise do genoma de organismos sequenciados tem mostrado que esses retroelementos são encontrados em muitos eucariotos (Havecker e col. 2004). Por exemplo, aproximadamente 8% e 10% dos genomas humano e do camundongo, respectivamente, são compostos por sequências derivadas de inserções de vírus (Lander e col. 2001; Waterston e col. 2002).

Os retrotransposons não-LTRs capazes de transpor de forma autônoma são representados pelos LINEs. Os elementos LINEs são encontrados em uma grande variedade de organismos: protistas, plantas, insetos, moluscos e vertebrados. Esses elementos são constituídos por duas ORFs que codificam uma proteína de ligação ao RNA (ORF I) e proteínas com atividade de endonuclease e transcriptase reversa (ORF II) (Wessler 2006). Nos mamíferos, sequências LINE-1 (L1) são bastante abundantes, podendo representar até mais de 20% do tamanho do genoma. Embora abundantes em número de cópias, essas sequências podem ser incapazes de codificar ORF I e ORF II e, portanto, incapazes de transpor. No entanto, ativos ou não, os elementos L1 são capazes de mudar a estrutura e função do genoma humano (Ivancevic e col. 2013) e, possivelmente, nos demais organismos onde estão inseridos. Além de representar uma fonte de diversidade genética de acordo com os diferentes padrões de inserção entre populações, sequências L1 têm sido associadas à inativação do cromossomo X durante a embriogênese de fêmeas, ao reparo de quebras do DNA e regulação da expressão gênica (Lyon 1998; Furano 2000; Morrish e col. 2002).

Os retrotransposons não-LTRs chamados de SINEs dependem de enzimas codificadas pelos LINEs para a retrotransposição. Os SINEs possuem sequências curtas que variam de 80 a 500 pares de base e são transcritos por um promotor interno para a polimerase III na extremidade 5' (Kramerov e Vassetzky 2005). SINEs podem constituir uma fração significativa do genoma total de algumas

espécies de eucariotos, como répteis, peixes, insetos, plantas e mamíferos. Por exemplo, aproximadamente 13% e 8% dos genomas humano e do camundongo, respectivamente, são compostos por SINEs (Lander e col. 2001; Waterston e col. 2002). Os SINEs incluem os elementos *Alu* em primatas e os elementos B1, B2 e ID em roedores. Esses elementos contribuem para a expansão do genoma de seus hospedeiros, para o processo de mutagênese (deleções ou inserções) devido à recombinação desigual e para a regulação da expressão gênica, dentre outras funções (Kramerov e Vassetzky 2005).

### **1.3.1. Elementos Transponíveis e a Subfamília Sigmodontinae**

Diversos estudos têm demonstrado a presença de elementos LINE-1 (L1) nos genomas de mamíferos e de SINE-B1 (B1) nos genomas de roedores. Em genomas de espécies da família Cricetidae, uma série de artigos mostrou que houve expansão do retrovírus endógeno *mysTR*, há aproximadamente 19,2 milhões de anos, e posterior inativação de L1 e B1 em Sigmodontinae, há aproximadamente 12,8 e 8,8 milhões de anos, respectivamente (Fig. 9) (Casavant e col. 2000; Cantrell e col. 2005; Grahn e col. 2005; Rinehart e col. 2005; Erickson e col. 2011). Os principais resultados que levaram a esta hipótese foram: (i) ausência de sinais de hibridação correspondentes às sequências L1 e B1 em análises por Southern blot; (ii) presença de um número reduzido de cópias de L1 e B1 verificada por hibridações do tipo *dot-blot*; (iii) padrões de hibridação *in situ* fluorescente não característicos de L1 e (iv) presença abundante de sequências de *mysTR* nos genomas das espécies analisadas. Em outro estudo, Casavant e col. (2000) não encontraram elementos L1 inseridos recentemente no genoma de *Oryzomys*. Além disso, os autores não encontraram elementos L1 com ORFs intactas e todos os elementos examinados tinham deleções, inserções e stop códons na ORF II. Uma vez que as sequências L1 têm sido associadas ao reparo de quebras da dupla fita de DNA, a ausência de atividade desse elemento foi relacionada à enorme variabilidade cariotípica encontrada em Sigmodontinae, especialmente no gênero *Akodon* (Grahn e col. 2005).

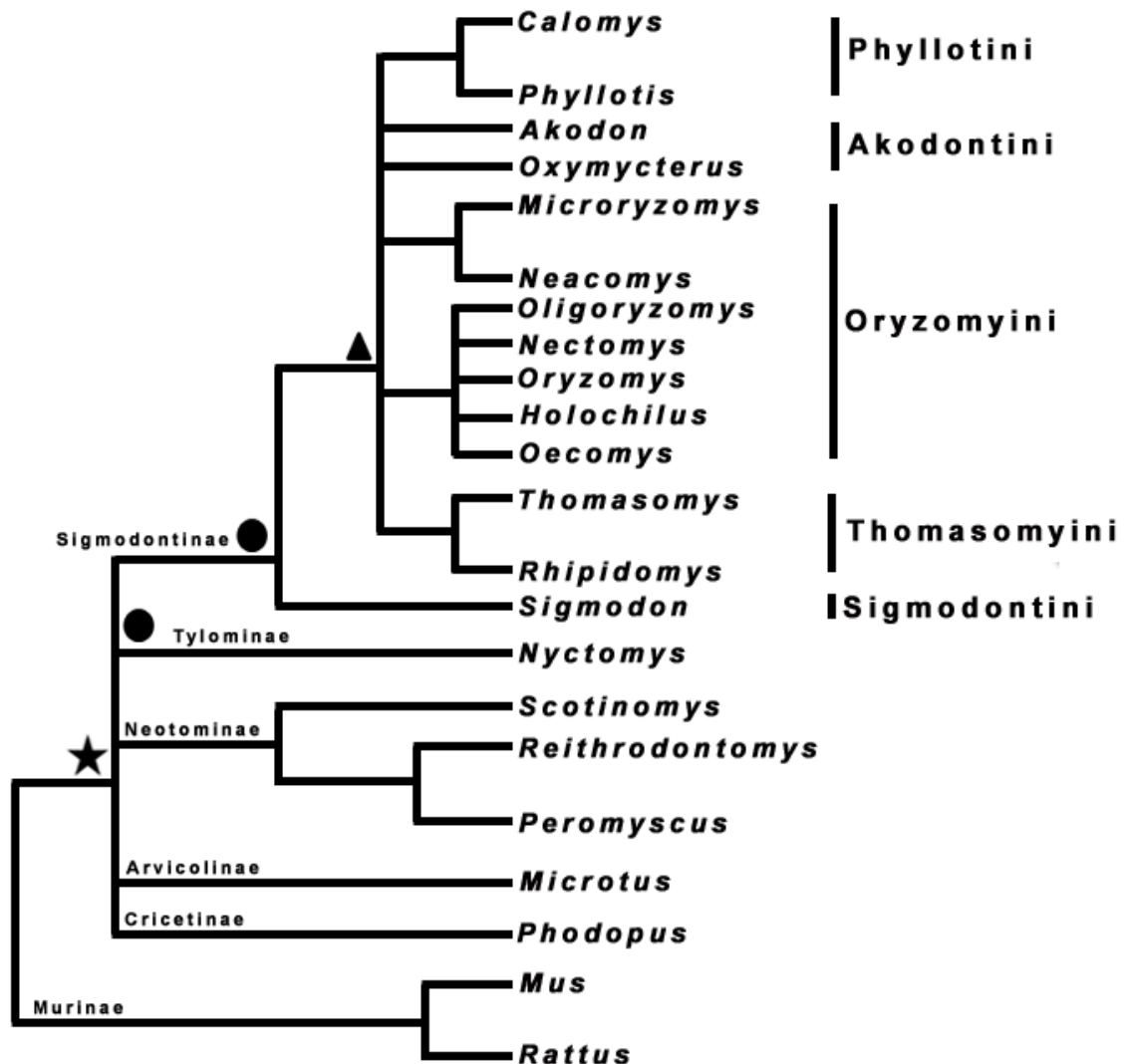


Figura 9 Diagrama da filogenia de Sigmodontinae, expansão de mysTR (★) e inativação de LINE-1 (▲) e SINE-B1 (●). Adaptada de Grahn e col. (2005); Rinehart e col. (2005) e Erickson e col. (2011).

As análises que visam verificar a presença e atividade de elementos classe I no genoma dos Sigmodontinae ainda não se estenderam aos genomas de espécies brasileiras do grupo. Assim, ainda não há dados que permitam concluir se houve expansão de mysTR e inativação dos elementos L1 e B1 em espécies do grupo *cursor*. Esta informação é especialmente importante devido à possível relação destes elementos com os rearranjos cariotípicos apresentados neste grupo.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo geral desse trabalho foi comparar o grau de conservação entre os cariótipos de *Akodon cursor*, *A. montensis* e *Necromys lasiurus*.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Analisar comparativamente e investigar o grau de conservação dos padrões de bandeamento GTG e CBG dos cromossomos de *Akodon cursor*, *A. montensis* e *Necromys lasiurus*;
2. Comparar os genomas destas mesmas espécies através de experimentos interespecíficos de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), usando como sondas os DNAs genômicos totais de cada uma delas;
3. Isolar por PCR e localizar em cromossomos metafásicos segmentos dos elementos transponíveis LINE-1, SINE B1 e do retrovírus endógeno mystTR nos genomas nas espécies *A. cursor*, *A. montensis* e *Necromys lasiurus*;
4. Testar a hipótese de expansão do elemento mystTR e inativação dos elementos LINE-1 e SINE B1 nas espécies estudadas.
5. Avaliar a relação destas sequências de elementos repetitivos com os rearranjos cariotípicos das espécies estudadas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras Biológicas

Foram estudados exemplares de três espécies da tribo Akodontini: *Akodon cursor*, *A. montensis* e *Necromys lasiurus*. Os espécimes foram coletados em diferentes áreas do estado de Minas Gerais (Tabela 3), nas quais foram utilizadas armadilhas do tipo Sherman. Peles e crânios foram depositados na coleção de mamíferos da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (MCN-M) ou na coleção taxonômica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Tabela 3 Roedores Akodontini analisados.

Espécies	Sexo	Localidade	Número de tobo ou coleta
<i>Akodon cursor</i>	2M	Conceição do Mato Dentro/MG (19°02'13"S 43°25'30"O) Rio Pomba/MG (21°16'30"S 43°10'44"W)	MCN-M 2249 PRONEM110
<i>Akodon montensis</i>	1M e 1F	Morada Nova de Minas/MG (18°36'14"S 45°21'25"O) Catas Altas (20°04'30"S 43°24'28"W)	MCN-M 2277 MCN-M1586
<i>Necromys lasiurus</i>	1M	Augusto de Lima/MG (18°06'32"S 44°16'01"O)	UFMG 3836

M = macho; F = fêmea; S = sul; O = oeste.

#### 3.2. Métodos

##### Obtenção de preparações cromossômicas

Os cromossomos metafásicos foram obtidos em campo através de preparação direta a partir de medula óssea pela técnica de Ford e Hamerton (1956), com modificações:

1. Injetar solução de colchicina a 0,1% na cavidade peritoneal na razão de 1 mL por 100 g de peso (no mínimo 0,3 e no máximo 3 mL);
2. Sacrificar o animal após 40-60 minutos com uma combinação de cetamina e cloridrato de xilazina, nas concentrações de 210 mg/Kg e 36 mg/Kg, respectivamente, conforme descrito em Bretas (2007);
3. Isolar os fêmures, limpá-los e cuidadosamente expor o canal ósseo, quebrando o osso entre a diáfise e as epífises;

4. Lavar o canal ósseo com 5 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M) usando seringa e agulha e recolher a medula óssea em um tubo Falcon de 15 mL;
5. Deixar o material contido no tubo Falcon por 40 minutos a 37°C;
6. Pingar 6-10 gotas de fixador (metanol:ácido acético 3:1) e, após 5 minutos, misturar a preparação cromossômica invertendo o tubo;
7. Adicionar 3 mL de fixador e, após 10 minutos, inverter o tubo para misturar bem a preparação cromossômica;
8. Completar o volume da preparação até 10 mL com fixador e manter a 4°C;
9. No laboratório, centrifugar a suspensão celular a 1000-1200 rpm durante 7 minutos;
10. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o material em fixador fresco. Repetir este passo duas ou mais vezes, até a preparação parecer limpa;
11. Pingar a preparação cromossômica em lâminas de vidro bem lavadas com sabão e água, passadas em álcool e secas, numa câmara úmida. Deixá-las secar à temperatura ambiente e utilizá-las após o envelhecimento de sete dias à temperatura ambiente.

## **Padrões de Bandeamento**

### **Bandeamento GTG**

Foi utilizada a técnica descrita por Seabright (1971), com algumas modificações:

1. Tratar as preparações cromossômicas com 2xSSC (cloreto de sódio 0,3M e citrato trissódico 0,06M, pH 6,8) a 60°C por 7 minutos;
2. Mergulhar as lâminas em solução de tripsina (0,05% em tampão Dulbecco, pH 7,0) por 7-14 segundos, lavar com água destilada e deixar secar;
3. Corar o material com Giemsa 2%, em tampão fosfato por dois minutos;
4. Lavar com água destilada e deixar secar.

As lâminas devem ser analisadas quanto à correta digestão pela tripsina e o tempo ajustado de acordo com o aspecto dos cromossomos.

### **Bandeamento CBG**

A heterocromatina constitutiva foi evidenciada pela aplicação da técnica descrita por Sumner (1972), com algumas modificações:

1. Incubar a lâmina com preparações cromossômicas em 2xSSC a 60°C por 15 minutos;
2. Incubar a lâmina em HCl 0,2N à temperatura ambiente por 15 min;
3. Incubar a lâmina por 20-25 segundos em uma solução 5% de hidróxido de bário pré-aquecida a 60°C em banho-maria;
4. Lavar a lâmina com água destilada, incubá-la rapidamente em HCl 1N 60°C e lavar novamente com água destilada;
5. Incubar a lâmina por 30 minutos em 2xSSC pré-aquecido a 60°C em banho-maria;
6. Lavar com água destilada e deixar secar;
7. Corar com Giemsa 5%, em tampão fosfato, por 50 minutos.

