

**Tese de Doutorado**

---

**Evolução Cromossômica  
em *Crocodylia*  
(Animalia, Reptilia)**

---



**Vanessa Cristina Sales-Oliveira**  
*São Carlos - 2024*

2 **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E**  
3 **BIOLOGIA MOLECULAR**

4  
5  
6  
7  
8  
9  
10 **Evolução Cromossômica em Crocodylia (Animalia, Reptilia)**  
11

12  
13  
14  
15 Vanessa Cristina Sales Oliveira  
16  
17  
18  
19  
20

21 **SÃO CARLOS - SP**

22 **2024**

23 **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
24 **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E**  
25 **BIOLOGIA MOLECULAR**

26  
27  
28 Vanessa Cristina Sales Oliveira

29  
30  
31  
32  
33  
34 Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
35 em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do  
36 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da  
37 Universidade Federal de São Carlos – UFSCar,  
38 como parte dos requisitos necessários para  
39 obtenção do título de Doutora em Ciências.

40  
41 Área de Concentração: Genética Evolutiva e  
42 Biologia Molecular.

43 Subárea: Genética Evolutiva.

44 **Orientador:** Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi

45  
46  
47  
48 **SÃO CARLOS – SP**

49 **2024**

50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77

*Dedico esta tese a todos aqueles que  
contribuíram com minha jornada  
acadêmica, dos humanos ao crocodilianos.*

78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112

*“Estude bastante o que mais te interessa da forma mais indisciplinada, irreverente e original possível”*  
Richard Feynman

113 **A realização deste estudo foi possível devido:**

114

115 À Universidade Federal de São Carlos, ao Programa de Pós-Graduação em Genética  
116 Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEV/UFSCar), aos laboratórios de Citogenética de Peixes  
117 (LCP/UFSCar), de Genética Animal (LGA/INPA), de Citogenômica Animal (LACA/UFAM), de  
118 Citogenética Molecular (University of Jena), de Epigenômica e de Genética da Vida Selvagem  
119 (University of Canberra);

120

121 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código  
122 de Financiamento 001, pela concessão de bolsa de estudos no país;

123 À Fundação Alexander von Humboldt – Alemanha (Alexander von Humboldt-Stiftung), pela  
124 concessão de bolsa de estudos no exterior (Friedrich-Schiller-Universität Jena/DE).

125 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) –  
126 Número do Processo 200401/2022-0, pela concessão de bolsa de estudos no exterior (University of  
127 Canberra/AU).

## 128 AGRADECIMENTOS

129 Gostaria de começar agradecendo a todos que compartilharam desta parte da minha história, entre  
130 momentos de dificuldades e aprendizados, seja me apoiando e me suportando ou duvidando de mim,  
131 sem vocês provavelmente eu não conseguiria ter impulso para chegar até aqui.

132 Entretanto, gostaria de fazer um agradecimento especial a minha família que me apoia desde  
133 o início da minha jornada acadêmica, especialmente nos momentos que tive que estar longe,  
134 principalmente em uma pandemia; ao meu amigo Patrik meu agradecimento mais sincero, mesmo  
135 sabendo que palavras não são suficientes para expressar tudo, sei que sem ele esse doutorado não  
136 teria ocorrido; as meninas que me deram morada/moraram comigo e viraram amigas, Juliane, Luana,  
137 Yuyee, Megan, Nasya-Ann e Meliora, às meninas do DGE, ao pessoal do CCEG e da UniJena pelos  
138 cafés e cervejas compartilhados, vocês tiveram sua participação neste estudo.

139 Agradeço a Terumi, Gustavinho, Caio, Pri, Carol, Nayore, Camila, Piau, Danusa, Caren, Ana,  
140 Lu, Leila, Joyce, Gabs, Sérgio, Erika, Alany, Arlindo, Alex, Reney, Foyez, Shayer, Llara, Dumí,  
141 Niklas, Luisa, Stefh, Tito, Felipe, Marina, Jeff, Camila, Claudia, dentre tantos outro e a meu  
142 orientador de doutorado Marcelo de Bello Cioffi pelas oportunidades que me ofereceu.

143 Não poderia deixar de agradecer ao apoio e colaboração da Polícia Ambiental de São Carlos,  
144 aos criadores particulares que colaboraram com amostragem de animais: Breno Almeida e Milena do  
145 Centro Amazônico de Herpetologia no Pará, a Sociedade Alemã de Herpetologia e associação de  
146 Ciência do Terrário – Alemanha (DGHT AG Krokodile), a Hugmar Pains da Silva, Jason Dobry,  
147 Doaa Doudin, ao *Astro in memorian*, a todos os pescadores e mateiros, ao INPA que foi a minha 1ª  
148 casa trabalhando com os jacarés, por todo o apoio fornecido mesmo sendo egressa pela Profª Eliana  
149 Feldberg e a UFSCar que ajudou a expandir as asas do meu projeto, amadurecê-lo e trazer novidades.

150 Um agradecimento especial a todos os professores que me orientaram e contribuíram com a  
151 minha formação acadêmica e profissional, com destaque para os meus mentores Ronis, Carlos e  
152 Tariq, que me permitiram criar teorias, experimentá-las, participar de trabalhos, liberdade para  
153 escolher os caminhos a serem tomados e para crescer como cientista, (re)descobrimo a paixão pela  
154 ciência e pela pesquisa, o meu maior apreço e gratidão, e fica aqui o meu carinho enorme pelo querido  
155 Prof. Orlando Moreira-Filho, que esteve sempre presente para um cafezinho e dois dedos de prosa,  
156 científicas e sobre a vida.

157           Agradeço à minha psicóloga, Jaddh Cardoso, que sem todo o suporte e acompanhamento eu  
158 não teria conseguido cumprir 1/3 das minhas demandas, da mesma forma agradeço a mim que mesmo  
159 nos momentos mais difíceis não desisti e continuei até o fim, por mais difícil que isto parecesse.

## SUMÁRIO

160		
161	1. INTRODUÇÃO.....	9
162	1.1. Diversidade de Répteis .....	9
163	1.1.1. Diversidade de Crocodilianos.....	11
164	2. EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM RÉPTEIS .....	14
165	2.1. Estudos cromossômicos na ordem Crocodylia .....	15
166	3. CITOGENÉTICA MOLECULAR EM ESTUDOS EVOLUTIVOS .....	18
167	4. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	19
168	5. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
169	5.1. Material.....	20
170	5.2. Métodos .....	21
171	5.2.1. Obtenção de Cromossomos Mitóticos.....	21
172	5.2.2. Detecção da Heterocromatina C-positiva .....	21
173	5.2.3. Detecção de Regiões Ricas em Bases Nitrogenadas GC.....	22
174	5.2.4. Extração de DNA.....	22
175	5.2.5. Hibridação <i>In Situ</i> Fluorescente (FISH) .....	22
176	5.2.5.1. Sondas.....	22
177	5.2.5.2. Marcação das Sondas.....	23
178	5.2.5.3. Análises Microscópicas e Processamento de Imagem.....	23
179	5.2.5.4. Preparação das Lâminas, Hibridização e Detecção do Sinal .....	23
180	5.2.6. Hibridização Genômica Comparativa (CGH) e Pintura Cromossômica Completa (WCP).....	24
181	5.2.7. Microdissecção Cromossômica .....	24
182	5.2.7.1. Seleção dos Cromossomos .....	24
183	5.2.7.2. Preparação do Material de Microdissecção .....	25
184	5.2.7.3. Processo de Microdissecção .....	25
185	5.2.7.4. Síntese de sondas por DOP-PCR.....	25
186	5.2.8. Reconstrução do estado ancestral .....	26
187	6. CAPÍTULOS.....	27
188	Capítulo 1 – Revisitando os cariótipos de Aligátors e Jacarés (Crocodylia, Alligatoridae) depois de	
189	meio século: Preenchendo uma lacuna na evolução dos Répteis. ....	27
190	Capítulo 2 – Pintura cromossômica e mapeamento de DNA repetitivo ilumina a evolução cariotípica	
191	em Crocodilos (Crocodylidae). ....	27

192	6.1. CAPÍTULO 1.....	28
193	6.2. CAPÍTULO 2.....	45
194	7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	66
195	8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
196		
197		

## LISTA DE FIGURAS

198

199

200 **Figura 1.** Sistemas de determinação sexual em répteis não-aviários. Os dados foram obtidos da  
201 revisão realizada por Deakin & Ezaz (2019) e a árvore foi gerada com o TimeTree (2022).  
202

203 **Figura 2.** Distribuição geográfica atual das espécies viventes da ordem Crocodylia. Dados de Uetz  
204 et al. (2023).  
205

206 **Figura 3.** Distribuição recente (a), pontos de amostragem (b) e relações filogenéticas (c) das espécies  
207 de Alligatoridae. Mapa do Brasil com destaque para os pontos de coleta (círculos coloridos) das  
208 espécies de Caimaninae analisadas no presente trabalho: 1. *Caiman crocodilus* (círculo em azul); 2.  
209 *Caiman latirostris* (círculo verde); 3. *Cayman yacare* (círculo vermelho); 4. *Melanosuchus niger*  
210 (círculo laranja); 5. *Paleosuchus palpebrosus* (círculo amarelo); 6. *Paleosuchus trigonatus* (círculo  
211 rosa). O mapa foi criado usando os softwares QGis 3.4.3 e Adobe Photoshop CC 2020. Árvore  
212 filogenética datada adaptada para a Ordem Crocodylia, com foco em Alligatoridae, baseado em dados  
213 gerados por Oaks (2011), para uma datação alternativa ver Pan (2021). C- Cretáceo, P – Paleogeno,  
214 N – Neogeno, Q – Quaternário e Ma – Milhões de anos atrás.  
215

216 **Figura 4.** Cariótipos de fêmeas de *Caiman crocodilus* (a-c), *C. latirostris* (d-f), *C. yacare* (g-i),  
217 *Melanosuchus niger* (j-l), *Paleosuchus palpebrosus* (m-o) e *P. trigonatus* (p-r) após coloração com  
218 Giemsa (a, d, g, j, m, p), bandeamento C (b, e, h, k, n, q) e FISH com sonda de DNAr 18S (em  
219 vermelho) (c, f, i, l, o, r). Barra = 20µm.

220 **Figura 5.** Cariótipos de fêmeas de *Alligator mississippiensis* (a-c) e *A. sinensis* (d-f) após coloração  
221 com Giemsa (a, d) bandeamento C (b, e) e FISH com sonda de DNAr 18S (em vermelho) (c, f). Barra  
222 = 20µm.

223 **Figura 6.** Cromossomos metafásicos de fêmeas de *Caiman crocodilus* (a), *C. latirostris* (b), *C.*  
224 *yacare* (c), *Melanosuchus niger* (d), *Paleosuchus palpebrosus* (e), *P. trigonatus* (f), *Alligator*  
225 *mississippiensis* (g) e *A. sinensis* (h) após bandeamento com CMA3/DAPI (regiões ricas em GC e  
226 AT pseudocoloridas em vermelho e verde, respectivamente). Barra = 20µm.

227 **Figura 7.** Cromossomos metafásicos de fêmeas de *Caiman crocodilus* (a), *C. latirostris* (b), *C. yacare*  
228 (c), *Melanosuchus niger* (d), *Paleosuchus palpebrosus* (e), *P. trigonatus* (f), *Alligator*  
229 *mississippiensis* (g) e *A. sinensis* (h) hibridizadas com sonda de microssatélite (CGG)<sub>10</sub> (vermelho).  
230 Cromossomos estão contracorados com DAPI (azul). Barra = 20µm.

231 **Figura 8.** Placas metafásicas de fêmeas de *C. latirostris* (a), *P. palpebrosus* (b), *A. mississippiensis*  
232 (c) e *A. sinensis* (d) com sonda telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> (vermelho). Barra = 5µm.

233 **Figura 9.** Experimentos de Zoo-FISH utilizando a sonda AMI-1 (verde) contra placas metafásicas de  
234 *Caiman crocodilus* (a), *C. latirostris* (b), *C. yacare* (c), *Melanosuchus niger* (d), *Paleosuchus*  
235 *palpebrosus* (e), *P. trigonatus* (f), *Alligator mississippiensis* (g) e *A. sinensis* (h). Cromossomos estão  
236 contracolorados com DAPI (azul). Barra = 20µm.

237  
238 **Figura 10.** Cromossomos metafásicos de fêmeas de *C. yacare* após hibridizações interespecíficas de  
239 CGH. Primeira coluna: imagens em DAPI (azul). Segunda coluna: padrão de hibridização da sonda  
240 de *C. yacare* (vermelho). Terceira coluna: padrão de hibridização da sonda de cada espécie analisada  
241 (verde). Quarta coluna: imagens sobrepostas das duas sondas genômicas e da coloração em DAPI.  
242 As regiões genômicas em comum aparecem em amarelo. Clat = *C. latirostris*, Cyac = *C. yacare*,  
243 Mnig = *M. niger*, Ppal = *P. palpebrosus* e Asin = *A. sinensis*. Barra = 10µm.

244 **Figura 11.** Cariótipos de *Crocodylus mindorensis* (a, g), *Crocodylus moreletii* (b, h), *Crocodylus*  
245 *rhombifer* (c, i), *Crocodylus siamensis* (d, j), *Osteolaemus osborni* (e, k) e *Osteolaemus tetraspis* (f,  
246 l) analisados após coloração convencional com Giemsa (a-f) e Bandeamento C (g-l). Barra = 20µm.

247 **Figura 12.** Cariótipos de *Crocodylus mindorensis* (a, g), *Crocodylus moreletii* (b, h), *Crocodylus*  
248 *rhombifer* (c, i), *Crocodylus siamensis* (d, j), *Osteolaemus osborni* (e, k) e *Osteolaemus tetraspis* (f,  
249 l) analisados após bandeamento CMA3/DAPI (regiões GC e AT-ricas pseudocoloridas em vermelho  
250 e verde, respectivamente, a-f) e FISHs realizadas com sonda de DNAr 18S (verde) (g-l). Barra =  
251 20µm.

252 **Figura 13.** Placas metafásicas de fêmeas de *C. rhombifer* (a), *C. moreletii* (b), *O. osborni* (c) e *O.*  
253 *tetraspis* (d) com sonda telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> (vermelho). Barra = 5µm.

254 **Figura 14.** Cromossomos metafásicos de fêmeas de *C. siamensis* após hibridizações interespecíficas  
255 de CGH. Primeira coluna (a, e, i, m): imagens em DAPI (azul). Segunda coluna (b, f, j, n): padrão de  
256 hibridização da sonda de *C. siamensis* (verde). Terceira coluna (c, g, k, o): padrão de hibridização da  
257 sonda de cada espécie analisada (vermelho) de *C. mindorensis* (c), *Crocodylus moreletii* (g),  
258 *Crocodylus rhombifer* (k) e *Osteolaemus tetraspis* (o). Quarta coluna (d, h, l, p): imagens sobrepostas  
259 das duas sondas genômicas e da coloração em DAPI. As regiões genômicas em comum aparecem em  
260 amarelo. Sinais em verde mostram regiões específicas ou enriquecidas altamente abundantes no  
261 genoma de *C. siamensis*. Sinais em vermelho apontam para regiões com conteúdo repetitivo em  
262 comum, mas com grande abundância dessas repetições no genoma das espécies competitivas (i.e., *O.*  
263 *tetraspis*, p). Barra = 20µm.

264 **Figura 15.** Resultados de Zoo-FISH onde utilizamos a sonda CSI-1 em placas metafásicas de  
265 *Crocodylus mindorensis* (a), *Crocodylus moreletii* (b), *Crocodylus rhombifer* (c), *Crocodylus*  
266 *siamensis* (d), *Osteolaemus osborni* (e) e *O. tetraspis* (f) demonstrando homologia cromossômica.  
267 Note que o primeiro par metacêntrico, compartilhado por todas as espécies, parece estar dividido em  
268 quatro pares acrocêntricos em *O. tetraspis* (f). Barra = 20µm.

269 **Figura 16.** Resultados de Zoo-FISH após a utilização da sonda OST-1 nas placas metafásicas de  
270 *Crocodylus mindorensis* (a), *Crocodylus moreletii* (b), *Crocodylus rhombifer* (c), *Crocodylus*  
271 *siamensis* (d), *Osteolaemus osborni* (e) e *O. tetraspis* (f). Barra = 20µm.

272 **Figura 17.** Resultados de Zoo-FISH após a utilização da sonda OST-4 nas placas metafásicas de  
273 *Crocodylus mindorensis* (a), *Crocodylus moreletii* (b), *Crocodylus rhombifer* (c), *Crocodylus*  
274 *siamensis* (d), *Osteolaemus osborni* (e) e *O. tetraspis* (f). Barra = 20µm.

275 **Figura 18.** Resultados de Zoo-FISH após a utilização da sonda OST-19 nas placas metafásicas de  
276 *Crocodylus mindorensis* (a), *Crocodylus moreletii* (b), *Crocodylus rhombifer* (c), *Crocodylus*  
277 *siamensis* (d), *Osteolaemus osborni* (e) e *O. tetraspis* (f). Barra = 20µm.