### **Hibridação *in situ* fluorescente com DNAs genômicos totais (GISH)**

#### **Extração de DNA genômico**

O DNA genômico total de um exemplar macho de cada espécie foi extraído com fenol-clorofórmio a partir de fragmentos de fígado fixados em álcool 70%, de acordo com o seguinte protocolo:

1. Macerar 100 mg de tecido congelado em nitrogênio líquido;
2. Ressuspender o tecido macerado em 500 µL de TE (Tris-EDTA) num tubo eppendorf;
3. Acrescentar 25 µL de SDS 20% (concentração final de 1%) e 5 µL de proteinase K 10 mg/mL;
4. Misturar bem e deixar a 55°C overnight;
5. Acrescentar 500 µL de fenol saturado;
6. Homogeneizar a solução, invertendo o tubo por 5 minutos;
7. Centrifugar a solução por 20 minutos a 3200 rpm;
8. Transferir a fase aquosa superior para um eppendorf limpo;
9. Acrescentar 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);

10. Misturar a solução por inversão por 5 minutos e centrifugá-la por 20 minutos a 3200 rpm;
11. Transferir a fase aquosa superior transparente para um eppendorf limpo;
12. Acrescentar 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);
13. Misturar por inversão por 5 minutos e centrifugar por 20 minutos a 3200 rpm;
14. Transferir o sobrenadante pela parede de um tubo limpo contendo 50 µL de KCl 2M (ou NaAc 3M, pH=6,0) estéril mantido em gelo;
15. Acrescentar 600 µL de etanol absoluto gelado;
16. Inverter o tubo eppendorf até formar um fio de DNA precipitado;
17. Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm e dispensar o sobrenadante;
18. Adicionar 1 mL de etanol 70% gelado;
19. Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm e dispensar o sobrenadante;
20. Deixar o DNA secar ao ar e ressuspendê-lo em 100 µL de TE;
21. Incubar por 30 minutos a 65°C;
22. Adicionar 10 µL de RNase 10 mg/mL e manter por 10 minutos a 65°C.

A estimativa das concentrações dos DNAs genômicos extraídos foi feita no NanoDrop 2000/2000C (Thermo Scientific) e a qualidade dos DNAs foi verificada em um gel de agarose 0,8%, usando o fago lambda Hind III (Invitrogen) como marcador.

### **Hibridação**

Os DNAs genômicos utilizados como sondas foram marcados por *nick translation* com digoxigenina-11-dUTP com o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche Applied Science) e mantidos a -20°C até o uso.

Para os experimentos de comparação genômica por hibridação *in situ* fluorescente (GISH) entre as espécies *Akodon cursor*, *A. montensis* e *Necromys lasiurus*, foi utilizado o protocolo descrito por Svartman e Vianna-Morgante (1999) (Fig. 10):

1. Marcar a área de hibridação em lâminas pingadas e envelhecidas;
2. Incubar a lâmina em pepsina (100 µg/mL em HCL 0,01N) por 10 minutos a 37°C;

3. Imergir a lâmina em três banhos de água destilada (temperatura ambiente) por 3 minutos cada;
4. Incubar a lâmina em um banho de 2xSSC a 60°C por 10 minutos;
5. Imergir a lâmina em três banhos de água destilada (temperatura ambiente) por 3 minutos cada;
6. Desidratar os cromossomos à temperatura ambiente passando a lâmina por uma série de etanol (50%, 70% e 100%) por 3 minutos em cada banho e deixá-las secar ao ar;
7. Incubar a lâmina por 2 minutos em 50 mL de solução de desnaturação (35 mL de formamida deionizada, 5 mL de 20xSSC e 10 mL de água destilada) pré-aquecida a 70°C em banho-maria;
8. Imergir a lâmina em 2xSSC gelado;
9. Imergir a lâmina em soluções de álcool 50%, 70% e 100% gelados por 3 minutos cada;
10. Esperar a lâmina secar ao ar;
11. Desnaturar a sonda (250 ng de DNA genômico marcado com digoxigenina ressuspendido em meio de hibridação - 50% formamida deionizada/2xSSC, volume final de 13 µL) por 10 minutos a 98°C. Passar pelo gelo e dar um pulso na centrífuga para concentrar a amostra;
12. Aplicar a sonda sobre a área de hibridação. Cobrir com lamínula, aplicar cola selante e incubar a lâmina em uma câmara de hibridação a 37°C por três dias;
13. Após a hibridação, lavar a lâmina em 2xSSC a 42°C por 5 minutos. A temperatura, o número de banhos e a duração de cada um podem ser alterados conforme o resultado observado ao microscópio;
14. Imergir a lâmina em PBT (0,1% de Tween 20 em PBS) por 5 minutos à temperatura ambiente;
15. Colocar 100 µl de antidigoxigenina conjugada com FITC (Roche Applied Science) (1:100 em PBT) sobre a área de hibridação, recobri-la com uma lamínula de vidro limpa e manter numa câmara úmida em estufa a 37°C por 45 minutos;
16. Incubar a lâmina em dois banhos de PBT de 5 minutos cada à temperatura ambiente;

17. Lavar a lâmina com jatos de PBS e recobrir a área de hibridação com 50  $\mu$ l de uma solução de iodeto de propídio (0,6 ng/ $\mu$ L) por 15 segundos;
18. Lavar com PBS e montar a lâmina com 15  $\mu$ l de uma solução de DAPI (0,8 ng/ $\mu$ L) em Slowfade (Invitrogen).

No caso de experimentos com supressão, no passo (11) desnaturar a mistura de sonda:DNA supressor (proporção de 1:100, sonda marcada:DNA genômico total não marcado) por 10 minutos a 98°C e incubar a 37°C por uma hora antes de aplicar sobre a área de hibridação (reanelamento ou *preannealing*).

As análises foram feitas sob um microscópio epifluorescente Zeiss Axioimager 2 equipado com uma câmara de CCD. As imagens foram capturadas com o software AxioVision (Zeiss) e modificadas com o software Adobe Photoshop 7.0.

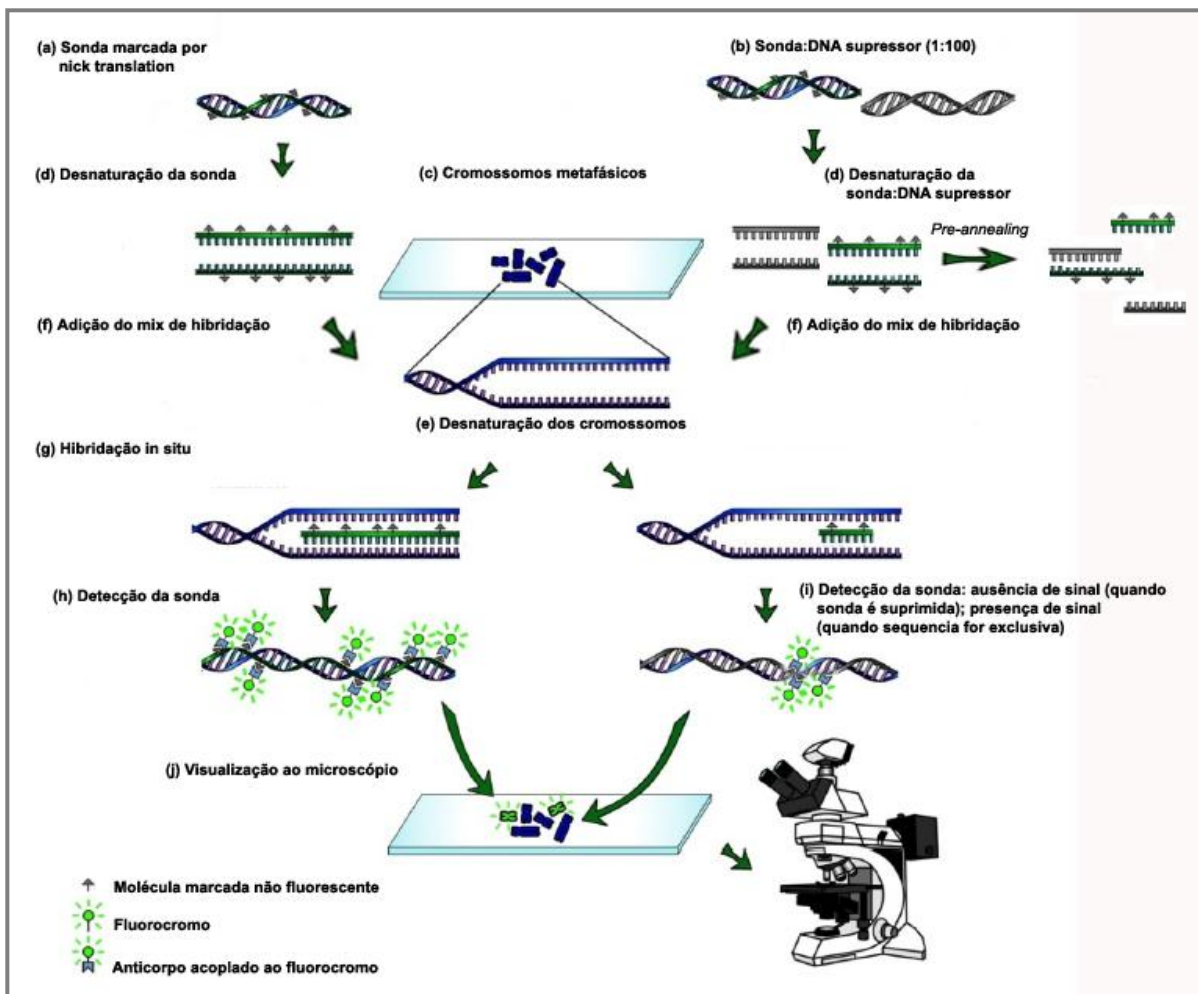


Figura 10 Principais etapas da hibridação *in situ* com DNA genômico total (GISH). Figura adaptada de Brammer e col. (2013).

### **Hibridação *in situ* fluorescente com sonda telomérica**

Sequências teloméricas presentes no genoma das espécies estudadas foram visualizadas em experimentos de hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Sequências teloméricas (TTAGGG)<sub>4</sub> foram sintetizadas com uma molécula de biotina na extremidade (Invitrogen). As condições de hibridação foram similares às descritas para os experimentos de GISH, com poucas modificações:

1. Aplicar o mix de hibridação, constituído por 1040 ng de sonda em 50% formamida/2xSSC, sem desnaturá-lo, às preparações cromossômicas desnaturadas;
2. Manter as lâminas com a sonda em uma câmara de hibridação a 42°C overnight;
3. Proceder à imunodeteção com avidina conjugada com FITC (Roche Applied Science). Após a imunodeteção e os dois banhos de PBT, corar as lâminas com iodeto de propídio (0,6 ng/μL) e contraporá-las com DAPI.

### **Amplificação dos elementos transponíveis por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

Os elementos transponíveis LINE-1 (L1), SINE-B1 (B1) e mysTR foram amplificados por PCR a partir de DNA genômico extraído de *Akodon cursor*, *A. montensis* e *Necromys lasiurus*. Para isso, foram utilizados os seguintes conjuntos de primers: L1-F (5' AAGAATTCGCGAGGATACAAGATCAACTCA 3') e L1-R (5' AAGGATCCCAATTCGATTCCATTGGT 3') (Grahm e col. 2005); B1-F (5' GCCGGGCGTGGTGGCG 3') e B1-R (5' TTGGTTTTTCGAGACAGGGTTTCT 3') (Rinehart e col. 2005); mysTR-F (5' ACGAATTGCTCGAGAGKIHITNGAYCANGG 3') e mysTR-R (5' TGGATCGCTGCGGTARNADRTCRTCCATRTA 3') (Erickson e col. 2011). As reações de PCR continham 1 μL de cada primer (*forward* e *reverse*) (10 μM), 2,5 μL de dNTP (2 mM de cada nucleotídeo), 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão de reação, 1x 0,5 U de Taq DNA polimerase (Promega), 1 μL (aproximadamente 100 ng) de DNA genômico e água ultrapura num volume final de 25 μL. As reações seguiram as seguintes condições: desnaturação inicial com temperatura de 94°C (3 minutos); seguida de 30 ciclos de desnaturação com temperatura de 94°C (1 minuto), temperatura de anelamento entre 40-65°C, com variação de 5°C (1



minuto), alongação com temperatura de 72°C (1 minuto e 30 segundos); uma extensão final a 72°C (10 minutos). Inicialmente, foi feita uma PCR com gradiente de temperatura de anelamento entre 40-65°C para estabelecer a melhor temperatura para cada conjunto de primers. Os produtos de PCR obtidos foram analisados após eletroforese (70V/100A) em gel de agarose 1,2%, imerso em tampão TAE 1x (Tris-ácido acético-EDTA) e corado com brometo de etídio. Os produtos de amplificação foram visualizados em transluminador sob luz ultravioleta e a fotodocumentação foi feita com o programa Doc-ITLS Image Analysis Software. Os pesos moleculares dos fragmentos amplificados foram estimados através da comparação com o marcador de peso molecular (pGEM DNA Markers ou DNA Ladder, Promega). Posteriormente, os fragmentos de interesse foram eluídos, clonados e sequenciados ou marcados e utilizados como sonda em experimentos de FISH.

### **Eluição e ligação dos elementos transponíveis**

Para a eluição dos fragmentos de interesse foi utilizado o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). O DNA das bandas eluídas foi checado através de eletroforese em gel de agarose e posteriormente quantificado no Nanodrop.

A ligação do DNA eluído ao plasmídeo foi feita com o kit pGEM-T Easy Vector (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante.

### **Clonagem dos elementos transponíveis**

A clonagem dos elementos transponíveis foi realizada seguindo as especificações do fabricante (kit pGEM-T Easy Vector, Promega), com modificações:

1. Centrifugar os tubos contendo as reações de ligação;
2. Adicionar 2 µL da reação de ligação para cada amostra em tubo Falcon de 15 mL;
3. Retirar o tubo com células competentes do freezer -80°C e colocar em gelo por 5 minutos. Homogeneizar suavemente;

4. Transferir 50  $\mu$ L de células competentes para cada amostra e 100  $\mu$ L para a reação de controle, utilizando ponteiras refrigeradas;
5. Incubar as amostras em gelo por 20-30 minutos;
6. Transferir as amostras para um banho-maria a 42°C deixar por 45-60 segundos;
7. Incubar novamente em gelo por 2 minutos;
8. Adicionar 950  $\mu$ L de LB líquido sem ampicilina para as ligações e 900  $\mu$ L de LB líquido sem ampicilina para a reação de controle;
9. Incubar por 90 minutos em termoshaker a 37°C e 230 rpm;
10. Plaquear 100  $\mu$ L de cada cultura em placa de LB ágar com X-gal (80  $\mu$ g/mL), IPTG (0,5 mM) e ampicilina (100  $\mu$ g/mL);
11. Incubar em estufa por 16-24h a 37°C;
12. Selecionar as colônias de coloração branca e transferir cada uma delas para diferentes tubos Falcon de 15 mL contendo 10 mL de LB líquido com ampicilina;
13. Incubar as amostras overnight em termoshaker a 37°C e 250 rpm.

A presença de insertos de interesse nos plasmídeos recombinantes foi confirmada por PCR (primers M13 forward e M13 reverse) e os clones positivos foram estocados em glicerina 50% e armazenados a -80°C. Os plasmídeos foram posteriormente extraídos das bactérias usando o kit PureYield Plasmid Miniprep System (Promega), conforme instruções do fabricante.

## **Sequenciamento**

Os insertos de interesse nos plasmídeos recombinantes foram sequenciados por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se os polímeros POP7 e BigDye v3.1 (Myleus Biotechnonology). A confirmação de que os clones sequenciados realmente continham sequências dos elementos transponíveis desejados foi feita através de buscas por similaridade entre sequências depositadas no GenBank com o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.