278 **Figura 19.** A) Ideogramas representativos dos três cariótipos principais ( $2n = 30/32/38$ ) observados  
279 entre as espécies de crocodilos analisadas neste estudo demonstrando os resultados da Zoo-FISH após  
280 utilização das sondas CSI-1, OST-1, OST-4, OST-19 e a distribuição da sonda de DNAr 18S. As  
281 setas indicam os quatro principais rearranjos cromossômicos envolvidos na diferenciação do cariótipo  
282 de um provável  $2n = 32$  ancestral. B) Reconstrução do número diploide ancestral usando máxima  
283 parcimônia. As relações filogenéticas são adaptadas de Oaks (2011) e Colston et al. (2020), inserimos  
284 manualmente *C. halli*, e sua posição requer confirmação. Os dados cariotípicos foram obtidos de  
285 Cohen & Gans (1970), Kawagoshi et al. (2008), Hekkala et al. (2011), Srikuntah et al. (2015),  
286 Oliveira et al. (2021), Olmo & Signorino (2022) e no desenvolvimento deste estudo (em negrito).  
287 Círculos coloridos representam diferentes números diploides, enquanto os losangos pretos indicam  
288 espécies com  $2n$  ainda desconhecido. Dados ambíguos (em asterisco) são tratados na seção  
289 Discussão.

## LISTA DE TABELAS

290

291

292 **Tabela 1** - Dados citogenéticos disponíveis para a Ordem Crocodylia. Em asterisco (\*) estão  
293 inclusos os dados gerados durante o desenvolvimento da tese.

294 **Tabela 2** - Espécies da ordem Crocodylia utilizadas no presente projeto, com indicação dos  
295 respectivos locais de amostragem, número e sexo dos indivíduos.

296 **Tabela 3** - Espécies, tamanho da amostra (N), sexo, localidade e coordenadas geográficas dos  
297 pontos de coleta dos indivíduos analisados.

298 **Tabela 4** - Espécies, tamanho da amostra (N), sexo, localidade e distribuição dos indivíduos  
299 analisados. DRC, República Democrática do Congo.

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

- 300
- 301 M.a = Milhões de anos atras
- 302 GSD = determinação genética do sexo
- 303 ESD = determinação ambiental do sexo
- 304 TSD = determinação por temperatura do sexo
- 305 Pg = picograma
- 306 GC = guanina-citosina
- 307 XX = cromossomos sexuais femininos
- 308 XY = cromossomos sexuais masculinos
- 309 ZZ = cromossomos sexuais masculinos
- 310 ZW = cromossomos sexuais femininos
- 311 2n = número diploide
- 312 NF = número fundamental
- 313 BAC = cromossomo artificial bacteriano
- 314 cDNA = DNA complementar
- 315 CGH = hibridização genômica comparativa
- 316 WCP = pintura cromossômica total
- 317 ICMBio = Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
- 318 SISBIO = Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
- 319 SISGEN = Sistema Nacional de Gestão do Patrimnio Genético
- 320 CITES = Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e da Flora Silvestres
- 321 RPMI = meio de cultura celular
- 322 KCl = cloreto de potássio
- 323 HCl = cido clorídrico
- 324 Ba(OH)<sub>2</sub> = hidróxido de bário
- 325 2xSSC = solução salina de cloreto de sódio/citrato de sódio 2x
- 326 DAPI = marcador 6-diamidino-2-phenylindole
- 327 AT = adenina-timina
- 328 CMA<sub>3</sub> = cromomicina A<sub>3</sub>
- 329 DNAg = DNAs genômicos totais
- 330 FISH = hibridização fluorescente *In Situ*

- 331 DNAr = DNA ribossomal
- 332 PCR = reação em cadeia polimerase
- 333 RNAr = RNA ribossomal
- 334 RNase = enzima que degrada o RNA
- 335 TWEEN = detergente iônico
- 336  $C_{0t-1}$  = tipo de DNA competidor
- 337 AMI 1 = cromossomo 1 de *A. mississippiensis*
- 338 CSIA 1 = cromossomo 1 de *C. siamensis*
- 339 OST-1 = cromossomo 1 de *O. tetraspis*
- 340 OST-4 = cromossomo 4 de *O. tetraspis*
- 341 OST-19 = cromossomo 19 de *O. tetraspis*
- 342 DOP-PCR = reação em cadeia polimerase usando oligonucleotídeo degenerado
- 343 ZOO-FISH = pintura cromossômica entre espécies
- 344 IUCN = União Internacional para a Conservação da Natureza
- 345 N = tamanho da amostra
- 346 ITS = sítios intersticiais teloméricos
- 347 Mb = megabase
- 348 SSR = repetição de sequência simples
- 349 RON = região organizadora de nucléolo
- 350 CR = rearranjo cromossômico
- 351 DRC= República Democrática do Congo

## RESUMO

352

353 Crocodylia é uma ordem que sofreu pouquíssimas mudanças morfofisiológicas, biogeográficas e  
354 genéticas ao longo do tempo, apesar de terem se originado entre o fim do Triássico e o início do  
355 Jurássico, há aproximadamente 200 milhões de anos. Esta ordem encontra-se dividida em três  
356 famílias: Crocodylidae, Gavialidae e Alligatoridae, com representantes distribuídos em praticamente  
357 todos os continentes, com exceção da Europa e Antártida, sendo assim delimitados geograficamente  
358 pela temperatura. De acordo com estudos filogenéticos, os crocodilianos formam um grupo  
359 monofilético junto com dinossauros, pterossauros e aves, sugerindo, portanto, uma relação mais  
360 próxima com as aves do que com o restante dos Archosauria. Apesar desta proximidade, de ambos  
361 os táxons possuem certa variabilidade cariotípica e da importância de termos acesso a estes dados  
362 para fim de maior compreensão sobre a história evolutiva destes animais, estudos sobre caracterização  
363 citogenômica em répteis e especialmente em crocodilianos ainda são defasados, seguindo um  
364 caminho completamente diferente do seu grupo irmão. Desta forma, a presente tese apresenta as  
365 análises realizadas com diferentes técnicas citogenômicas em espécies representativas de duas das  
366 três famílias - Alligatoridae e Crocodylidae – a fim de possibilitar uma melhor compreensão dos  
367 processos envolvidos na evolução genômica e cromossômica de suas espécies. Caracterizamos pela  
368 primeira vez dados citogenéticos e moleculares para todas as espécies de Alligatoridae, observando  
369 um notável conservadorismo cromossômico entre as espécies de Caimaninae, condizente com a  
370 dicotomia observada entre as subfamílias Caimaninae e Alligatorinae, e demonstramos o papel dos  
371 rearranjos na história evolutiva destas espécies. Os dados de Crocodylidae demonstram que apesar  
372 de não serem tão conservados como os jacarés e aligátors, eles possuem um cariótipo mais próximo  
373 ao cariótipo ancestral de Crocodylia do que as outras famílias, e evidenciaram como os rearranjos  
374 estão envolvidos nas mudanças que deram origem a atual diversidade de cariótipos em crocodilianos.

## ABSTRACT

375

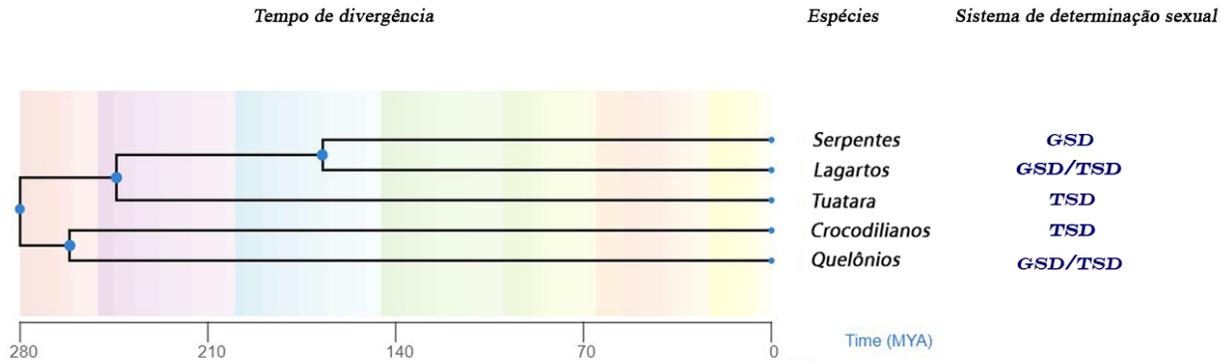
376 Crocodylia is an order that has undergone very few morphophysiological, biogeographic and genetic  
377 changes over time, despite having originated between the end of the Triassic and the beginning of the  
378 Jurassic, approximately 200 million years ago. This order is divided into three families: Crocodylidae,  
379 Gavialidae, and Alligatoridae, with representatives distributed on practically all continents, except  
380 for Europe and Antarctica, thus being geographically delimited by temperature. According to  
381 phylogenetic studies, crocodilians form a monophyletic group together with dinosaurs, pterosaurs,  
382 and birds, therefore suggesting a closer relationship with birds than with the rest of Archosauria.  
383 Despite this proximity, the fact that both taxa have a certain karyotypic variability and the importance  
384 of having access to these data to better understand the evolutionary history of these animals, studies  
385 on cytogenomic characterization in reptiles and especially in crocodilians, are still quite outdated,  
386 following a completely different path from its sister group. Therefore, this thesis presents the analyzes  
387 carried out with different cytogenomic techniques on representative species of two of the three  
388 families – Alligatoridae and Crocodylidae – to enable a better understanding of the processes involved  
389 in the genomic and chromosomal evolution of their species. We characterize for the first time  
390 cytogenetic and molecular data for all Alligatoridae species, observing a notable chromosomal  
391 conservatism among Caimaninae species, consistent with the dichotomy observed between the  
392 Caimaninae and Alligatorinae subfamilies, and demonstrate the role of rearrangements in the  
393 evolutionary history of these species. The Crocodylidae data demonstrate that despite not being as  
394 conserved as alligators, they have a karyotype closer to the ancestral karyotype of Crocodylia than  
395 other families, and showed how rearrangements are involved in the changes that gave rise to the  
396 current diversity of karyotypes in crocodilians.

## 397 1. INTRODUÇÃO

### 398 1.1. Diversidade de Répteis

399 Reptilia é um grupo parafilético bastante diverso com aproximadamente 12.000 espécies (Uetz  
400 et al., 2023), ultrapassando as aves em riqueza de espécies após a radiação dos tetrápodes, exibindo  
401 uma grande diversificação atual entre os amniotas (Shedlock et al., 2009). Essa diversidade engloba-  
402 os em dois grandes clados – Archosauromorpha e Lepidosauromorpha – que divergiram há  
403 aproximadamente 281 M.a (Hedges et al., 2006; Kumar et al., 2017), abrindo espaço para o  
404 surgimento de boa parte dos quatro grupos principais atuais – Crocodylia, Testudines, Sphenodontia  
405 e Squamata (Sues, 2019). Ao compararmos a quantidade de espécies entre estas linhagens,  
406 observamos que existe uma notável diferença, desde apenas uma espécie em Tuatara (Sphenodontia),  
407 27 espécies em Crocodylia, 356 espécies em Quelônios (Testudines) até 11.549 espécies em  
408 Squamata - até o momento - visto que centenas de espécies novas de escamados são descritas a cada  
409 ano (Uetz et al., 2023).

410 Parte desta diversidade pode ser explicada pelo fato que características físicas e genômicas neste  
411 táxon são bastante variáveis, principalmente quando comparamos com outros táxons mais bem  
412 estudados como mamíferos e aves. Répteis não-aviários possuem complexos padrões evolutivos  
413 observados, principalmente relacionados à duas características importantes: determinação sexual e  
414 modo de reprodução (Card et al., 2023). Diferenças nas formas de determinação sexual envolvem a  
415 i) a determinação genética do sexo (GSD) e/ou ii) determinação ambiental do sexo (ESD) (**Figura**  
416 **1**). Mesmo com essa variedade de exemplos que oferece uma oportunidade única para melhor  
417 entendimento da evolução da determinação sexual, ela é pouco estudada devido a obstáculos como o  
418 grande número de transições entre os mecanismos de determinação do sexo das espécies de  
419 escamados estudados e a complexidade do sistema de determinação sexual para os répteis (revisado  
420 em Deakin & Ezaz, 2019).



421

422 **Figura 1.** Sistemas de determinação sexual em répteis não-aviários. Os dados foram obtidos da revisão  
 423 realizada por Deakin & Ezaz (2019) e a árvore foi gerada com o TimeTree (2022).

424

425 Outra característica bastante relevante refere-se às diversas formas de reprodução sexual em  
 426 répteis, direcionadas especialmente pelas características do ambiente em que estes organismos estão  
 427 inseridos, culminando com o surgimento a evolução dos padrões reprodutivos observados no grupo.  
 428 Tuatara, quelônios e crocodilianos reproduzem-se predominantemente por oviparidade (Angelini &  
 429 Ghiara, 1984; Blackburn, 2000; Sites et al., 2011), por outro lado, escamados exibem todos os modos  
 430 de reprodução conhecidos em amniotas: oviparidade, viviparidade, ovoviviparidade e em alguns  
 431 casos se reproduzem de forma assexuada, via partenogênese obrigatória: especificamente em cobras  
 432 e lagartos (Avisé, 2015; Sites et al., 2011; Whittington et al., 2022) - em alguns momentos gerando  
 433 híbridos (Lowe & Wright, 1966; Darevsky, 1958), ou via partenogênese facultativa, como por  
 434 exemplo, no Dragão de Komodo (Watts et al., 2006). Recentemente descobriu-se uma exceção à regra  
 435 no padrão reprodutivo já bem documentado de crocodilianos, onde uma fêmea de crocodilo  
 436 americano (*Crocodylus acutus*) realizou partenogênese facultativa (Booth et al., 2023), assim como  
 437 ocorre também em aves, grupo-irmão de Crocodylia. Outro modo reprodutivo único observado no  
 438 grupo mais diverso de Répteis – Squamata – é da mudança rápida (ou *turnover*) em seu modo  
 439 reprodutivo sexuado permitindo que algumas espécies de lagartos se reproduzam por oviparidade ou  
 440 viviparidade (Brana & Bea, 1987; Heulin, 1988; Qualls et al., 1995; Smith & Shine, 1997; Braz et  
 441 al., 2016; Recknagel et al., 2021).

442 Em nível genômico observa-se que os répteis possuem uma ampla variedade entre os seus grupos  
 443 em relação ao tamanho do genoma, com uma média de 2.1 picogramas (pg) em escamados, 2,8 pg  
 444 em quelônios, 3.0 pg em crocodilianos até 5,0 pg em tuatara – o maior genoma entre os amniotas  
 445 (Gregory, 2001). Sabemos que o tamanho do genoma está diretamente ligado a atividade de

446 elementos repetitivos, quantidade de conteúdo GC (Olmo, 1986; 2008), variação genética (Bista &  
447 Valenzuela, 2020) e outros aspectos como taxa metabólica, longevidade (Gregory, 2001; Waltari &  
448 Edwards, 2002), tamanho da célula, do núcleo e fisiologia celular (Gregory, 2005).

449

### 450 1.1.1. Diversidade de Crocodilianos

451 Crocodilianos pertencem a um grupo antigo que sofreu pouquíssimas mudanças morfológicas,  
452 ecológicas e genéticas ao longo do tempo, mesmo quando os comparamos somente com outros  
453 membros de Archosauria, como os já extintos dinossauros e as aves (Bronzati et al., 2015; Stubbs et  
454 al., 2021; Green et al., 2014; Pan et al., 2021). Sabe-se que no passado houve uma maior diversidade  
455 entre suas linhagens, onde algumas eram exclusivamente terrestres, outras aquáticas e outras  
456 apresentavam um modo de vida “anfíbio” como predadores semiaquáticos que se perpetuam até hoje  
457 em diferentes nichos como rios, lagos, estuários, pântanos, charco e no mar (Grigg & Kirshner, 2015).  
458 Essas e outras características fisiológicas permitem que os crocodilianos tenham uma alta taxa de  
459 sucesso de dispersão ao colonizar diferentes ambientes de forma relativamente rápida. Entretanto, há  
460 uma limitação devido às baixas temperaturas, fator este que explica sua distribuição circumtropical,  
461 onde apenas algumas espécies se estendem além dos trópicos (*Crocodylus niloticus* e o gênero  
462 *Alligatoridae*) refletindo a pequena quantidade de espécies atuais (**Figura 2**).

463

464

465

466

467

468

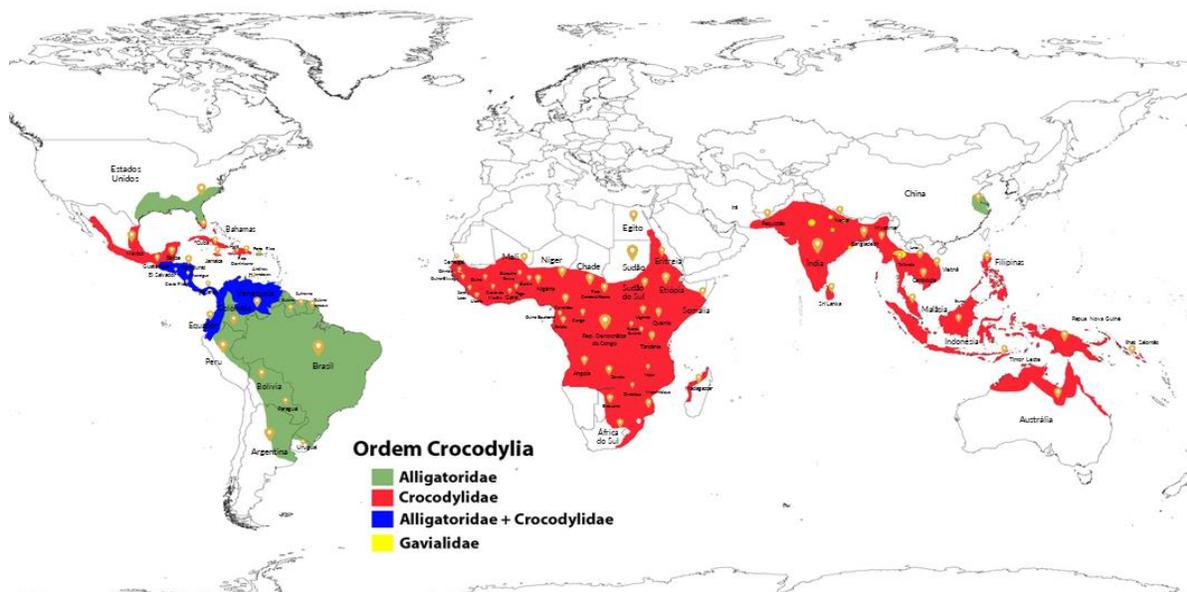
469

470

471

472

473



474 **Figura 2.** Distribuição geográfica atual das espécies viventes da ordem Crocodylia. Dados de Uetz et al.  
475 (2023).