### **Hibridação *in situ* fluorescente dos elementos transponíveis**

O protocolo utilizado nos experimentos de hibridação dos elementos transponíveis foi semelhante ao descrito para os experimentos de GISH, com as seguintes modificações:

1. Utilizar 200 ng (4  $\mu$ L) de cada elemento transponível marcado com digoxigenina e ressuspendido em meio de hibridação (50% de formamida deionizada/2xSSC) num volume final de 13  $\mu$ L;
2. Manter as lâminas com as sondas em uma câmara de hibridação a 42°C overnight;
3. Proceder à imunodeteção com o anticorpo antidigoxigenina acoplado à rodamina (1:100 em PBT). Após a imunodeteção e os dois banhos de PBT, corar as lâminas com DAPI.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e a discussão serão apresentados em forma de manuscrito, o qual será submetido ao periódico *Chromosoma*.

## MANUSCRITO

### Title: Comparative Genomic In Situ Hybridization and the Role of Transposable Elements in the Karyotype Evolution in Akodontini

Naiara Pereira de Araújo, Gustavo Campos e Silva Kuhn and Marta Svartman\*

Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Citogenômica Evolutiva, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, 31270-901. Belo Horizonte, Brazil.

\* Corresponding author: E-mail: svartmanm@icb.ufmg.br

Telephone number: 5531-34092612

Fax number: 5531-34092567

#### Abstract:

We comparatively analyzed the karyotypes of three species of the diverse tribe Akodontini: *Akodon cursor* ( $2n=14$ , FN=19), *A. montensis* ( $2n=24$ , FN=42), and *Necomys lasiurus* ( $2n=34$ , FN=34). After GTG-banding, the previously reported great homeology between the chromosomes of the three species was confirmed. CBG-banding revealed the presence of small centromeric heterochromatic regions in most chromosomes of the three species. The karyotypes differed by Robertsonian rearrangements, pericentric inversions, centromere repositioning and heterochromatin variation.

Genome comparisons were performed through interspecific fluorescent *in-situ* hybridization (FISH) with total genomic DNA of each species as probes (GISH).

Our results revealed considerable conservation of the euchromatic portions of the three karyotypes and suggest that the differences may be mostly related to their heterochromatic regions to varying degrees. FISH was also performed to assess the distribution of telomeric sequences, long and short interspersed repetitive elements (LINE-1 and B1-SINE) and of the endogenous retrovirus *mysTR* in the genomes of the three species. The results led us to infer that TEs have played an important role in the enormous chromosome variation found in Akodontini.

**Key words:** Karyotype evolution, GISH, Akodontini, telomeric sequences, retroelements

## Introduction

Cricetid rodents of the Akodontini tribe compose the second largest group of the Sigmodontinae subfamily, accounting for approximately 93 described living species within 14 genera (Carleton and Musser 2005; D'Élia et al. 2007). Although they present primarily Andean distribution and can be found in open regions, some species live in nearly all South American biomes (Reig 1984). Within Akodontini, the genus *Akodon*, one of the most complex and speciose within Sigmodontinae, is represented by 43 described species divided into four groups (*aerosus*, *boliviensis*, *cursor* and *dolores*) (Carleton and Musser 2005; Braun et al. 2010; Coyner et al. 2013).

Cytogenetic data have been very useful in species identification and in clarifying some systematic problems in *Akodon*, especially concerning cryptic species (Silva et al. 2006). Furthermore, species of this genus have remarkably highly rearranged karyotypes, with diploid numbers varying from  $2n=9-10$  in *Akodon* sp. n. to  $2n=46$  in *A. serrensis* (Silva and Yonenaga-Yassuda 1998; Geise et al.

1998). Most of this karyotypic variation has been attributed to chromosomal rearrangements, such as pericentric inversions and centric fusions, evidenced by comparative analysis after GTG-banding. The presence of supernumerary chromosomes and sex-chromosome heteromorphisms have also been reported (Sbalqueiro and Nascimento 1996; Fagundes et al. 1997a; Fagundes and Yonenaga-Yassuda 1998; Geise et al. 1998; Silva et al. 2006).

*Akodon cursor* (ACU) has an exceptional variation in diploid numbers ( $2n=14$  to 16) due to a complex rearrangement involving chromosomes 1 and 3, in which pericentric inversions followed by centric fusions gave rise to a karyotype with  $2n=15$  when in heterozygosis or  $2n=14$  when in homozygosis (Fagundes et al. 1997a, 1997b). This species also presents variation in the fundamental number (FN=18 to 26) due to pericentric inversions on pairs 2, 4 and 6 (Fagundes et al. 1998). *Akodon montensis* (AMO) has a basic  $2n=24$ , but the diploid number may vary ( $2n=25-26$ ) due to the addition of B chromosomes (Yonenaga et al. 1975; Kasahara and Yonenaga-Yassuda 1982). *Necromys lasiurus* (NLA) has  $2n=34$ , but some specimens with  $2n=33$ , due to a heterozygous Robertsonian translocation between chromosomes 6 and 7 have been described (Yonenaga 1975; Kasahara and Yonenaga-Yassuda 1983). In fact, FISH experiments revealed an interstitial telomeric signal on the resulting metacentric (6+7) (Fagundes and Yonenaga-Yassuda 1998).

Recently, chromosome painting experiments using whole chromosome-specific probes from *Akodon* sp. n. ( $2n=10$ ), *A. cursor* ( $2n=15$ ), *A. montensis* ( $2n=24$ ) and *A. paranaensis* ( $2n=44$ ) revealed that these species have undergone a recent process of rapid and extensive autosomal rearrangements revealed by the complete homology among their euchromatic portions and including complete

conservation of the Y chromosome (Ventura et al. 2009). Chromosome painting with ACU flow sorted chromosomes in AMO cells revealed 13 homologous segments. Six ACU chromosomes hybridized to whole AMO chromosomes: ACU 3 and AMO1; ACU 4 and AMO 2; ACU 6 and AMO 4; ACU 7 and AMO 1; and the sex chromosomes (Ventura et al. 2009). Subsequently, Ventura et al. (2012), using the entire Y chromosome of *A. paranaensis* as probe demonstrated the partial homology of this chromosome in *A. serrensis* and other five species of different Akodontini genera. This was an unexpected finding, as mammalian Y chromosomes are usually species-specific (Waters et al. 2007).

*Akodon* and *Necromys* have been recognized as closely related genera based on mitochondrial DNA sequences and comparative GTG-banding (Smith and Patton 1991; Fagundes and Yonenaga-Yassuda 1998). Although interspecific chromosome homeology among *Akodon* species and *N. lasiurus* is high, there is no information available on their heterochromatic components, which may have played a role in their genomes differentiation.

Transposable elements (TEs) are considered one of the most abundant components of the heterochromatin. They can play an important role in the genomic diversity and evolutionary changes due to their high activity in transposition and recombination (Böhne et al. 2008). TEs are classified into DNA transposons, which move via DNA intermediates, or retrotransposons, which are generated through retrotranscription via an RNA intermediate. Retrotransposons can be further classified into long terminal repeats (LTRs), as endogenous retroviruses, or non-LTR, the LINEs (long interspersed elements) and SINEs (short interspersed elements) (Wicker et al. 2007).



Many studies have demonstrated the presence of the retrotransposons LINE-1 (L1) and B1-SINE (B1) in mammals and rodents, respectively. However, some studies have shown an expansion of an endogenous retrovirus (mystTR) and activity extinction of L1 and B1 in Sigmodontinae, although lack of activity does not mean complete absence of these sequences (Casavant et al. 2000; Cantrell et al. 2005; Grahn et al. 2005; Rinehart et al. 2005; Erickson et al. 2011).

L1s evolved early during mammalian radiation and are present in marsupial and placental mammals (Smit et al. 1995). Their full-length is over six kilobases (kb) and include two open reading frames (ORFs) and an internal RNA polymerase II promoter (Furano 2000). When active, LINEs are able to encode their own reverse transcriptase and the factors necessary for autonomous retrotransposition. L1s are considered important agents in X chromosome inactivation during female embryogenesis and some species show preferential accumulation of L1s on their X chromosomes. L1s have also been implicated in DNA break repair, in mobilizing itself and other sequences (as pseudogenes and SINEs) and in gene expression regulation (Boyle et al. 1990; Smit et al. 1995; Lyon 1998; Morrish et al. 2002). L1s may also provide sites for ectopic recombination that lead to genome rearrangements, increasing the genetic diversity of a population (Han et al. 2008). L1s may be found in all chromosomes of a species, although most eutherian Y chromosomes do not exhibit these elements (Boyle et al. 1990; Wichman et al. 1992; Baker and Kass 1994; Waters et al. 2004). They are associated to AT-rich regions, producing a banding pattern similar to the GTG-banding in the Euarchontoglires that have been analyzed (human, murid rodents and rabbits), but have never been found in the heterochromatin (Boyle et al. 1990; Wichman et al. 1992; Baker and Kass 1994; Waters et al. 2004). On the other hand, it has been

demonstrated that in Afrotheria, Xenarthra and Laurasiatheria, L1s do not display such banding pattern (Waters et al. 2004).

B1 are short sequences with an average size of 148 base pairs (bp) that originated from the 7SL RNA gene and include an internal RNA polymerase III promoter (Zietkiewicz and Labuda 1996; Schmid and Rubin 2005). Although SINEs function is still not thoroughly understood, they may contribute to maintaining the stability and function of the host genome due to their abundance and evolutionary conservation (Román et al. 2011). In fact, SINEs are able to cause genome expansion through unequal crossover between their copies. They may also regulate gene activity and be associated with mutagenesis by retrotransposition within genes (Kramerov and Vassetzky 2005; Schmid and Rubin 2005). SINEs are usually found in GC-rich regions and do not accumulate on the sex chromosomes (Boyle et al. 1990; Kramerov and Vassetzky 2005).

The endogenous retrovirus *mystTR*, originally identified in the white-footed mouse *Peromyscus leucopus*, is about 2800-2900 bp long and has two ORFs flanked by direct repeats (Wichman et al. 1985). These sequences are primarily located in AT-rich regions, accumulate mainly on the X and Y chromosomes and appear to be absent from the satellite DNA-rich heterochromatin (Wichman et al. 1985; Baker and Wichman 1990; Wichman et al. 1992; Baker and Kass 1994). No function has been associated to *mystTR* sequences, but it is known that endogenous retroviruses may represent a substantial source of genomic variation and promoters, can cause rearrangements by ectopic recombination and disrupt gene regulation (Feschotte and Gilbert 2012).

In this work, we performed comparative genome analyses among two *Akodon* cryptic species (*A. cursor* and *A. montensis*) and *Necromys lasiurus* based

on GTG- and CBG-banding patterns and FISH with telomeric sequence and with total genomic DNA (GISH). We also examined the distribution of the transposable elements L1, B1 and of *mystTR* in the chromosomes of the three species to assess their relation to karyotypic variation.

## **Materials and Methods**

The specimens analyzed are listed in Table 1. The skulls and skins were deposited in the Museu de Ciências Naturais da PUC, Minas Gerais (MCN-M) and in the Mammalian Taxonomic Collection of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Cytogenetic analyses were performed on chromosome preparations obtained directly from bone marrow (Ford and Hamerton 1956). GTG- and CBG-banding patterns were performed according to Seabright (1971) and Sumner (1972), respectively.

Genomic comparisons among males of *Akodon cursor*, *A. montensis* and *Necomys lasiurus* were performed by FISH with total genomic DNA extracted from liver, according to Svartman and Vianna-Morgante (1999). Briefly, chromosome preparations were pretreated with pepsin (100µg/mL in HCl 0.01N) for 10 minutes at 37°C and denatured for 2 minutes in 70% formamide/2xSSC. The genomic DNAs of each species labeled by nick translation with digoxigenin-11-dUTP (DIG-Nick Translation Mix, Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions were used as probe. In control experiments, 250 ng of labeled genomic DNAs in 50% formamide/2xSSC were hybridized to the chromosomes of the same species, allowing to check the efficiency of the probes and of the experiment conditions. In the three species these experiments resulted in labeling throughout all the chromosomes, with brighter signals in the CBG-banded constitutive

heterochromatin and telomeric regions (Supplementary Fig. 1). The hybridization mix with labeled genomic DNAs of each species was applied to the chromosome preparation of the other two species. In order to test the suppression conditions, total labeled DNAs and unlabeled genomic DNAs of each species (proportion 1:100) were pre-annealed at 37°C for an hour and hybridized to the chromosomes of the same species. These experiments resulted in the complete absence of hybridization (Supplementary Fig. 1). In the suppression experiments, the mix probe:suppressor DNA were applied to chromosome preparation of each species. Hybridization was carried out at 37°C for three days and post-hybridization washes consisted of one bath of 2xSSC at 42°C. Immunodetection was performed with antidigoxigenin conjugated with FITC (Roche Applied Science), followed by two baths of PBT (room temperature). The chromosome preparations were counterstained with propidium iodide (0,6ng/μL) and mounted with DAPI (0,8ng/μL) in antifade reagent (Slowfade, Invitrogen). The analyses were performed under a Zeiss Axioimager 2 epifluorescence microscope and the images were captured with the AxioVision software (Zeiss).

A biotinylated telomeric sequence (TTAGGG)<sub>4</sub> (Invitrogen) was synthesized and used as probe for FISH. Hybridization conditions were similar to those described above, with few modifications: (1) the hybridization mix, consisting of 1040 ng of probe in 50% formamide/2xSSC was applied without denaturation, to the denatured chromosomes; (2) hybridization was carried out at 42°C overnight; and (3) immunodetection was performed with avidin conjugated with FITC (Roche Applied Science).

L1, B1 and the endogenous retrovirus mysTR were amplified by PCR from the genomic DNAs of the three species with the following primer sets: L1-F

(5'AAGAATTCCGCAGGATACAAGATCAACTCA3') and L1-R  
(5'AAGGATCCCAATTCGATTCCATTGGT3') (Grahm et al. 2005); B1-F  
(5'GCCGGGCGTGGTGGCG3') and B1-R  
(5'TTGGTTTTTCGAGACAGGGTTTCT3') (Rinehart et al. 2005); mysTR-F  
(5'ACGAATTGCTCGAGAGKIHTIITNGAYCANGG3') and mysTR-R (5'  
TGGATCGCTGCGGTARNADRTRTCRTCCATRTA3') (Erickson et al. 2011). All PCR  
reactions consisted of an initial denaturation step of 94°C for 3 min and a final  
extension at 72°C for 10 min. Between these steps, 30 cycles were performed at  
94°C for 60 s, 40°C for 60 s and 72°C for 90 s (for L1 and mysTR); 94°C for 60 s,  
55°C for 60 s and 72°C for 90 s (for B1). PCR products were purified with the  
Wizard SV Gel and PCR Clean-up System kit (Promega) and cloned into the  
pGEM-T Easy Vector kit (Promega). Recombinant plasmids were sequenced on the  
ABI3130 platform (Myleus Biotechnology). The sequences generated in this study  
have GenBank accession numbers xxxxx-xxxxx (L1), xxxxx-xxxxx (B1), and xxxxx-  
xxxxx (mysTR). Sequenced plasmids were labeled by nick-translation with  
digoxigenin-11-dUTP (DIG-Nick Translation Mix, Roche Applied Science) and used  
as probes for FISH. Hybridization conditions were similar to those described for  
GISH, with some modifications: the hybridization mix consisted of 200 ng of  
digoxigenin-labeled probe and the hybridizations were carried out at 42°C overnight.  
After post-hybridization washes and immunodetection with antidigoxigen conjugated  
with rhodamine, the metaphases were counterstained with DAPI (0,8ng/μL) in  
antifade reagent (Slowfade, Invitrogen).

## **Results and Discussion**

### **Comparative Banding Patterns**

The karyotypes of *Akodon cursor* (ACU,  $2n=14$ , FN=19), *A. montensis* (AMO,  $2n=24$ , FN=42) and *Necomys lasiurus* (NLA,  $2n=34$ , FN=34), including their GTG- and CBG-banding patterns have been previously described (Yonenaga et al. 1975; Yonenaga-Yassuda 1979, Kasahara and Yonenaga-Yassuda 1982, 1983). Our results were in agreement with data from the literature. The two ACU males analyzed herein had a heteromorphic pericentric inversion on pair 3, which was metacentric/acrocentric, explaining the odd FN.

A comparative interspecific analysis of the GTG-banded chromosomes allowed us to establish a complete homeology among most chromosome arms of the three complements. Some chromosomes showed complete correspondence: ACU 3 with AMO 2; AMO 10 and NLA 15; the smallest autosome of each complement (ACU 6, AMO 11 and NLA 16) and the X chromosomes of the three species (Fig. 1a; Table 2). However, it was not possible to establish the correspondence of part of ACU 2 and of the entire AMO 6 to any NLA chromosomes (Fig. 1a, Table 2), similar to other studies. Our results confirm previously reported findings (Fagundes et al. 1997b; Fagundes and Yonenaga-Yassuda 1998; Geise et al. 1998) that were supported by chromosome painting data (Ventura et al. 2009).

Centric fusions explain the differentiation of some chromosomes: NLA 6 and 7 correspond to AMO 3 and to part of ACU 2; NLA 4 and 3 are homeologous to the short and long arms of ACU 3 and AMO 2, respectively, and NLA 8 and 12 correspond to ACU 5 and AMO 4. ACU 1 corresponds to AMO 1, 7, 8 and 9 and from NLA 2, 5, 9, 10, 11, 13 and 14, but pericentric inversions are also involved in the differentiation of these chromosomes. Robertsonian rearrangements followed by

pericentric inversions were proposed as the primary mechanisms involved in the karyotypic evolution of these rodents (Fagundes and Yonenaga-Yassuda 1998).

Changes in chromosome morphology without apparent variation in their GTG-banding patterns were observed between the metacentric AMO 5 and the acrocentric NLA 1, and also between the metacentric AMO 9 and the acrocentric NLA 9. These observations suggest the occurrence of centromeric repositioning, not a result of pericentric inversions as previously published (Fagundes e Yonenaga-Yassuda 1998). Furthermore, centromere repositioning and centric fusion are probably involved in the differentiation of ACU 4 from AMO 5 and 10 and NLA 15. Ventura et al. (2009) also suggested that ACU 4 may have undergone a pericentric inversion or centromeric repositioning.

CBG-banding (Fig. 1b) in ACU revealed constitutive heterochromatin in the centromeric regions of all chromosomes, except in pair 4 and in the Y chromosome. Pair 3 also had heterochromatic telomeric regions. AMO had weak CBG-bands in the centromeric constitutive heterochromatin of all the autosomes and the X chromosome. The Y chromosome was almost entirely heterochromatic (Fig. 1b). In NLA, centromeric CBG-bands were present in all autosomes and in the X chromosome. The Y chromosome was almost completely heterochromatic (Fig. 1b).

### **FISH with a Telomeric Probe**

FISH with the telomeric probe yielded signals at both telomeres of each chromosome in the three species analyzed. No additional signals were found in ACU (Fig. 2a). This result differs from those of Fagundes et al. (1997a, 1997b), in which interstitial telomeric sequences (ITSs) were found on pair 1 and on chromosome 1+3 of the karyotypes with  $2n=14$  and  $2n=15$ , respectively. The

presence of ITSs led the authors to suggest that pair 1 in the  $2n=14$  karyotype originated after a pericentric inversion and a centric fusion occurred in an ancestral karyotype with  $2n=16$ . Nevertheless, the ACU specimens with  $2n=15$  analyzed by Ventura et al. (2009), did not display ITS on chromosome 1+3.

The AMO karyotype had ITSs on the centromeric region of pairs 3, 4 and 7 (Fig. 2b). These sites correspond to fusions/fissions involved in the differentiation of the AMO and NLA complements (Fig. 2b, Table 2). AMO 3 corresponds to NLA 6 and 7; AMO 4 to NLA 8 and 12 and AMO 7 to NLA 14 and part of NLA 2. FISH with a telomeric probe on AMO chromosomes has been previously performed by Fagundes and Yonenaga-Yassuda (1998) and Ventura et al. (2009), who did not find ITSs. On the other hand, Fagundes and Yonenaga-Yassuda (1998) found ITSs on the metacentric NLA 6+7 of the karyotype with  $2n=33$ , which corresponds to AMO 3, and suggested that it resulted from a recent rearrangement event.

NLA chromosomes displayed large telomeric signals on the centromeric regions of pairs 3 and 15 and on the sexual pair. In addition, pair 16 hybridized throughout its extension (Fig. 2c). Fagundes and Yonenaga-Yassuda (1998) also found variation in the intensity of telomeric signals near the centromeres in NLA, mostly on the X chromosome. A similar pattern was also observed in *A. lindberghi* and *A. serrensis*, which presented strong signals on the pericentromeric regions of the autosomes (Ventura et al. 2006). *A. lindberghi* had additional signals on the pericentromeric region of the X chromosome and the smallest chromosome (pair 20) presented signals in one or both arms (Ventura et al. 2006). As already suggested by Fagundes and Yonenaga-Yassuda (1998) and Ventura et al. (2006), our results point to the presence of  $(T_2AG_3)_n$  sequences in the heterochromatin of chromosomes NLA 3, 15, X and Y, and in the euchromatin of pair 16.



Although ACU 6 and AMO 11 seem homeologous to NLA 16 after GTG-banding (Fig. 1a), ITSs were present only in NLA 16. AMO 10 also differed from NLA 15 and both *Akodon* X chromosomes from the NLA X due to the presence of telomeric sequences in their pericentromeric regions (Fig. 2).

The origin of ITSs is still debated, but it is thought that they may represent remnants of ancestral chromosome rearrangements, such as inversions and centric or tandem fusions (Meyne et al. 1990; Ruiz-Herrera et al. 2008). In *Akodon*, ITSs located on pericentromeric regions were also found in chromosome 1 of *Akodon* sp. (Silva and Yonenaga-Yassuda 1998); pair 22 of *A. serrensis* (Ventura et al. 2006) and pairs 4 and 5 of *A. dolores* (Vieira et al. 2004). In all these cases, the authors suggested that the ITSs represented remnants of fusions.

Amplification events may lead to the formation of large ITSs, whereas deletions may result in their absence or reduction of size, preventing their visualization after FISH (Lin and Yan 2008). This kind of events are likely the reason of the variable results obtained by us and different authors (Fagundes et al., 1997a, 1997b; Ventura et al. 2009) in the ACU and AMO chromosomes. ITSs have also been suggested to be associated with non-telomeric repetitive sequences (Meyne et al. 1990; Ruiz-Herrera et al. 2008), which seems to be the case in NLA.

### **Genomic Comparisons through Fluorescent *in situ* Hybridization (GISH)**

The degree of homeology among the genomes of ACU, AMO and NLA was assessed through interspecific GISH using total genomic DNAs as probes (Fig. 3). The comparison between ACU and AMO resulted in hybridization of all euchromatic regions. The pericentromeric heterochromatin of ACU 1, 3, 6 and X and the heterochromatin of all autosomes and of the sexual pair of AMO showed bright

signals (Fig. 3). In the suppression experiments, the heterochromatin of ACU 2, 5 and X and of AMO 11 and X hybridized, showing that they are species-specific. Therefore, the heterochromatic regions of AMO 11 and of the X chromosomes of both species seem to share more repetitive sequences than those species-specific (Fig. 3). Interestingly, the Y chromosomes of ACU and AMO hybridized throughout their extension, including the heterochromatic regions, suggesting a very similar DNA composition in both species. Ventura et al. (2009) obtained similar results using interspecific hybridizations with flow sorted Y chromosomes of ACU, AMO, *Akodon* sp. (2n=10) and *A. paranaensis*, which led them to conclude that this chromosome is conserved in *Akodon* species.

Interspecific hybridizations with labeled DNAs of each *Akodon* species and NLA resulted in labeling of all euchromatic regions (Fig. 3), suggesting a high homology between these regions in both genera. On the other hand, the autosomal heterochromatic segments did not hybridize, pointing to their divergence. Suppression experiments resulted in hybridization of all the autosomal and X chromosomes constitutive heterochromatin (Fig. 3). Our experiments evidenced that the Y chromosomes of both *Akodon* species and NLA seem to share great part of their contents (Fig. 3). Using the flow sorted *A. paranaensis* Y chromosome as probe, Ventura et al. (2012) also demonstrated the conservation of Y euchromatic regions between this species and NLA. Together, these results contradict the commonly held notion that mammalian Y chromosomes are remarkably species-specific (Waters et al. 2007).

Comparative analyses of Y chromosomes are scarce in the literature and the few examples of interspecific hybridizations using Y chromosome probes point to their specificity. For example, Acosta et al. (2011) demonstrated a poor

conservation of the Y chromosome among six arvicolid rodents. Among them, only the euchromatic Y chromosome region of *M. cabreræ* and *M. agrestis* share similar sequences. The absence of the Y chromosome euchromatin conservation could be a result of the degenerative processes that lead the particular evolution of this chromosome (Wilson and Makova 2009).

### **Distribution of Transposable Elements (TEs)**

PCR from genomic DNA of ACU, AMO, and NLA with primers specific for L1 and B1 resulted in amplicons of expected sizes of approximately 500 pb and 150 pb, respectively. The PCR with primers specific for *mystTR* did not yield products for AMO and NLA, whereas a smear was obtained with ACU genomic DNA. For these reasons, we performed the same PCR using the genomic DNA of another species, *Akodon* sp. ( $2n=44$ , FN=46), and obtained amplicons of the expected size (~800bp). After cloning and sequencing, we ended up with three clones representing the three retrotransposon sequences. These clones were labeled with digoxigenin and hybridized to the chromosomes of each species (Fig. 4).

L1 sequences showed a dispersed distribution, but preferentially located to DAPI dark bands in ACU, AMO and NLA chromosomes, which correspond to the AT-rich regions. No hybridization signals were found in the constitutive heterochromatin and on the corresponding autosomes ACU 6, AMO 11 and NLA 16. The Y chromosomes were devoid of hybridization signals and the X chromosomes presented few signals in the three species (Fig. 4). These results differ to those obtained in *M. musculus*, *P. maniculatus*, and four species of *Taterillus* in which a nonrandom GTG-banding-like distribution of L1 was reported (Boyle et al. 1990; Wichman et al. 1992; Baker and Kass 1994; Dobigny et al.

2004). Nevertheless, the X and Y chromosomes of these species, differently from ours, were labeled by L1 throughout their lengths.

The lack of L1 signals in the constitutive heterochromatin of ACU, AMO and NLA is in agreement with the results presented for *M. musculus* and *P. maniculatus* (Boyle et al. 1990; Wichman et al. 1992; Baker and Kass 1994).

L1 accumulation on the X chromosome of eutherian mammals has been associated with chromosome inactivation during female embryogenesis (Lyon 1998; Waters et al. 2004). However, in Sigmodontinae these sequences seem to have lost transposition activity around 8.8 million years ago (Casavant et al. 2000; Grahn et al. 2005; Rinehart et al. 2005; Erickson et al. 2011), which may explain the few signals observed on the X chromosomes of the species that we analyzed. Specifically, it has been suggested that L1 interacts with XIST to silence genes on the inactive X (Lyon 1998). Cantrell et al. (2009) studied this relationship in the Sigmodontinae *Oryzomys palustris* and, although this species lacks L1 activity, X-inactivation was normal. Our experiments together with those of Cantrell et al. (2009) suggest that L1 is not required for X-inactivation in the species studied and point to the need of this kind of analyses in additional Sigmodontinae.

B1 elements preferentially hybridized to the GC-rich light DAPI bands of the karyotypes of the three Akodontini species analyzed (Fig. 4). B1 did not co-localize with L1 and was not preferentially accumulated on the sex chromosomes. Because B1 seemed to hybridize to telomeres in AMO (Fig. 4), we performed double FISH with B1 and telomeric probes. This experiment revealed that B1 did not co-localize neither with the telomeres nor with the ITSs of AMO 3, 4 and 7 (Fig. 4). Interestingly, B1 presented a nonrandom distribution with patterns conserved in some chromosomes of both *Akodon* species but not in the corresponding NLA

chromosomes (Fig. 5). For example, the long arm of AMO 9 presented great accumulation of B1, similarly to the corresponding ACU 1 region, but B1 accumulation was absent from the corresponding region of NLA 9 (Fig. 5). B1 also produced signals on the pericentromeric region of AMO 1 and on its corresponding segment on ACU 1, but not on the homeologous NLA 2. The corresponding chromosomes ACU 2 and AMO 3 and 6 presented a dispersed distribution of B1. On the other hand, NLA 6 presented a great accumulation of B1 that was not observed on its counterparts. The same pattern could be observed between ACU 5, AMO 4, NLA 8 and 12. ACU3 and AMO 2 showed B1 signals at their pericentromeric regions, which were not evident on the corresponding NLA 3 and 4 segments. Furthermore, ACU 4 had signals at its pericentromeric region, as did its counterpart AMO 5. AMO 10 presented a dispersed B1 distribution, not observed in the corresponding NLA 15 (Fig. 5).

All the chromosome regions pointed out above have been suggested as sites of fusions/fissions and pericentric inversions during the karyotypic evolution of these species. The accumulation of B1 in these regions allows us to hypothesize a relationship between these repetitive sequences and the occurrence of rearrangements. Indeed, TEs have been previously associated with chromosome rearrangements and with the induction of insertions and deletions (Cáceres et al. 1999; Evgen'ev et al. 2000). Our results suggest that further analyses of B1 distribution in *Akodontini* may shed light on the mechanisms involved in the high degree of karyotypic change observed in these rodents.