476 Entretanto, a ocorrência de sobreposição na distribuição geográfica de diferentes espécies e  
477 gêneros de crocodilianos indica a existência de áreas de introgressão genética e/ou hibridização entre  
478 espécies simpátricas, assim como de indivíduos que coexistem em uma mesma área por segregação  
479 de nicho (espécies sintópicas) (Ouboter, 1996; Villamarín et al., 2017). Estudos anteriores mostram  
480 que isto é bastante comum de ocorrer em diferentes espécies de um mesmo gênero. Por exemplo, Ray  
481 et al. (2004) observaram a presença de haplótipos característicos de *Crocodylus acutus* em populações  
482 de *Crocodylus intermedius* indicando uma provável hibridização natural entre as duas espécies em  
483 Belize, de forma similar outros estudos apontam uma provável hibridização entre *C. acutus* e  
484 *Crocodylus rhombifer* e entre *C. acutus* e *C. intermedius* (Venegas-Anaya et al., 2008; Weaver et al.,  
485 2008; Milián-García et al., 2011). Hrbek et al. (2008) observaram que este cenário nem sempre se  
486 aplica, uma vez que *Paleosuchus trigonatus* e *P. palpebrosus* apesar de pertencerem ao mesmo  
487 gênero e possuírem semelhanças fenotípicas, não compartilham haplótipos nucleares nem  
488 mitocondriais. Tal fato provavelmente se deve a um comportamento mais agressivo e territorialista  
489 dessas espécies, onde a competição seja um dos principais fatores que impeça a possibilidade de  
490 acasalamento (Magnusson & Lima, 1991; Rueda-Almonacid et al., 2007; Marioni et al., 2022).  
491 Outros aspectos como uso de habitats, presas preferenciais, tamanho corporal e época reprodutiva  
492 também influenciam e minimizam a competição entre as quatro espécies de jacarés que ocorrem na  
493 bacia Amazônica que são comumente encontradas na mesma região e muitas vezes no mesmo corpo  
494 d'água (Marioni et al., 2013). Sabe-se que várias espécies de crocodilianos exibem mudanças  
495 ontogenéticas em sua dieta (Dodson, 1975; Magnusson et al., 1987; Erickson et al., 2014) e isso  
496 demonstra ser um indicativo da ocupação de diferentes nichos por essas espécies de acordo com a  
497 disponibilidade de presas, já que crocodilianos são predadores oportunistas (Rosenblatt & Heithaus,  
498 2011; Rosenblatt et al., 2015). Estas diferenças sutis tornam os estudos biogeográficos e o  
499 entendimento da definição de espécies em crocodilianos bastante desafiadores. Este cenário gera uma  
500 falta de consenso entre os taxonomistas sobre a quantidade de espécies atuais, a existência de  
501 subespécies e em quais gêneros e famílias estão posicionadas.

502 A ordem Crocodylia divide-se taxonomicamente, considerando as variações observadas na  
503 morfologia cranial resultantes de adaptações a diferentes estratégias alimentares (Grigg & Gans,  
504 1993), em três famílias: Crocodylidae, Gavialidae e Alligatoridae, são propostos nove gêneros e  
505 aproximadamente 27 espécies (Brochu, 2003; McAliley et al., 2006; Martin, 2008; Hekkala et al.,  
506 2011; Shirley et al., 2014; Barreiros, 2016; Uetz et al., 2023), que mantém praticamente as mesmas

507 características há 100 M.a (Grigg et al., 2001; Brochu, 2003; Bronzati et al., 2015; Stubbs et al.,  
508 2021).

509 A família Crocodylidae é composto por 18 espécies reconhecidas pertencentes a três gêneros:  
510 *Crocodylus*, *Osteolaemus* e *Mecistops* distribuídos na Ásia, Austrália, África e o Novo Mundo  
511 (Hekkala et al. 2011; Shirley et al. 2014, 2018; Nicolai e Matzke 2019; Pough 2022). *Osteolaemus* e  
512 *Mecistops* são linhagens irmãs, ambas distribuídas na África Ocidental e Central, por vezes tratadas  
513 como membros da subfamília Osteolaeminae, uma linhagem irmã da subfamília Crocodylinae (com  
514 o único gênero existente *Crocodylus*; Brochu 2003; Hekkala et al. 2021). O gênero monotípico  
515 Tomistoma do Sudeste Asiático, falso gavial, ainda não está claramente estabelecido de forma  
516 sistemática, mas há evidências crescentes de que Tomistoma é um representante da família irmã  
517 Gavialidae (Oaks 2011; Lee e Yates 2018; Colston et al. 2020; Hekkala et al. 2021; Pan et al. 2021).  
518 Gavialidae possui somente uma espécie, o gavial, *Gavialis gangeticus*, nativo do Nepal e da Índia  
519 (Bezuijen et al., 2014; Lee & Yates, 2018). Por fim, a família Alligatoridae possui oito espécies  
520 distribuídas em quatro gêneros: *Alligator* que forma a monogenérica subfamília Alligatorinae,  
521 *Melanosuchus*, *Paleosuchus* e *Caiman* pertencentes a Caimaninae (Uetz et al., 2020; Pan et al., 2021)  
522 [mas, Muniz et al., 2019; Bittencourt et al., 2019, sugerem a existência de outras espécies crípticas].  
523 Exceto por *Alligator*, onde *A. mississippiensis* e *A. sinensis* estão restritos ao sudoeste dos Estados  
524 Unidos e da China, respectivamente, as espécies de Caimaninae ocorrem do México a América do  
525 Sul, sendo especialmente espalhados pelo Brasil (Brochu, 2003; Oaks, 2011).

526 Todas as espécies compartilham as mesmas características reprodutivas como uma estratégia de  
527 corte e de acasalamento elaborada (pistas sensoriais e comportamento de dominância), fertilização  
528 interna, construção de ninhos, postura de ovos, cuidado parental e vocalização dentro dos ovos  
529 (revisado por Grigg & Kirshner, 2015), características estas que também são observadas em seu grupo  
530 irmão, as aves. O sistema de acasalamento de crocodilianos é poligâmico, onde alguns estudos  
531 apontam a existência de paternidade múltipla (Davis et al., 2001; Amavet et al., 2008, 2012; McVay  
532 et al., 2008; Muniz et al., 2011; Oliveira et al., 2014; Milián-García et al., 2016; Lafferriere et al.,  
533 2016; Ojeda et al., 2017). Entretanto, ao compararmos as estratégias reprodutivas das famílias  
534 Alligatoridae e Crocodylidae vemos que a primeira se reproduz menos frequentemente que a última,  
535 mas produzem mais ovos. Por outro lado, em Alligatoridae, existem diferenças entre os gêneros onde,  
536 *Paleosuchus* produz ovos maiores, *Caiman* produz mais ovos e *Alligator* produz mais ovos mas que  
537 são menores (Thorbjarnarson, 1996).

## 538 2. EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM RÉPTEIS

539 O estudo da citogenética em répteis, mais especificamente de répteis não-aviários, ainda é  
540 bem defasado, mesmo tendo sido iniciado há mais de um século (Deakin et al., 2016; Deakin & Ezaz,  
541 2019). Apesar disso, constata-se uma organização genômica diferenciada, demonstrada pelo alto  
542 nível de diversidade cromossômica (Olmo, 2008) e sua possível influência na história evolutiva do  
543 grupo.

544 Essa diversidade cariotípica manifesta-se pelo: i) número diploide variável ( $2n = 16$  a  $68$ ), ii)  
545 presença de microcromossomos em quase todos os seus clados (Fredga et al., 1977; Olmo, 2005;  
546 Damas et al., 2021; Srikulnath et al., 2021), iii) sistemas de determinação sexual distintos, como  
547 citado anteriormente: GSD e/ou TSD e partenogênese, e iv) sistemas de cromossomos sexuais: a)  
548 simples (XX/XY; ZZ/ZW), b) múltiplos (XX/XXY; ZZ/ZZW) que podem ser macros ou micros e c)  
549 crípticos (Deakin & Ezaz, 2019). Investigações anteriores sugerem que esta ampla variação  
550 cariotípica ocorre devido a presença de microcromossomos, já que eles possuem características  
551 únicas como alto teor de conteúdo GC (Hillier et al., 2004), alta densidade gênica (Smith et al., 2000),  
552 baixa quantidade de elementos repetitivos (Hillier et al., 2004) e altas taxas recombinativas  
553 proporcionadas pelo maior contato entre os loci cromossômicos dentro da célula (Rodionov et al.,  
554 1992).

555 O mecanismo de determinação do sexo impacta diretamente a evolução dos sistemas de  
556 cromossomos sexuais, gerando cromossomos sexuais homomórficos (cromossomos que são  
557 virtualmente similares, portanto difíceis de identificar como tal) e dois tipos de cromossomos sexuais  
558 heteromórficos (cromossomos distinguíveis entre machos e fêmeas, devido a evolução de  
559 cromossomos degenerados) (Ellegren, 2011; Wright et al., 2016; Abbott et al., 2017). Cromossomos  
560 sexuais heteromórficos geralmente são facilmente distinguíveis usando técnicas citogenéticas  
561 clássicas contrapondo a detecção de cromossomos sexuais homomórficos, onde se faz necessário o  
562 uso de técnicas específicas e acuradas tornando em alguns casos o trabalho mais desafiador.  
563 Cromossomos sexuais homomórficos são mais comumente observados em tuatara e crocodilianos,  
564 mas também ocorrem em quelônios e escamados, em espécies que também exibem o sistema sexual  
565 XY e ZW (Pokorná & Kratochvíl, 2009; Bista & Valenzuela, 2020). Recentemente (Gamble et al.,  
566 2017), descobriram que cobras da superfamília Henophidia possuem cromossomos sexuais  
567 homomórficos XY que evoluíram de forma independente, corroborando trabalhos anteriores que  
568 demonstram que cobras não possuem apenas um sistema sexual ZZ/ZW (Viana et al., 2020). Apesar

569 de, até o momento, apenas aproximadamente 4% das mais de 2.000 espécies descritas terem sido  
570 analisadas (Gamble et al., 2015; Kratochvíl et al., 2021), o grupo que exhibe maior variação em  
571 sistemas de cromossomos sexuais e de determinação sexual são os geckos (Gamble et al., 2015). Este  
572 grupo apresenta diversos sistemas de determinação sexual que varia desde ESD a GSD exibindo  
573 heterogamia em machos e fêmeas (Pokorná & Kratochvíl, 2009; Pokorná et al., 2014; Gamble et al.,  
574 2015; Rovatsos et al., 2019), onde os cromossomos sexuais evoluíram cerca de 20 vezes em Gekkota  
575 (Gamble et al., 2015) de forma independente (Mank & Ellegren, 2007; Veyrunes et al., 2008;  
576 Rovatsos et al., 2016; Cornejo-Páramo et al., 2020; Kostmann et al., 2021).

577

## 578 **2.1. Estudos cromossômicos na ordem Crocodylia**

579 Dados citogenéticos prévios para as espécies de crocodilianos (**Tabela 1**), evidenciam que o  
580 número diploide ( $2n$ ) varia entre 30 (*Crocodylus siamensis* e *Crocodylus rhombifer*) a 42 (*Caiman*  
581 *latirostris*, *C. yacare*, *C. crocodilus*, *Melanosuchus niger*, *Paleosuchus trigonatus* e *P. palpebrosus*)  
582 e o número fundamental (NF) varia entre 56 e 62 (King et al., 1986; Amavet et al., 2003; Kawagoshi  
583 et al., 2008; Olmo & Signorino, 2019). Os dados também apontam para a ausência de  
584 microcromossomos, possivelmente pela ocorrência de uma série de fusões entre eles, após a  
585 divergência ocorrida entre as linhagens de crocodilianos e aves há 220–250 M.a (Kawagoshi et al.,  
586 2008). Nenhuma das spp. analisadas apresentou cromossomos sexuais diferenciados, o que é  
587 facilmente compreendido devido à dependência da temperatura para determinação do sexo (Amavet  
588 et al., 2003; Valenzuela & Lance, 2004; Kawai et al., 2007).

589 O cariótipo ancestral proposto para Crocodylia possui 42 cromossomos acrocêntricos, assim  
590 como as espécies de *Paleosuchus* (**Tabela 1**). Modificações estruturais como fusão, inversão  
591 pericêntrica e translocação recíproca deram surgimento às fórmulas cariotípicas atuais, como as  
592 encontradas nos gêneros *Alligator*, *Crocodylus*, *Osteolaemus*, *Tomistoma* e *Gavialis* (Cohen & Gans,  
593 1970; King, 1986; Amavet et al., 2003). Na maioria das espécies de Crocodylidae observa-se uma  
594 constrição secundária no par 10, ainda que em *C. crocodilus* ela se apresente no par 16 (King et al.,  
595 1986).

596 **Tabela 1 - Dados citogenéticos disponíveis para a Ordem Crocodylia.** Em asterisco (\*) estão inclusos os  
 597 dados gerados durante o desenvolvimento desta tese.  
 598

Família	Espécie	Número Diploide	Referência
<b>Alligatoridae</b>			
	<i>Alligator mississippiensis</i>	2n = 32	Cohen & Gans, 1970 *Oliveira et al., 2021b
	<i>Alligator sinensis</i>	2n = 32	Cohen & Gans, 1970 Zeng et al., 2011 *Oliveira et al., 2021b
	<i>Caiman crocodilus</i>	2n = 42	Cohen & Gans, 1970 King et al., 1986 Amavet et al., 2000 *Oliveira et al., 2021a, 2021b
	<i>Caiman latirostris</i>	2n = 42	Cohen & Gans, 1970 Amavet et al., 2000, 2003 *Oliveira et al., 2021b
	<i>Caiman yacare</i>	2n = 42	Cohen & Gans, 1970 Amavet et al., 2003 *Oliveira et al., 2021b
	<i>Melanosuchus niger</i>	2n = 42	Cohen & Gans, 1970 *Oliveira et al., 2021b
	<i>Paleosuchus palpebrosus</i>	2n = 42	Cohen & Gans, 1970 *Oliveira et al., 2021b
	<i>Paleosuchus trigonatus</i>	2n = 42	Cohen & Gans, 1970 *Oliveira et al., 2021b
<b>Crocodylidae</b>			
	<i>Mecistops (Crocodylus) cataphractus</i>	2n = 30	Cohen & Gans, 1970
	<i>Crocodylus palustris</i>	2n = 30	Cohen & Gans, 1970
	<i>Crocodylus rhombifer</i>	2n = 30	Cohen & Gans, 1970 Chavananikul et al., 1994 *Sales-Oliveira et al., 2023
	<i>Crocodylus siamensis</i>	2n = 30	Chavananikul et al., 1994 Kawagoshi et al., 2008 *Sales-Oliveira et al., 2023
	<i>Crocodylus acutus</i>	2n = 32	Cohen & Gans, 1970
	<i>Crocodylus intermedius</i>	2n = 32	Cohen & Gans, 1970
	<i>Crocodylus johnstoni</i>	2n = 32	Cohen & Gans, 1970 King et al., 1986
	<i>Crocodylus mindorensis</i>	2n = 32	*Sales-Oliveira et al., 2023
	<i>Crocodylus moreletii</i>	2n = 32	Cohen & Gans, 1970 *Sales-Oliveira et al., 2023

<i>Crocodylus niloticus</i>	2n = 32	Cohen & Gans, 1970 Chavananikul et al., 1994
<i>Crocodylus novaeguineae</i>	2n=32	Cohen & Gans, 1970 Chavananikul et al., 1994
<i>Crocodylus porosus</i>	2n=34	Cohen & Gans, 1970 King et al., 1986 Chavananikul et al., 1994 Dalzell et al., 2009
<i>Osteolaemus osborni</i>	2n=30	*Sales-Oliveira et al., 2023
<i>Osteolaemus tetraspis</i>	2n=38	*Sales-Oliveira et al., 2023
<b>Gavialidae</b>		
<i>Gavialis gangeticus</i>	2n=32	Cohen & Gans, 1970
<i>Tomistoma schlegelii</i>	2n=32	Cohen & Gans, 1970

599

600           Embora, para a maioria dos crocodilianos, apenas o número diploide havia sido descrito (King  
601 et al., 1986; Lui et al., 1994), alguns estudos pontuais, envolvendo experimentos de pintura  
602 cromossômica com sondas obtidas de *Gallus gallus* por citometria de fluxo, foram realizados em *C.*  
603 *niloticus*, evidenciando os rearranjos cromossômicos (principalmente envolvendo os  
604 macrocromossomos) ocorridos durante o processo de diversificação cromossômica nesta espécie  
605 (Kasai et al., 2012). Estudos complementares se faziam então necessários para compreender os  
606 processos de evolução cromossômica ocorridos durante a diversificação das espécies da ordem  
607 Crocodylia, uma vez que uma análise cromossômica convencional já aponta para substanciais  
608 diferenças, pelo menos entre membros das famílias Crocodylidae e Alligatoridae.