MysTR sequences were located in dark DAPI bands of ACU, AMO and NLA and Y chromosomes of the three species showed preferential accumulation of this element (Fig. 4). In both *Akodon* species, mysTR sequences did not hybridize to the

heterochromatin and to the entire extent of chromosomes ACU 6 and AMO 11 (Fig. 4). The absence of *mysTR* elements was also observed in autosomal CBG-banded regions of some *Peromyscus* species (Baker and Wichman 1990; Wichman et al. 1992; Baker and Kass 1994). On the other hand, labeling occurred in the heterochromatic region of most chromosomes of NLA (Fig. 4). In this species, double-FISH with telomeric and *mysTR* sequences as probes revealed a few co-localizations in some autosomes and in the transition between the euchromatic and heterochromatic portions of the Y chromosome (Fig. 4). *MysTR* and (TTAGGG)<sub>n</sub> do not show sequence similarity. FISH on metaphase chromosomes may produce distinct signals for sequences separated by at least 1 Mb (Heiskanen et al. 1996). Therefore, the seemingly co-localization of *MysTR* and (TTAGGG)<sub>n</sub> probably results from a constraint of the technique.

According to Cantrell et al. 2005, *mysTR* sequences showed a dispersed distribution throughout all chromosomes of *Oryzomys palustris*, but the authors did not mention their location on the sex chromosomes. A preferential accumulation of *mysTR* on the Y chromosome, similar to that observed in our specimens, has also been reported in *Peromyscus* species, which, differently from the species analyzed herein, also accumulated *mysTR* on the X (Baker and Wichman 1990; Wichman et al. 1992; Baker and Kass 1994). Chromosome painting with Y-specific probes in ten Akodontini species revealed interspecific homologies of some segments (Ventura et al. 2009, 2012). We obtained similar results with the GISH experiments (Fig. 3). Additionally, we observed strong hybridization signals on the Y chromosomes of *Akodon* and *Necromys* with the *mysTR* probe. These observations suggest that the Y chromosome portion shared by Akodontini species may actually represent *mysTR*

sequences. The hybridization of mysTR in additional Akodontini should help to test this hypothesis.

Retroviruses depend on the host cell replication to integrate into the genome (Feschotte and Gilbert 2012). Thus, a larger number of cell divisions in the male germ line could explain the preferential accumulation of the endogenous retrovirus mysTR on the Y and not on the autosomes and X chromosomes of Akodontini, as suggested for human Y-chromosome retroviruses (Erlandsson et al. 2000). In addition, endogenous retrovirus accumulation could result from the lack of Y chromosome homologous interchromosomal recombination.

In summary, our results confirmed that the differences among the karyotypes of *Akodon cursor*, *A. montensis* and *Necomys lasiurus* are due to Robertsonian rearrangements, pericentric inversions and centromere repositioning. Additionally, we demonstrated that heterochromatin variation and TEs are involved in the karyotypic differentiation of these species. The genomic distribution of TEs suggests an association between those repetitive sequences and the great karyotypic variability of *Akodon* and *Necomys*. Further studies of TEs distribution in Akodontini may shed some light in the understanding of the genome evolution of the highly rearranged complements of this mammalian group.

### **Acknowledgements**

The specimens were collected under the permits 12989-2, 14868-1 and 14868-2 (SISBIO). We are indebted to Flávia Vieira Nunes, Thais Morcatty and Dr. Adriano Pereira Paglia, who provided us with the biological samples used. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq) to MS and GCSK. NPA was a recipient of a Masters fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## References

Acosta MJ, Romero-Fernández I, Sánchez A, Marchal JA (2011) Comparative analysis by chromosome painting of the sex chromosomes in arvicolid rodents. *Cytogenet Genome Res* 132:47-54. doi: 10.1159/000318012

Baker RJ, Wichman HA (1990) Retrotransposon *mys* is concentrated on the sex chromosomes: implications for copy number containment. *Evol* 44:2083-2088

Baker RJ, Kass DH (1994) Comparison of chromosomal distribution of a retroposon (LINE) and a retrovirus-like element *mys* in *Peromyscus maniculatus* and *P. leucopus*. *Chromosome Res* 2:185-189. doi: 10.1007/BF01553318

Böhne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, Schultheis C, Volff J (2008) Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Res* 16:203-215. doi: 10.1007/s10577-007-1202-6

Boyle AL, Ballard SG, Ward DC (1990) Differential distribution of long and short interspersed element sequences in the mouse genome: chromosome karyotyping by fluorescence *in situ* hybridization. *PNAS* 87:7757-7761

Braun JK, Mares MA, Coyner BS, Van Den Bussche RA (2010) New species of *Akodon* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) from Central Argentina. *J Mammal* 91:387-400. doi: 10.1644/09-MAMM-A-048.1

Cáceres M, Ranz JM, Barbadilla A, Long M, Ruiz A (1999) Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. *Science* 285: 415-418. doi: 10.1126/science.285.5426.415



Cantrell MA, Ederer MM, Erickson IK, Swier VJ, Baker RJ, Wichman HA (2005) MysTR: an endogenous retrovirus family in mammals that is undergoing recent amplifications to unprecedented copy numbers. *J Virol* 79:14698-14707. doi: 10.1128/JVI.79.23.14698-14707.2005

Cantrell MA, Carstens BC, Wichman HA (2009) X chromosome inactivation and *Xist* evolution in a rodent lacking LINE-1 activity. *PLoS ONE* 4:e6252. doi: 10.1371/journal.pone.0006252

Carleton MD, Musser GG (2005) *Ordem Rodentia*. In: *Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Edited by Wilson DE and Reeder DM. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md. pp 312-529

Casavant NC, Scott L, Cantrell MA, Wiggins LE, Baker RJ, Wichman HA (2000) The end of the LINE?: Lack of recent L1 activity in a group of South American rodents. *Genetics* 154:1809-1817

Coyner BS, Braun JK, Mares MA, Van Den Bussche, RA (2013) Taxonomic validity of species groups in the genus *Akodon* (Rodentia, Cricetidae). *Zool Scr* 42:335-350. doi: 10.1111/zsc.12014

D'Elía G, Pardiñas UFJ, Teta P, Patton JL (2007) Definition and diagnosis of a new tribe of sigmodontine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae), and a revised classification of the subfamily. *Gayana* 71:187-194

Dobigny G, Ozouf-Costaz C, Waters PD, Bonillo C, Coutanceau J, Volobouev V (2004) LINE-1 amplification accompanies explosive genome repatterning in rodents. *Chromosome Res* 12:787-793. doi: 10.1007/s10577-005-5265-y

Erickson IK, Cantrell MA, Scott L, 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

Erlandsson R, Wilson JF, Pääbo S (2000) Sex chromosomal transposable element accumulation and male-driven substitutional evolution in humans. *Mol Biol Evol* 17:804-812

Evgen'ev MB, Zelentsova H, Poluectova H, Lyozin GT, Veleikodvorskaja, V (2000) Mobile elements and chromosomal evolution in the *virilis* group of *Drosophila*. *PNAS* 97:11337-11342. doi: 10.1073ypnas.210386297

Fagundes V, Vianna-Morgante AM, Yonenaga-Yassuda Y (1997a) Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent *Akodon cursor* (2n=14, 15 and 16). *Chromosome Res* 5:228-232. doi: 10.1023/A:1018463401887

Fagundes V, Scalzi-Martin JM, Sims K, Hozier J, Yonenaga-Yassuda Y (1997b) Zoo-FISH of a microdissection DNA library and G-banding patterns reveal the homeology between the Brazilian rodents *Akodon cursor* and *Akodon montensis*. *Cytogenet Cell Genet* 78:224-228. doi: 10.1159/000134662

Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y (1998) Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. *Chromosome Res* 6:643-648. doi: 10.1023/A:1009213712370

Fagundes V, Christoff AU, Yonenaga-Yassuda Y (1998) Extraordinary chromosomal polymorphism with 28 different karyotypes in the neotropical species *Akodon cursor* (Muridae, Sigmodontinae), one of the smallest diploid number in rodents (2n=16, 15 and 14). *Hereditas* 129:263-274. doi: 10.1111/j.1601-5223.1998.00263.x

Feschotte C, Gilbert C (2012) Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. *Nature Rev Genet* 13:283-296. doi: 10.1038/nrg3199

Ford CE, Hamerton JL (1956) A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol* 31:247-251. doi: 10.3109/10520295609113814

Furano AV (2000) The biological properties and evolutionary dynamics of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 64:255-294. doi: 10.1016/S0079-6603(00)64007-2

Geise L, Canavez FC, Seuanez HN (1998) Comparative karyology in *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) from Southeastern Brazil. *J Hered* 89:158-163. doi: 10.1644/1545-1542(2001)082<0092:DITGAR>2.0.CO;2

Grahn RA, Rinehart TA, Cantrell MA, Wichman HA (2005) Extinction of LINE-1 activity coincident with a major mammalian radiation in rodents. *Cytogenet Genome Res* 110:407-415. doi: 10.1159/000084973

Han K, Lee J, Meyer TJ, Remedios P, Goodwin L, Batzer MA (2008) L1 recombination associated deletions generate human genomic variation. *PNAS* 105:19366-19371. doi: 10.1073/pnas.0807866105

Heiskanen M, Peltonen L, Palotte A (1996) Visual mapping by high resolution FISH. *Trends Genet* 12:379-382. doi: 10.1016/0168-9525(96)30083-8

Kasahara S, Yonenaga-Yassuda Y (1982) Chromosomal variability in *Akodon* sp. (Rodentia, Cricetidae). *Cytologia* 47:317-324. doi: 10.1508/cytologia.47.317

Kasahara S, Yonenaga-Yassuda Y (1983) Sex-chromosome variability in *Zygodontomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae). *Cytologia* 48:569-576. doi: 10.1508/cytologia.48.569

Kramerov DA, Vassetzky NS (2005) Short retroposons in eukaryotic genomes. *Int Rev Cytol* 247:165-221. doi: 10.1016/S0074-7696(05)47004-7

Lin KW, Yan J (2008) Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutat Res* 658:95-110. doi: 10.1016/j.mrrev.2007.08.006

Lyon MF (1998) X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet* 80:133-137. doi: 10.1159/000014969

Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyzis RK (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99:3-10. doi: 10.1007/BF01737283

Morrish TA, Gilbert N, Myers JS, Vincent BJ, Stamato TD, Taccioli GE, Batzer MA, Moran JV (2002) DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nature Genet* 31:159-165. doi: 10.1038/ng898

Reig OA (1984) Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae). *Rev Brasil Genet* 7:333-365

Rinehart TA, Grahn RA, Wichman HA (2005) SINE extinction preceded LINE extinction in sigmodontine rodents: implications for retrotranspositional dynamics and mechanisms. *Cytogenet Genome Res* 110:416-425. doi: 10.1159/000084974

Román AC, González-Rico FJ, Fernández-Salguero PM (2011) B1-SINE retrotransposons – establishing genomic insulatory networks. *Mob Genet Elements* 1:66-70. doi: 10.4161/mge.1.1.15455

Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santogostino M, Giulotto E (2008) Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res* 122:219-228. doi: 10.1159/000167807

- Sbalqueiro IJ, Nascimento AP (1996) Occurrence of *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae) with 14, 15 and 16 chromosome cytotypes in the same geographic area in Southern Brazil. *Braz J Genet* 19:565-569. doi: 10.1590/S0100-84551996000400005
- Schmid CW, Rubin CM (2005) Short interspersed elements (SINEs). *ELS* 1-4. doi: 10.1038/npg.els.0005325
- Seabright M (1971) A rapid technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-972. doi:10.1016/S0140-6736(71)90287-X
- Silva MJJ, 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, Patton JL, Yonenaga-Yassuda Y (2006) Phylogenetic relationships and Karyotype evolution in the sigmodontine rodent *Akodon* ( $2n=10$  and  $2n=16$ ) from Brazil. *Genet Mol Biol* 29:469-474. doi: 10.1590/S1415-47572006000300012
- Smit AFA, Tóth G, Riggs AD, Jurka J (1995) Ancestral, mammalian-wide subfamilies of LINE-1 repetitive sequences. *J Mol Biol* 246:401-417. doi: 10.1006/jmbi.1994.0095
- Smith MF, Patton JL (1991) Variation in mitochondrial cytochrome *b* sequence in natural populations of South American Akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Mol Biol Evol* 8:85-103
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exptl Cell Res* 75:304-306. doi: 10.1016/0014-4827(72)90558-7

- Svartman M, Vianna-Morgante AM (1999) Comparative genome analysis in American marsupials: chromosome banding and *in-situ* hybridization. *Chromosome Res* 7:267-275. doi: 10.1023/A:1009274813921
- Ventura K, Silva MJJ, Fagundes V, Christoff AU, Yonenaga-Yassuda Y (2006) Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG)<sub>n</sub> arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). *Cytogenet Genome Res* 115:169-175. doi: 10.1159/000095238
- Ventura K, O'Brien PCM, Yonenaga-Yassuda Y, Ferguson-Smith MA (2009) Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four *Akodon* species (Rodentia, Cricetidae) resolved by reciprocal chromosome painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents. *Chromosome Res* 17:1063-1078. doi: 10.1007/s10577-009-9083-5
- Ventura K, Yonenaga-Yassuda Y, Ferguson-Smith MA (2012) Variable patterns of Y chromosome homology in Akodontini rodents (Sigmodontinae): a phylogenetic signal revealed by chromosome painting. *Chromosome Res* 20:427-433. doi: 10.1007/s10577-012-9286-z
- Vieira A, Ortiz MI, Pinna-Senn E, Dalmaso G, Bella JL, Lisanti JA (2004) Chromosomal localization of telomeric sequences in three species of *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae). *Cytogenet Genome Res* 107:99-102. doi: 10.1159/000079577
- Waters PD, Dobigny G, Pardini AT, Robinson TJ (2004) LINE-1 distribution in Afrotheria and Xenarthra: implications for understanding the evolution of LINE-1 in eutherian genomes. *Chromosoma* 113:137-144. doi: 10.1007/s00412-004-0301-9

- Waters PD, Wallis MC, Graves JAM (2007) Mammalian sex – origin and evolution of the Y chromosome and SRY. *Semin Cell Dev Biol* 18:389-400. doi: 10.1016/j.semcdb.2007.02.007
- Wichman HA, Potter SS, Pine DS (1985) *Mys*, a family of mammalian transposable elements isolated by phylogenetic screening. *Nature* 317:77-81. doi: 10.1038/317077a0
- Wichman HA, Van Den Bussche RA, Hamilton MJ, Baker RJ (1992) Transposable elements and the evolution of genome organization in mammals. *Genetica* 86:287-293. doi: 10.1007/BF00133727
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Schulman AH (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Rev Genet* 8:973-982. doi: 10.1038/nrg2165
- Wilson MA, Makova KD (2009) Genomic analyses of sex chromosome evolution. *Annu Rev Genomic Hum Genet* 10:333-354. doi: 10.1146/annurev-genom-082908-150105
- Yonenaga Y (1975) Karyotypes and chromosome polymorphism in Brazilian rodents. *Caryologia* 28:269-286. doi: 10.1080/00087114.1975.10796617
- Yonenaga Y, Kasahara S, Almeida EJC, Peracchi AL (1975) Chromosomal banding patterns in *Akodon arviculoides* (2n=14), *Akodon* sp. (2n=24 and 25), and two male hybrids with 19 chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 15:388-399. doi: 10.1159/000130538
- Yonenaga-Yassuda Y (1979) New karyotypes and somatic and germ-cell banding in *Akodon arviculoides* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenet Cell Genet* 23:241-249. doi: 10.1159/000131334

Zietkiewicz E, Labuda D (1996) Mosaic evolution of rodent B1 elements. *J Mol Evol* 42:66-72. doi: 10.1007/BF00163213



Table 1 Specimens analyzed.