### 609 3. CITOGENÉTICA MOLECULAR EM ESTUDOS EVOLUTIVOS

610 A citogenética molecular viabiliza a compreensão dos processos evolutivos com mais  
611 precisão, tornando possível recriar o caminho evolutivo das diferentes linhagens de répteis,  
612 evidenciando o papel que rearranjos cromossômicos desempenharam no surgimento de novas  
613 espécies (Deakin & Ezaz, 2019).

614 As abordagens moleculares utilizadas comumente para determinação dos níveis de homologia  
615 cromossômica e os prováveis tipos de rearranjos que ocorreram entre as diferentes linhagens de  
616 répteis são a pintura cromossômica, mapeamento molecular com BAC ou cDNA, sequenciamento  
617 genômico e hibridizações comparativas. Um exemplo representativo da aplicação da pintura  
618 cromossômica para a melhor compreensão da história evolutiva entre grupos de répteis é o trabalho  
619 de Pokorná et al. (2011). Neste trabalho, foi constatado que o macrocromossomo Z de galinha (*G.*  
620 *gallus*) é extremamente conservado, ocorrendo também em 28 espécies de répteis não-aviários.  
621 Pinturas cromossômicas foram também utilizadas entre espécies da mesma família para detectar o  
622 nível de conservadorismo entre elas (Giovannotti et al., 2009; Trifonov et al., 2011; Pokorná et al.,  
623 2012) e como forma de identificação de homologias em populações partenogênicas e poliploides  
624 (Trifonov et al., 2015). No tocante aos microcromossomos, mapeamentos utilizando clones de BACs  
625 e cDNAs são mais resolutivos, trazendo informações que ajudam a detectar possíveis rearranjos  
626 ocorridos, e a preencher lacunas de informação (Badenhorst et al., 2015; Deakin et al., 2016; Kichigin  
627 et al., 2016). Por sua vez, o sequenciamento genômico tem se demonstrado uma técnica  
628 complementar com um bom detalhamento dos rearranjos que não são detectáveis pelos  
629 procedimentos anteriores, mas que é ainda pouco utilizado atualmente (Völker et al., 2010; Skinner  
630 & Griffin, 2012; Putnam et al., 2016). Tais avanços metodológicos permitem um melhor  
631 entendimento da extensão dos rearranjos ocorridos, reconstruções genômicas mais acuradas e a  
632 determinar quais características cromossômicas são mais suscetíveis a eventos que atuem como  
633 processos adaptativos (revisado em Farré et al., 2015). No presente estudo, eles possibilitaram a uma  
634 compreensão mais detalhada da história da evolução cromossômica dos répteis e a presumir quais  
635 fatores estão implicados no nível de diversidade cariotípica entre as linhagens.

#### 636 4. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

637 Conforme destacado acima, a ordem Crocodylia oferece um modelo particular para estudos  
638 cromossômicos, biogeográficos e evolutivos. Entretanto, dados informativos e de interesse para estas  
639 abordagens, tais como caracteres citogenéticos e genômicos, são ainda praticamente inexistentes,  
640 impossibilitando caracterizar suas tendências evolutivas do ponto de vista da citogenômica. É  
641 compreensível que tal situação seja pelo menos em parte, justificada pela ampla distribuição  
642 geográfica dessa ordem com grupos endêmicos a diferentes continentes, o que, somado a grande  
643 dificuldade de captura e manejo dos animais, dificulta a realização de um estudo integrativo que  
644 permita uma visão globalizada de seu processo evolutivo. Assim sendo, a presente tese objetivou  
645 realizar análises citogenômicas em espécies das famílias Alligatoridae e Crocodylidae. Tais  
646 abordagens permitiram uma melhor compreensão dos processos que moldaram os padrões de  
647 distribuição atuais destas espécies, bem como seus mecanismos de evolução genômica e  
648 cromossômica.

649 Este trabalho visou analisar todas as espécies de família Alligatoridae e algumas espécies de  
650 crocodilos da família Crocodylidae a fim de evidenciar os processos de evolução cromossômica  
651 ocorridos nesta ordem. Para isso, foram realizados procedimentos citogenéticos clássicos e  
652 moleculares (bandeamento C, hibridização genômica comparativa (CGH)), Pintura cromossômica  
653 total (WCP) e mapeamento de sequências repetitivas) destacando características genômicas inter- e  
654 intraespecíficas. para examinar a homologia cromossômica e identificar os principais rearranjos  
655 cromossômicos ocorridos durante o processo de evolução cariotípica dentro da ordem Crocodylia.

## 656 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 657 5.1. Material

658 Neste trabalho analisamos 15 espécies de crocodilianos pertencentes as três famílias da ordem  
659 Crocodylia, amostrados em diversas localidades ao longo dos trópicos, conforme especificado na  
660 **Tabela 2.** Os indivíduos sul-americanos foram coletados pelo método de captura ativa em  
661 levantamento noturno com autorização concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da  
662 Biodiversidade (ICMBio), Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sob a  
663 licença (71857-7), transportados para o laboratório mais próximo, onde foram obtidas amostras  
664 sanguíneas para utilização nos experimentos, seguindo as diretrizes do Comitê de Ética em  
665 Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Nº do processo: 4617090919) e  
666 cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN) sob o acesso  
667 ABFF266. De forma similar amostras das outras espécies foram obtidas de animais mantidos em  
668 cativeiro legalmente na Europa seguindo as diretrizes da Convenção sobre o Comércio Internacional  
669 de Espécies Ameaçadas da Fauna e da Flora Silvestres (CITES), certificados (EU 0228-1057/14, ES-  
670 CC-00041/07C, ES-CC-0006/07C, 50721-18, DE-DA 190814-5, DE-DA 190814-6) e um indivíduo  
671 de *O. osborni* obtido na natureza por captura ativa na Bacia do Congo, onde a espécie é endêmica  
672 (provavelmente da Província Equador, amostrado em Kinshasa, República Democrática do Congo).  
673 Logo após a obtenção de dados, os animais foram soltos nos mesmos locais de captura.

674 **Tabela 2.** Espécies da ordem Crocodylia utilizadas no presente projeto, com indicação dos respectivos locais  
675 de amostragem, número e sexo dos indivíduos.

Espécies	Localidade/Origem das Amostras	N
<b>Alligatoridae</b>		
<i>Alligator mississippiensis</i>	Coleção da Universidade de Canberra (Austrália)	(02♀; 02♂)
<i>Alligator sinensis</i>	Coleções particulares (Alemanha)	(04♀; 01♂, 01 juvenil)
<i>Caiman crocodilus</i>	Amazonas (Brasil)	(02♀; 02♂)
<i>Caiman latirostris</i>	São Paulo (Brasil)	(04♀; 06♂)
<i>Caiman yacare</i>	Mato Grosso (Brasil)	(02♀; 08♂)
<i>Melanosuchus niger</i>	Pará (Brasil)	(02♀; 02♂)
<i>Paleosuchus palpebrosus</i>	Pará (Brasil)	(03♀; 03♂)
<i>Paleosuchus trigonatus</i>	Amazonas (Brasil)	(03♀; 04♂)
<b>Crocodylidae</b>		
<i>Crocodylus mindorensis</i>	Coleções particulares (República Tcheca)	(01 juvenil)
<i>Crocodylus moreletii</i>	Coleções particulares (República Tcheca)	(01 juvenil)
<i>Crocodylus rhombifer</i>	Coleções particulares (Tailândia)	(03♀; 02♂)
<i>Crocodylus siamensis</i>	Coleções particulares (Tailândia)	(02♀; 02♂)

676

## 677 **5.2. Métodos**

### 678 **5.2.1. Obtenção de Cromossomos Mitóticos**

679 Na obtenção das preparações cromossômicas mitóticas utilizamos a técnica de cultura de  
680 linfócitos com adaptações (Viana et al., 2016; Johnson Pokorná, 2016). O processo consiste em  
681 coletar cerca de 500 µl de sangue dos animais e incubar em 4ml de meio de cultura RPMI  
682 suplementado a 29 °C por 96hs, permitindo assim o crescimento da cultura celular e uma otimização  
683 da quantidade de células obtidas. Logo após adicionou-se 400 µL de Colchicina 0.025% com os tubos  
684 mantidos a 29 °C por 1h em seguida, o material foi centrifugado por 10min a 1300 rpm. Então,  
685 descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 8ml da solução hipotônica de Cloreto de Potássio (KCl)  
686 0.075M, a amostra foi ressuspensa e mantida em uma estufa a 37 °C por 45 min. Após a  
687 hipotonização adicionamos 50µl de solução Carnoy I (3 metanol:1 ácido acético),homogeneizamos  
688 cuidadosamente, centrifugamos por 10min a 1300 rpm e descartamos o sobrenadante. Assim, 10ml  
689 de solução Carnoy I a -20 °C foi adicionada e usada para ressuspender a amostra até sua  
690 homogeneização, essa etapa foi repetida mais 3x sempre com descarte do sobrenadante. Em seguida,  
691 2ml de solução Carnoy I foi adicionada para preenchimento do microtubo onde será armazenada a  
692 preparação cromossômica em freezer a -20 °C.