Species	2n	FN	Collection Sites	Deposit Numbers (Sex)
<i>Akodon cursor</i>	14	19	Conceição do Mato Dentro/MG (19°02'13"S 43°25'30"W)	MCN-M 2249 (M)
			Rio Pomba/MG (21°16'30"S 43°10'44"W)	PRONEM110 (M)
<i>Akodon montensis</i>	24	42	Morada Nova de Minas/MG (18°36'14"S 45°21'25"W)	MCN-M 2277 (M)
			Catas Altas (20°04'30"S 43°24'28"W)	MCN-M1586 (F)
<i>Akodon sp</i>	44	46	Santana do Riacho/MG (19°10'08"S 43°42'50"W)	MCN-M 986 (M)
<i>Necromys lasiurus</i>	34	34	Augusto de Lima/MG (18°06'32"S 44°16'01"W)	UFMG 3836 (M)

2n – diploid number; FN – fundamental number; M – male; F – female; MCN-M – Museu de Ciências Naturais PUC, Minas Gerais; UFMG - Mammalian Taxonomic Collection of the Universidade Federal de Minas Gerais.

Table 2 Correspondence of GTG-banded chromosomes of *Akodon cursor* (ACU; 2n=14, FN=19), *Akodon montensis* (AMO; 2n=24, FN=42) and *Necomys lasiurus* (NLA; 2n=34, FN=34).

NLA	5 10 2	14 13 11 9	7	6	?	4	3	1	15	12	8	16	X
AMO	1	7 8 9	3p	3q	6	2p	2q	5	10	4p	4q	11	X
ACU	1p	1q	2			3*p	3*q	4		5		6	X

\* The metacentric chromosome was used in this comparison; p = short arm; q = long arm

## Figures

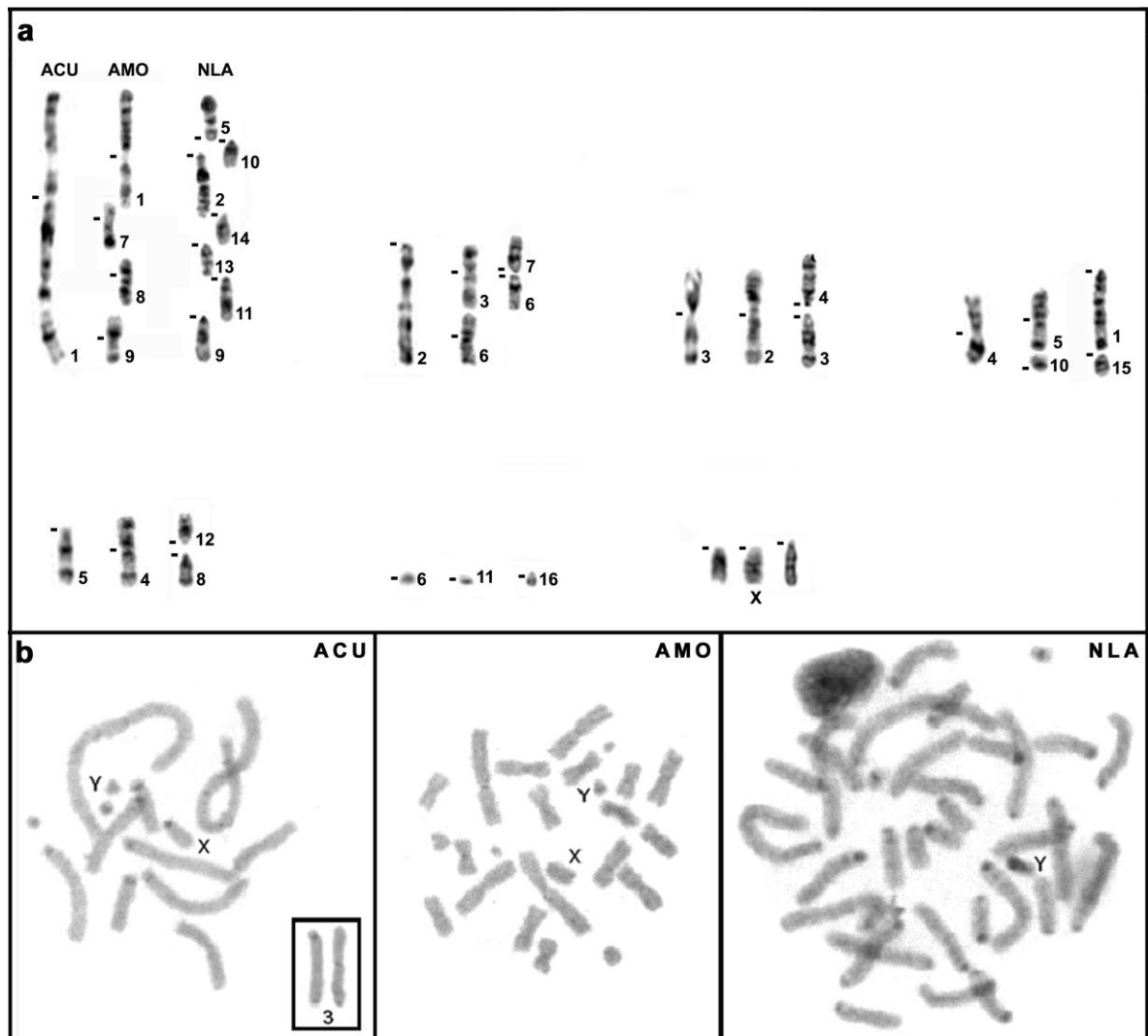


Fig.1. (a) Correspondence between the GTG-banded chromosomes of Akodontini. *Akodon cursor* (ACU) ( $2n=14$ ), on the left, *A. montensis* (AMO) ( $2n=24$ ), in the middle, and *Necromys lasiurus* (NLA) ( $2n=34$ , FN=34), on the right; and (b) CBG-banded cells of the same species. In (b) pair 3 is shown in the inset. (-) = centromere position.

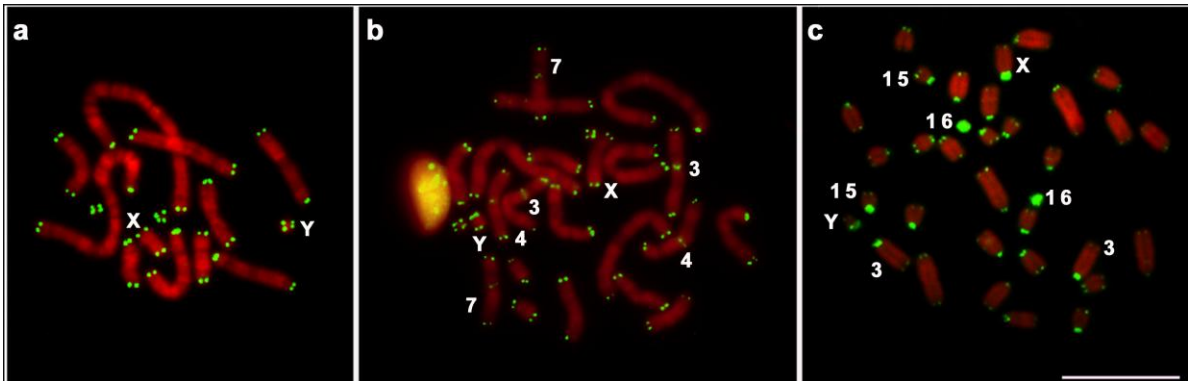


Fig. 2. FISH with a telomeric probe in: (a) *Akodon cursor* ( $2n=14$ ,  $FN=19$ ); (b) *A. montensis* ( $2n=24$ ,  $FN=42$ ) and (c) *Necromys lasiurus* ( $2n=34$ ,  $FN=34$ ). Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

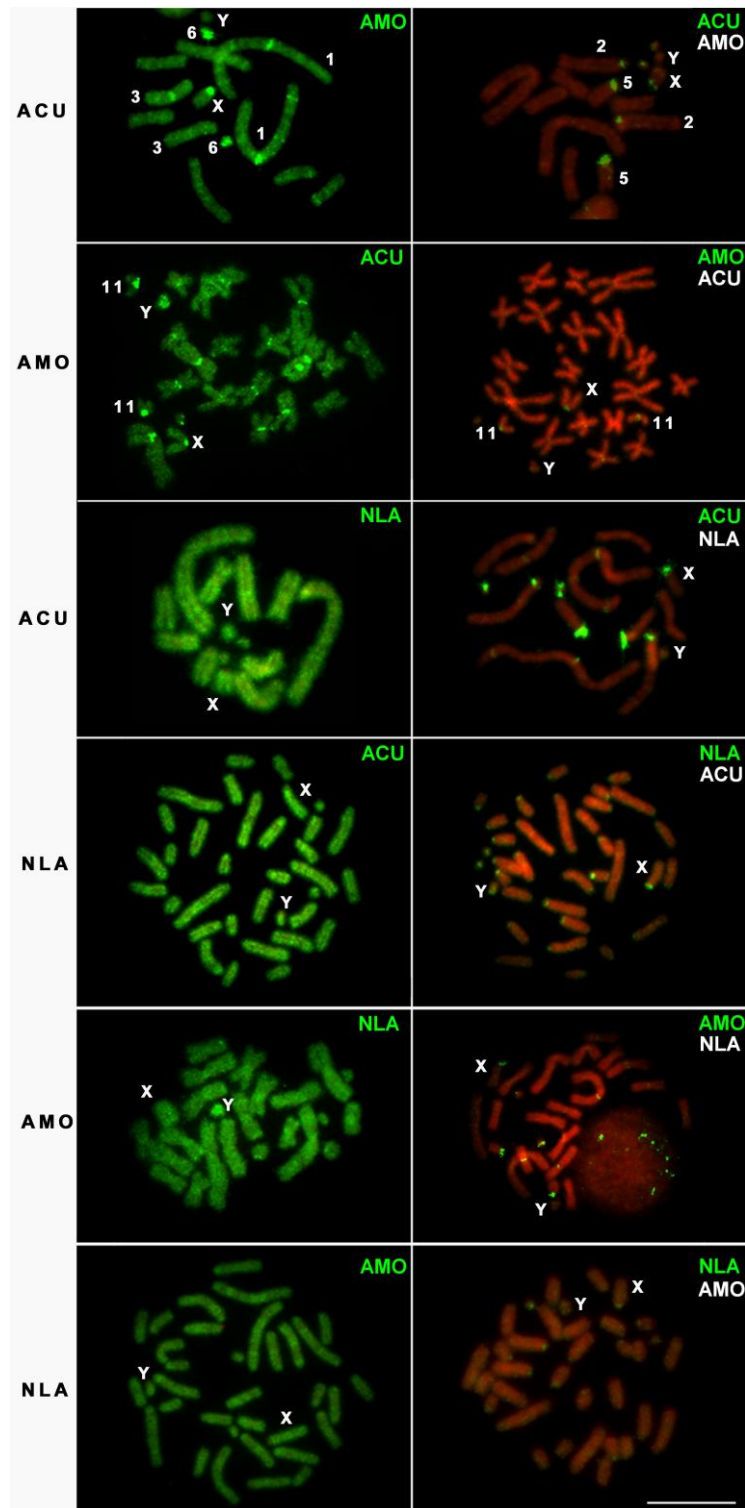


Fig. 3. Interspecific GISH among *Akodon cursor* (ACU), *A. montensis* (AMO) and *Necromys lasiurus* (NLA). The initials on the right correspond to the species cells. The labeled DNA used is identified in green and the suppressor DNA is represented in white. All the cells were counterstained with propidium iodide. Bar = 10  $\mu$ m.

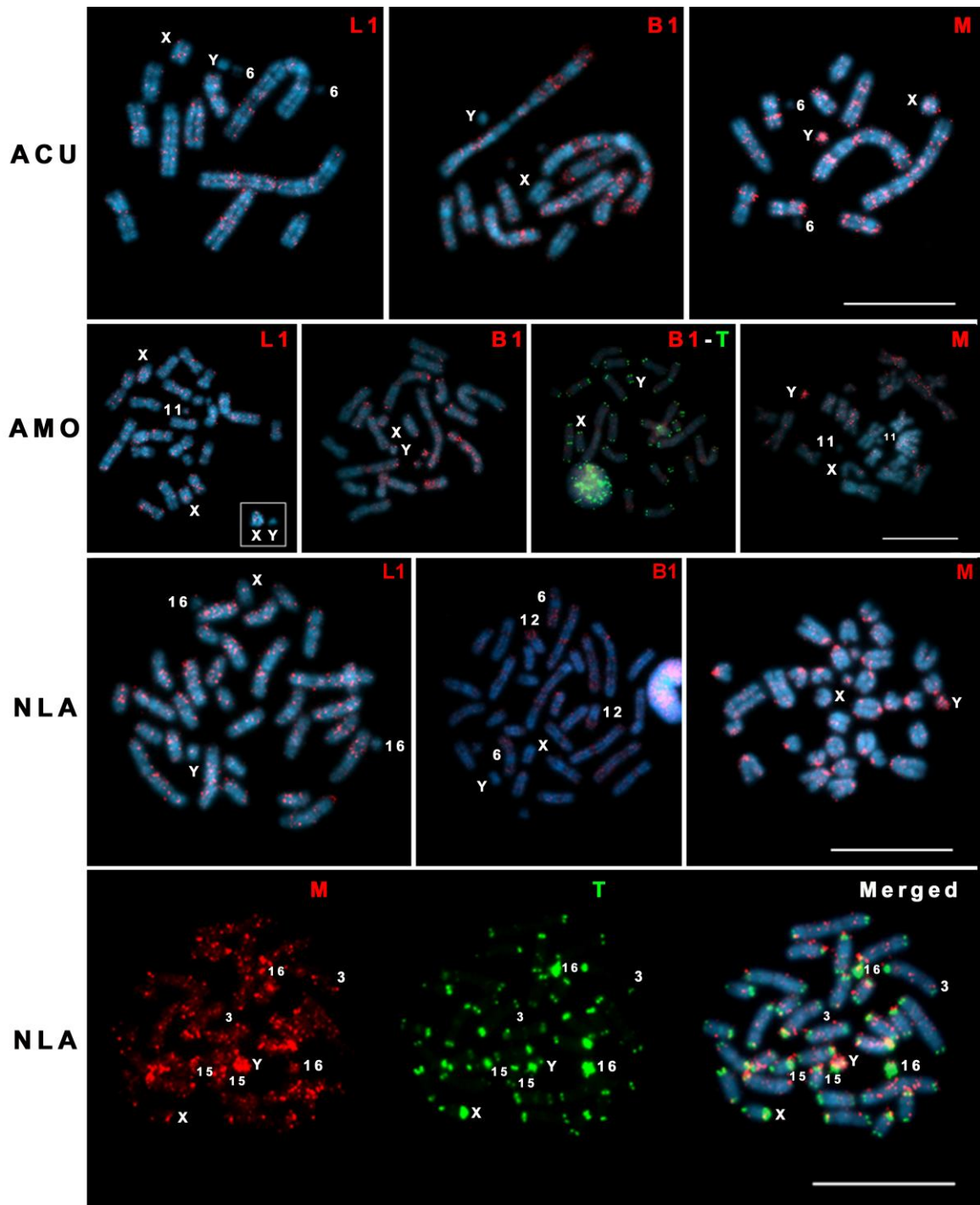


Fig. 4. FISH with digoxigenin-labeled transposable elements and biotin-labeled telomeric sequences in cells of Akodontini. ACU - *Akodon cursor*; AMO - *A. montensis* and NLA - *Necromys lasiurus*; L1- LINE-1; B1- B1-SINE; M – mysTR, T – telomere sequence. The cells of AMO depicted are of a female and the sex chromosomes of a male are shown in the inset. Bar = 10  $\mu$ m.

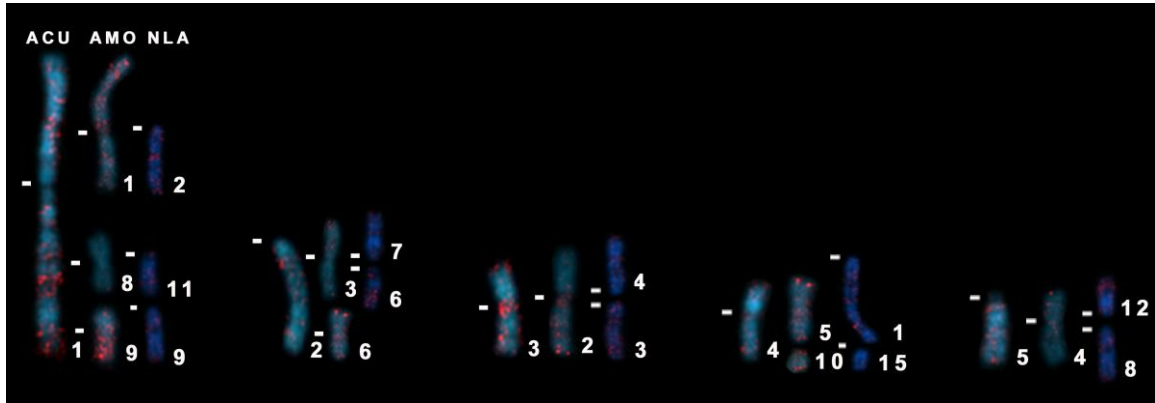
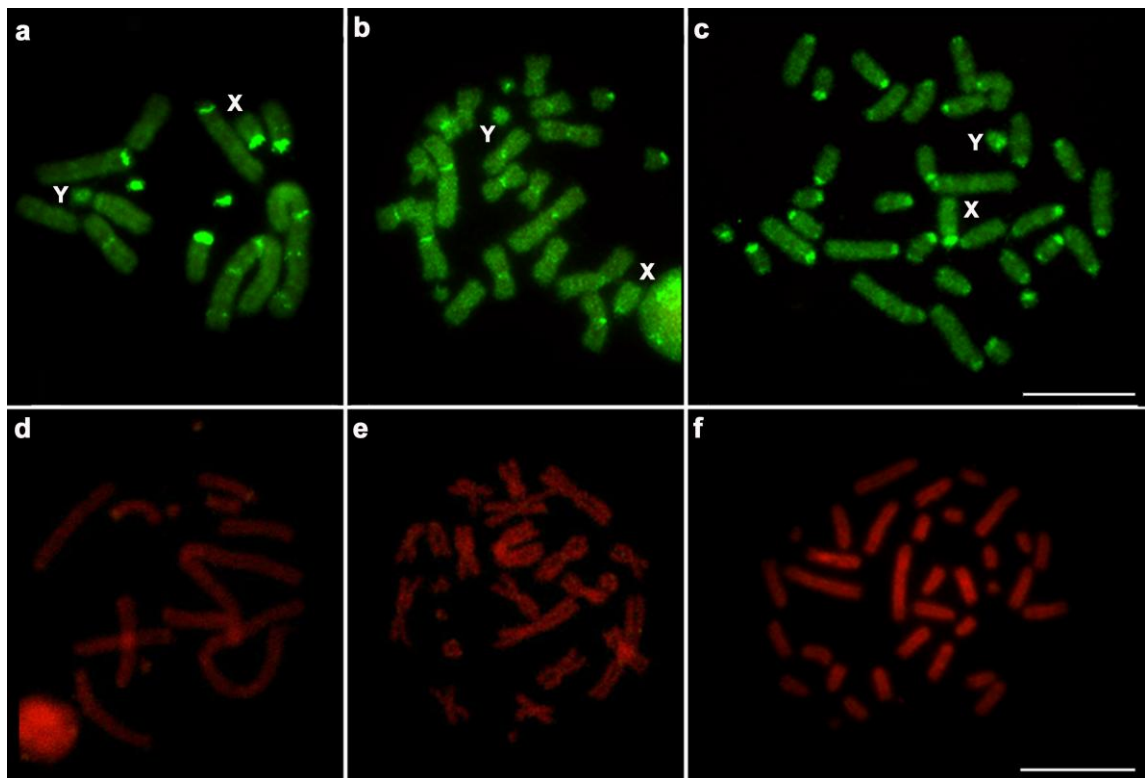


Fig. 5. Correspondence between the SINE-B1 hybridized chromosomes of *Akodon cursor* (ACU), on the left, *A. montensis* (AMO), in the middle, and *Necromys lasiurus* (NLA), on the right. Chromosomes correspondences were based on Fig. 1a. (-) centromere position.

## Supplementary Figure



Supplementary Fig. 1. Control GISH experiments of: (a) *Akodon cursor* ( $2n=14$ , FN=19), (b) *A. montensis* ( $2n=24$ , FN=42), and (c) *Necromys lasiurus* ( $2n=34$ , FN=34). Control suppression experiments of: (d) *A. cursor*, (e) *A. montensis*, and (f) *N. lasiurus*. Chromosomes were counterstained with propidium iodide. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .



## 5. CONCLUSÕES

- Após bandeamento GTG foi possível confirmar a conservação entre os cariótipos de *Akodon cursor*, *A. montensis* e *Necromys lasiurus*. Rearranjos Robertsonianos e inversões pericêntricas são os principais mecanismos envolvidos na evolução cariotípica desses roedores. Além disso, pela primeira vez foi observada a ocorrência de reposicionamento centromérico quando comparados os padrões de bandas GTG entre os cromossomos de *A. montensis* e *N. lasiurus*.
- As três espécies de Akodontini analisadas apresentavam pequena quantidade de heterocromatina constitutiva na maioria de seus cromossomos.
- Hibridações *in situ* interespecíficas usando DNAs genômicos totais de cada espécie como sonda mostraram uma grande conservação entre os genomas analisados. Os experimentos de GISH entre *A. cursor* e *A. montensis* resultaram em hibridação de toda região eucromática e parte da heterocromatina. Hibridações entre *N. lasiurus* e as duas espécies de *Akodon* resultaram em marcação de toda a porção eucromática.
- Experimentos de FISH com uma sonda telomérica evidenciaram sinais nas porções terminais de todos os cromossomos, como esperado. Além disso, havia sinais intersticiais em *A. montensis*, possíveis resquícios de fusões cromossômicas, e sequências teloméricas associadas às porções hetero- e eucromáticas de *Necromys lasiurus*.
- Os resultados de experimentos de hibridação *in situ* fluorescente utilizando como sondas os elementos transponíveis LINE-1, SINE-B1 e o retrovírus endógeno mysTR sugerem uma possível relação desses elementos à alta variabilidade cariotípica dos Akodontini estudados.
- Este é o primeiro estudo da localização por hibridação *in situ* fluorescente dos elementos LINE-1, SINE-B1 e mysTR no genoma de Sigmodontinae brasileiros.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta MJ, Romero-Fernández I, Sánchez A, Marchal JA (2011) Comparative analysis by chromosome painting of the sex chromosomes in arvicolid rodents. *Cytogenet Genome Res* 132:47-54. doi: 10.1159/000318012

Alvarado-Serrano DF, D'Elía G (2013) A new genus for the Andean mice *Akodon latebricola* and *A. bogotensis* (Rodentia: Sigmodontinae). *J Mammal* 94:995-1015. doi: 10.1644/12-MAMM-A-276.1

Baker RJ, Wichman HA (1990) Retrotransposon *mys* is concentrated on the sex chromosomes: implications for copy number containment. *Evol* 44:2083-2088

Baker RJ, Kass DH (1994) Comparison of chromosomal distribution of a retroposon (LINE) and a retrovirus-like element *mys* in *Peromyscus maniculatus* and *P. leucopus*. *Chromosome Res* 2:185-189. doi: 10.1007/BF01553318

Barrantes GE, Ortells MO, Reig OA (1993) New studies on allozyme genetic distance and variability in akodontine rodents (Cricetidae) and their systematic implications. *Biol J Linn Soc* 48:283-298. doi: 10.1016/0024-4066(93)90001-5

Barros MC, Sampaio I, Schneider H, Langguth A (2009) Molecular phylogenies, chromosomes and dispersion in Brazilian akodontines (Rodentia, Sigmodontinae). *Iheringia, Ser Zool* 99:373-380. doi: 10.1590/S0073-47212009000400006

Bianchi NO, Bianchi MS, Bailliet G, Chapelle A (1993) Characterization and sequencing of the sex determining region Y gene (*Sry*) in *Akodon* (Cricetidae) species with sex reversed females. *Chromosoma* 102:389-395. doi: 10.1007/BF00360403

Bianchi NO (2002) *Akodon* sex reversed females: the never ending story. *Cytogenet Genome Res* 96:60-65. doi: 10.1159/000063029

Böhne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, Schultheis C, Volff J (2008) Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Res* 16:203-215. doi: 10.1007/s10577-007-1202-6

Bonvicino CR, Oliveira JA, D'Andrea PS (2008) Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, Rio de Janeiro, 120p

Boyle AL, Ballard SG, Ward DC (1990) Differential distribution of long and short interspersed element sequences in the mouse genome: chromosome karyotyping by fluorescence *in situ* hybridization. PNAS 87:7757-7761

Brammer SP, Vasconcelos S, Poersch LB, Oliveira AR, Brasileiro-Vidal AC (2013) Genomic *in situ* hybridization in Triticeae: a methodological approach. In Andersen SB (ed). Plant breeding from laboratories to fields. InTech 3-22. doi: 10.5772/52928

Braun JK, Coyner BS, Mares MA, Van Den Bussche RA (2008) Phylogenetic relationships of South American grass mice of the *Akodon varius* group (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) in South America. J Mammal 89:768-777. doi: 10.1644/07-MAMM-A-269R1.1

Braun JK, Mares MA, Coyner BS, Van Den Bussche RA (2010) New species of *Akodon* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) from Central Argentina. J Mammal 91:387-400. doi: 10.1644/09-MAMM-A-048.1

Bretas FAV (2007) Guia terapêutico veterinário. 2nd ed. Cem, 450p

Britten RJ, Kohne DE (1968) Repeated sequences in DNA. Science 161:529-540. doi: 10.1126/science.161.3841.529

Cáceres M, Ranz JM, Barbadilla A, Long M, Ruiz A (1999) Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. Science 285: 415-418. doi: 10.1126/science.285.5426.415

Cantrell MA, Ederer MM, Erickson IK, Swier VJ, Baker RJ, Wichman HA (2005) MysTR: an endogenous retrovirus family in mammals that is undergoing recent amplifications to unprecedented copy numbers. J Virol 79:14698-14707. doi: 10.1128/JVI.79.23.14698-14707.2005

Cantrell MA, Carstens BC, Wichman HA (2009) X chromosome inactivation and *Xist* evolution in a rodent lacking LINE-1 activity. PLoS ONE 4:e6252. doi: 10.1371/journal.pone.0006252

Carleton MD, Musser GG (2005) Order Rodentia. In: Wilson DE, Reeder DM (eds). Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference. 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp 775-1601

Casavant NC, Scott L, Cantrell MA, Wiggins LE, Baker RJ, Wichman HA (2000) The end of the LINE?: Lack of recent L1 activity in a group of South American rodents. Genetics 154:1809-1817

Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. Nature 371:215-220. doi: 10.1038/371215a0

Contreras LC, Torres-Mura JC, Spotorno AE (1990) The largest known chromosome number for a mammal, in South American desert rodent. Experientia 46:506-508. doi: 10.1007/BF01954248

Coyner BS, Braun JK, Mares MA, Van Den Bussche, RA (2013) Taxonomic validity of species groups in the genus *Akodon* (Rodentia, Cricetidae). Zool Scr 42:335-350. doi: 10.1111/zsc.12014

D'Elía G (2003) Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. Cladistics 19:307-323. doi: 10.1016/S0748-3007(03)00071-9

D'Elía G, González EM, Pardiñas UFJ (2003) Phylogenetic analysis of sigmodontine rodents (Muroidea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. Mamm Biol 68:351-364. doi: 10.1078/1616-5047-00104

D'Elía G, Luna L, González EM, Patterson BD (2006) On the Sigmodontinae radiation (Rodentia: Cricetidae): an appraisal of the phylogenetic position of *Rhagomys*. Mol Phylogenet Evol 38:558-564. doi: 10.1016/j.ympev.2005.08.011

D'Elía G, Pardiñas UFJ, Teta P, Patton JL (2007) Definition and diagnosis of a new tribe of sigmodontine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae), and a revised classification of the subfamily. *Gayana* 71:187-194

D'Elía G, Pardiñas UFJ, Jayat P, Salazar-Bravo J (2008) Systematics of *Necromys* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae): species limits and groups, with comments on historical biogeography. *J Mammal* 89:778-790. doi: 10.1644/07-MAMM-A-246R1.1

Dobigny G, Ozouf-Costaz C, Waters PD, Bonillo C, Coutanceau J, Volobouev V (2004) LINE-1 amplification accompanies explosive genome repatterning in rodents. *Chromosome Res* 12:787-793. doi: 10.1007/s10577-005-5265-y

Doolittle WF, Sapienza C (1980) Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284:601-603. doi: 10.1038/284601a0

Erickson IK, Cantrell MA, Scott L, 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

Erlandsson R, Wilson JF, Pääbo S (2000) Sex chromosomal transposable element accumulation and male-driven substitutional evolution in humans. *Mol Biol Evol* 17:804-812

Evgen'ev MB, Zelentsova H, Poluectova H, Lyozin GT, Veleikodvorskaja, V (2000) Mobile elements and chromosomal evolution in the *virilis* group of *Drosophila*. *PNAS* 97:11337-11342. doi: 10.1073ypnas.210386297

Fagundes V, Vianna-Morgante AM, Yonenaga-Yassuda Y (1997a) Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent *Akodon cursor* (2n=14, 15 and 16). *Chromosome Res* 5:228-232. doi: 10.1023/A:1018463401887

Fagundes V, Scalzi-Martin JM, Sims K, Hozier J, Yonenaga-Yassuda Y (1997b) Zoo-FISH of a microdissection DNA library and G-banding patterns reveal the

homeology between the Brazilian rodents *Akodon cursor* and *Akodon montensis*. *Cytogenet Cell Genet* 78:224-228. doi: 10.1159/000134662

Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y (1998) Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. *Chromosome Res* 6:643-648. doi: 10.1023/A:1009213712370

Fagundes V, Christoff AU, Yonenaga-Yassuda Y (1998) Extraordinary chromosomal polymorphism with 28 different karyotypes in the neotropical species *Akodon cursor* (Muridae, Sigmodontinae), one of the smallest diploid number in rodents ( $2n=16, 15$  and  $14$ ). *Hereditas* 129:263-274. doi: 10.1111/j.1601-5223.1998.00263.x

Fagundes V, Christoff AU, Scalzi-Martin J, Hozier J, Moreira-Filho CA, Yonenaga-Yassuda Y (2000) X;Y translocation revealed by chromosome microdissection and FISH in fertile XY females in the Brazilian rodent *Akodon montensis*. *Cytogenet Cell Genet* 88:124-129. doi: 10.1159/000015504

Fagundes V, Nogueira CDA (2007) The use of PCR-RFLP as an identification tool for three closely related species of rodents of the genus *Akodon* (Sigmodontinae, Akodontini). *Genet Mol Biol* 30:698-701. doi: 10.1590/S1415-47572007000400031

Feschotte C, Gilbert C (2012) Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. *Nature Rev Genet* 13:283-296. doi: 10.1038/nrg3199

Ford CE, Hamerton JL (1956) A colchicines hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol* 31:247-251. doi: 10.3109/10520295609113814

Furano AV (2000) The biological properties and evolutionary dynamics of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Progress in Nucleic Acid Res Mol Biol* 64:255-294. doi: 10.1016/S0079-6603(00)64007-2

Geise L, Canavez FC, Seuanez HN (1998) Comparative karyology in *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) from Southeastern Brazil. *J Hered* 89:158-163. doi: 10.1093/jhered/89.2.158

Geise L, Smith MF, Patton JL (2001) Diversification in the genus *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) in Southeastern South America: mitochondrial DNA sequences analysis. *J Mammal* 82: 92-101. doi: 10.1644/1545-1542(2001)082<0092:DITGAR>2.0.CO;2

Geise L, Weksler M, Bonvicino CR (2004) Presence or absence of gall bladder in some Akodontini rodents (Muridae, Sigmodontinae). *Mamm Biol* 69:210-214. doi: 10.1078/1616-5047-00136

Geise L (2012) *Akodon cursor* (Rodentia:Cricetidae). *Mammal Species* 44:33-43. doi: 10.1644/893.1

Gifford R, Tristem M (2003) The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes* 26:291-315. doi: 10.1023/A:1024455415443

Grahn RA, Rinehart TA, Cantrell MA, Wichman HA (2005) Extinction of LINE-1 activity coincident with a major mammalian radiation in rodents. *Cytogenet Genome Res* 110:407-415. doi: 10.1159/000084973

Han K, Lee J, Meyer TJ, Remedios P, Goodwin L, Batzer MA (2008) L1 recombination associated deletions generate human genomic variation. *PNAS* 105:19366-19371. doi: 10.1073/pnas.0807866105

Havecker ER, Gao X, Voytas DF (2004) The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biol* 5:225. doi: 10.1186/gb-2004-5-6-225

Heiskanen M, Peltonen L, Palotte A (1996) Visual mapping by high resolution FISH. *Trends Genet* 12:379-382. doi: 10.1016/0168-9525(96)30083-8

Ivancevic AM, Walsh AM, Kortschak RD, Adelson DL (2013) Jumping the fine LINE between species: horizontal transfer of transposable elements in animals catalyses genome evolution. *Bioessays* 35:1071-1082. doi: 10.1002/bies.201300072

- Jayat JP, Ortiz PE, Salazar-Bravo J, Pardiñas UFL, D'Elía G (2010) The *Akodon boliviensis* species group (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) in Argentina: species limits and distribution, with the description of a new entity. *Zootaxa* 2409:1-61
- Kasahara S, Yonenaga-Yassuda Y (1982) Chromosomal variability in *Akodon* sp. (Rodentia, Cricetidae). *Cytologia* 47:317-324. doi: 10.1508/cytologia.47.317
- Kasahara S, Yonenaga-Yassuda Y (1983) Sex-chromosome variability in *Zygodontomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae). *Cytologia* 48:569-576. doi: 10.1508/cytologia.48.569
- Kasahara S, Yonenaga-Yassuda Y (1984) A progress report of cytogenetic data on Brazilian rodents. *Rev Brasil Genet* 7:509-533
- Kay EH, Hoekstra HE (2008) Rodents. *Curr Biol* 18:406-410. doi: 10.1016/j.cub.2008.03.019
- Kramerov DA, Vassetzky NS (2005) Short retroposons in eukaryotic genomes. *Int Rev Cytol* 247:165-221. doi: 10.1016/S0074-7696(05)47004-7
- Lander ES e col. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921. doi: 10.1038/35057062
- Lin KW, Yan J (2008) Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutat Res* 658:95-110. doi: 10.1016/j.mrrev.2007.08.006
- Lyon MF (1998) X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet* 80:133-137. doi: 10.1159/000014969
- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyzis RK (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99:3-10. doi: 10.1007/BF01737283



- Morrish TA, Gilbert N, Myers JS, Vincent BJ, Stamato TD, Taccioli GE, Batzer MA, Moran JV (2002) DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nature Genet* 31:159-165. doi: 10.1038/ng898
- Myers P (2000) "Rodentia" (On-line), Animal Diversity Web. Disponível em <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rodentia/>. Acesso em 10 nov, 2013
- Nogueira CDA, Fagundes V (2008) *Akodon cursor* Winge, 1887 (Rodentia: Sigmodontinae): one or two species? New evidences based on molecular data. *Zootaxa* 1768:41-51
- Nowak RM (1999) Walker's mammals of the world. 6th ed. John Hopkins University, Baltimore, London, 328p
- Orgel LE, Crick FHC (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284:604-607. doi: 10.1038/284604a0
- Parisod C, Alix K, Just J, Petit M, Sarilar V, Mhiri C, Ainouche M, Chalhoub B, Grandbastien M (2009) Impact of transposable elements on the organization and function of allopolyploid genomes. *New Phytologist* 1-9. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03096.x
- Patton JL, Smith MF (1992) mtDNA phylogeny of Andean mice: a test of diversification across ecological gradients. *Evolution* 46:174-183
- Percequillo AR, Weksler M, Costa LP (2011) A new genus and species of rodent from the Brazilian Atlantic Forest (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini), with comments on oryzomyine biogeography. *Zool J Linnean Soc* 161:357-390. doi: 10.1111/j.1096-3642.2010.00643.x
- Pine RH, Timm RM, Weksler, M (2012) A newly recognized clade of trans-Andean Oryzomyini (Rodentia: Cricetidae), with description of a new genus. *J Mammal* 93:851-870. doi: 10.1644/11-MAMM-A-012.1
- Reig OA (1984) Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae). *Rev Brasil Genet* 7:333-365

- Richard G, Kerrest A, Dujon B (2008) Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:686-727. doi: 10.1128/MMBR.00011-08
- Rinehart TA, Grahn RA, Wichman HA (2005) SINE extinction preceded LINE extinction in sigmodontine rodents: implications for retrotranspositional dynamics and mechanisms. *Cytogenet Genome Res* 110:416-425. doi: 10.1159/000084974
- Román AC, González-Rico FJ, Fernández-Salguero PM (2011) B1-SINE retrotransposons – establishing genomic insulatory networks. *Mob Genet Elements* 1:66-70. doi: 10.4161/mge.1.1.15455
- Romanenko SA, Perelman PL, Trifonov VA, Graphodatsky AS (2012) Chromosomal evolution in Rodentia. *Heredity* 108:4-16. doi: 10.1038/hdy.2011.110
- Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santogostino M, Giulotto E (2008) Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res* 122:219-228. doi: 10.1159/000167807
- Sbalqueiro IJ, Nascimento AP (1996) Occurrence of *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae) with 14, 15 and 16 chromosome cytotypes in the same geographic area in Southern Brazil. *Braz J Genet* 19:565-569. doi: 10.1590/S0100-84551996000400005
- Schmid CW, Rubin CM (2005) Short interspersed elements (SINEs). *ELS* 1-4. doi: 10.1038/npg.els.0005325
- Seabright M (1971) A rapid technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-972. doi: 10.1016/S0140-6736(71)90287-X
- Silva MJJ, 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, Patton JL, Yonenaga-Yassuda Y (2006) Phylogenetic relationships and Karyotype evolution in the sigmodontine rodent *Akodon* (2n=10 and 2n=16) from Brazil. *Genet Mol Biol* 29:469-474. doi: 10.1590/S1415-47572006000300012

Smit AFA, Tóth G, Riggs AD, Jurka J (1995) Ancestral, mammalian-wide subfamilies of LINE-1 repetitive sequences. *J Mol Biol* 246:401-417. doi: 10.1006/jmbi.1994.0095

Smith MF, Patton JL (1991) Variation in mitochondrial cytochrome *b* sequence in natural populations of South American Akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Mol Biol Evol* 8:85-103

Smith MF, Patton JL (1993) The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biol J Linn Soc* 50:149-177. doi: 10.1111/j.1095-8312.1993.tb00924.x

Smith MF, Patton JL (1999) Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome *b*. *J Mamm Evol* 6:89-128. doi: 10.1023/A:1020668004578

Smith MF, Patton JL (2007) Molecular phylogenetics and diversification of South American grass mice, genus *Akodon*. In: Kelt DA, Lessa EP, Salazar-Bravo J, Patton JL (eds). *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson*. Univ Calif Publ Zool, California, pp 827-858

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

Svartman M, Almeida EJC (1993) Robertsonian fusion and X chromosome polymorphism in *Zygodontomys* (= *Bolomys*) *lasiurus* (Cricetidae, Rodentia) from Central Brazil. *Rev Brasil Genet* 16:225-235

Svartman M, Almeida EJC (1994) The karyotype of *Akodon lindberghi* Hershkovitz, 1990 (Cricetidae, Rodentia). *Rev Brasil Genet* 17:225-227

Svartman M, Vianna-Morgante AM (1999) Comparative genome analysis in American marsupials: chromosome banding and *in-situ* hybridization. *Chromosome Res* 7:267-275. doi: 10.1023/A:1009274813921

Ventura K, Silva MJJ, Fagundes V, Christoff AU, Yonenaga-Yassuda Y (2006) Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG)<sub>n</sub> arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). *Cytogenet Genome Res* 115:169-175. doi: 10.1159/000095238

Ventura K, O'Brien PCM, Yonenaga-Yassuda Y, Ferguson-Smith MA (2009) Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four *Akodon* species (Rodentia, Cricetidae) resolved by reciprocal chromosome painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents. *Chromosome Res* 17:1063-1078. doi: 10.1007/s10577-009-9083-5

Ventura K, Yonenaga-Yassuda Y, Ferguson-Smith MA (2012) Variable patterns of Y chromosome homology in Akodontini rodents (Sigmodontinae): a phylogenetic signal revealed by chromosome painting. *Chromosome Res* 20:427-433. doi: 10.1007/s10577-012-9286-z

Vieira A, Ortiz MI, Pinna-Senn E, Dalmaso G, Bella JL, Lisanti JA (2004) Chromosomal localization of telomeric sequences in three species of *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae). *Cytogenet Genome Res* 107:99-102. doi: 10.1159/000079577

Waters PD, Dobigny G, Pardini AT, Robinson TJ (2004) LINE-1 distribution in Afrotheria and Xenarthra: implications for understanding the evolution of LINE-1 in eutherian genomes. *Chromosoma* 113:137-144. doi: 10.1007/s00412-004-0301-9

Waters PD, Wallis MC, Graves JAM (2007) Mammalian sex – origin and evolution of the Y chromosome and SRY. *Semin Cell Dev Biol* 18:389-400. doi: 10.1016/j.semcdb.2007.02.007

Waterston RH e col. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562. doi:10.1038/nature01262

Weksler M (2003) Phylogeny of Neotropical oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae) based on the nuclear IRBP exon. *Mol Phylogenet Evol* 29:331-349. doi: 10.1016/S1055-7903(03)00132-5

Wessler SR (2006) Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes. *PNAS* 103:17600-17601. doi: 10.1073/pnas.0607612103

Wichman HA, Potter SS, Pine DS (1985) *Mys*, a family of mammalian transposable elements isolated by phylogenetic screening. *Nature* 317:77-81. doi: 10.1038/317077a0

Wichman HA, Van Den Bussche RA, Hamilton MJ, Baker RJ (1992) Transposable elements and the evolution of genome organization in mammals. *Genetica* 86:287-293. doi: 10.1007/BF00133727

Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Schulman AH (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Rev Genet* 8:973-982. doi:10.1038/nrg2165

Wilson MA, Makova KD (2009) Genomic analyses of sex chromosome evolution. *Annu Rev Genomic Hum Genet* 10:333-354. doi: 10.1146/annurev-genom-082908-150105

Yazbeck GM, Brandão RL, Cunha HM, Paglia AP (2011) Detection of two morphologically cryptic species from the *cursor* complex (*Akodon* spp; Rodentia, Cricetidae) through the use of RAPD markers. *Genet Mol Res* 10:2881-2892. doi: 10.4238/2001.November.22.2

Yonenaga Y (1975) Karyotypes and chromosome polymorphism in Brazilian rodents. *Caryologia* 28:269-286. doi: 10.1080/00087114.1975.10796617

Yonenaga Y, Kasahara S, Almeida EJC, Peracchi AL (1975) Chromosomal banding patterns in *Akodon arviculoides* (2n=14), *Akodon* sp (2n=24 and 25), and two male hybrids with 19 chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 15:388-399. doi: 10.1159/000130538

Yonenaga Y, Frota-Pessoa O, Kasahara S, Almeida EJC (1976) Cytogenetics studies on Brazilian rodents. *Ciênc e Cult* 28:202-211

Yonenaga-Yassuda Y (1979) New karyotypes and somatic and germ-cell banding in *Akodon arviculoides* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenet Cell Genet* 23:241-249. doi: 10.1159/000131334

Yonenaga-Yassuda Y, Assis MFL, Kasahara S, L'Abbate ML, Souza MJ (1983) Nucleolar organizer regions in *Akodon arviculoides* (Cricetidae, Rodentia): evidence for the activity of rDNA genes in both X chromosomes of females. *Cytogenet Cell Genet* 35:143-147. doi: 10.1159/000131857

Yonenaga-Yassuda Y, Assis MFL, Kasahara S (1992) Variability of the nucleolus organizer regions and the presence of the rDNA genes in the supernumerary chromosome of *Akodon aff. arviculoides* (Cricetidae, Rodentia). *Caryologia* 45:163-174. doi: 10.1080/00087114.1992.10797220

Zietkiewicz E, Labuda D (1996) Mosaic evolution of rodent B1 elements. *J Mol Evol* 42:66-72. doi: 10.1007/BF00163213