### 693 **5.2.2. Detecção da Heterocromatina C-positiva**

694 A heterocromatina C positiva foi detectada de acordo com Sumner (1972) utilizando o  
695 procedimento clássico com hidróxido de Bário, com modificações. As lâminas contendo uma gota de  
696 10 µl de suspensão celular foram tratadas por 2 min com ácido clorídrico (HCl) 0,2N a 42 °C, imersas  
697 rapidamente em água destilada para remoção do excesso de HCl e secas ao ar. Em seguida, foram  
698 incubadas em solução de Hidróxido de Bário Ba(OH)<sub>2</sub> 5% com tempo variável de acordo com a  
699 espécie utilizada (30 a 45 segundos). A ação do hidróxido de bário foi interrompida com uma rápida  
700 imersão da lâmina em HCl 0,2N a 37 °C. Após a secagem, as lâminas foram incubadas em solução  
701 salina 2xSSC (cloreto de sódio 0,3M + citrato trisódico 0,03M, pH 6,8), em uma estufa a 60 °C por  
702 20 minutos, posteriormente lavadas e secas ao ar. Os cromossomos foram corados com DAPI (1,2  
703 µg/ml) segundo Lui et al. (2012) e analisados em microscópio de epifluorescência.

### 704 **5.2.3. Detecção de Regiões Ricas em Bases Nitrogenadas GC**

705 Para determinação de áreas ricas em pares de bases AT e GC utilizamos a técnica de coloração  
706 dupla com Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) de acordo com o método  
707 de Schmid (1980).

### 708 **5.2.4. Extração de DNA**

709 Os DNAs genômicos totais (DNA<sub>g</sub>) utilizados nos experimentos foram extraídos de células  
710 sanguíneas de crocodilianos de acordo com o protocolo fenol-clorofórmio (Sambrook & Russel,  
711 2001), a integridade das amostras foi verificada em gel de agarose 1% para posterior quantificação  
712 no espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific).

### 713 **5.2.5. Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH)**

#### 714 **5.2.5.1. Sondas**

715 Para o mapeamento citogenético comparativo das espécies em estudo utilizamos diversas sondas  
716 de sequências de DNAs repetitivos, como sondas de DNA ribossomal (DNAr) 18S. Estas sondas  
717 foram obtidas via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir da clonagem de vetores plasmidiais e  
718 da propagação de em células competentes do tipo DH5 $\alpha$  (Invitrogen) de acordo com Cioffi et al.  
719 (2009). Após a realização da PCR com os primers 18Sf (5' -CCGAGGACCTCACTAAACCA- 3')  
720 e 18Sr (5' -CC-GCTTTGGTGACTCTTGAT- 3') e o DNA nuclear de *Hoplias malabaricus*,  
721 utilizamos o produto final da PCR com aproximadamente 1400 pares de base (pb) que correspondem  
722 aos segmentos do RNA ribossomal (RNAr) 18S como sonda. Logo após, conferimos a integridade  
723 do material e se possuía um padrão correspondente de bandas no gel de agarose 1%, quantificamos o  
724 produto e utilizamos para serem marcados por *nick translation* com Atto550-dUTP conforme as  
725 recomendações do fabricante.

726 O DNA telomérico (TTAGGG)<sub>n</sub>, resultante da sonda gerada por PCR na ausência de um DNA  
727 molde utilizando os primers (TTAGGG)<sub>5</sub> e (CCCTAA)<sub>5</sub>, foi isolado de acordo com os parâmetros  
728 estabelecidos em Ijdo et al. (1991), a sonda amplificada foi marcada com Atto550-dUTP ou com o  
729 Kit Telomere PNA Fish Cy3 (Dako/Agilent). Utilizamos oligonucleotídeos enriquecidos com  
730 sequências microssatélites: d(GA)<sub>15</sub>, d(CA)<sub>15</sub>, d(A)<sub>30</sub> e d(CGG)<sub>10</sub>, marcadas diretamente com Cy3 na  
731 extremidade 5' durante a síntese, por VBC-Biotech (Viena), segundo Kubat et al. (2008), com  
732 pequenas modificações.

733                   5.2.5.2.    *Marcação das Sondas*

734            Exceto em relação aos oligonucleotídeos e a telomérica (acima descritos), as demais sondas  
735 foram marcadas diferencialmente por *nick translation* utilizando Atto550-dUTP ou Atto488-dUTP,  
736 conforme as instruções do manual do fabricante.

737                   5.2.5.3.    *Análises Microscópicas e Processamento de Imagem*

738            Em média 30 metáfases por indivíduo foram analisadas para confirmar o *2n*, estrutura  
739 cariotípica e resultados das técnicas convencionais e moleculares aplicadas. As imagens foram  
740 capturadas usando um microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão), com  
741 CoolSNAP e as imagens foram processadas usando o software Image-Pro Plus 4.1 (Media  
742 Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). A morfologia cromossômica foi classificada de acordo com  
743 Levan et al. (1964).

744                   5.2.5.4.    *Preparação das Lâminas, Hibridização e Detecção do Sinal*

745            As lâminas, contendo as preparações cromossômicas foram inicialmente envelhecidas a 60 °C  
746 em estufa e em seguida incubadas com 100 µl de RNase (1 µl RNase 10mg/ml + 1 ml 2xSSC) por  
747 1h a 37 °C em câmara úmida. Logo, as lâminas passaram por uma lavagem em tampão PBS 1x no  
748 *shaker* por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, incubadas em 100µl de pepsina 0,005  
749 % (1000 µl H<sub>2</sub>O + 5µl HCl 1M + 1,5µl de pepsina (20 mg/ml)) por 10 minutos em câmara úmida a  
750 37 °C. As lâminas foram novamente lavadas com tampão PBS 1x, mergulhadas rapidamente em água  
751 destilada e logo após desidratadas em série alcóolica de etanol (70%; 85%; 100%) por 2 minutos  
752 cada.

753            Após a desnaturação do DNA cromossômico em formamida 70% (70 ml de formamida + 30  
754 2xSSC) por 3 minutos e 15 segundos a 72 °C, as lâminas foram desidratadas em etanol a 70% gelado  
755 por 3 minutos e 15 segundos e logo após em série de etanol a 85% e 100% por 2 minutos. O mix de  
756 hibridização, contendo 2µl da sonda marcada, 10 mg/ml de sulfato de dextrano, 2xSSC e 50% de  
757 formamida em um volume final de 20µl, foi desnaturado a 85°C por 10 minutos em termociclador  
758 paralelamente e então aplicado sobre as lâminas secas onde a hibridização ocorreu por um período  
759 de 16-18h (ou 72h no caso do CGH) a 37 °C em câmara úmida. As lavagens pós-hibridização foram  
760 realizadas em solução de 1xSSC por 5 min a 65 °C em um *shaker*, seguida de uma lavagem em Tween  
761 por 5 min e uma última lavagem em PBS 1x por 1 min, ambas à temperatura ambiente e em *shaker*.  
762 As lâminas foram desidratadas uma última vez em série alcoólica de etanol (70%; 85%; 100%) por 2

763 minutos cada. Finalmente, depois de secas os cromossomos foram contracorados com 20  $\mu$ l de DAPI  
764 (1.2  $\mu$ g/ml) e montados em solução Antifading (Vector Laboratories, EUA) para análise em  
765 microscópio de epifluorescência Olympus BX50 (Olympus Corporation, Japão) com câmera  
766 CoolSNAP CCD acoplada (Teledyne Photometrics, EUA). Para análise das imagens utilizamos os  
767 softwares ISIS e TunderX (Leica Geosystems, Suíça).

### 768 **5.2.6. Hibridização Genômica Comparativa (CGH) e Pintura Cromossômica** 769 **Completa (WCP)**

770 Os procedimentos para a CGH foram realizados com foco entre comparações interespecíficas  
771 utilizando DNAg de pelo menos uma fêmea de cada gênero correspondentes às distintas espécies de  
772 crocodilianos obtidos da extração de tecido sanguíneo pelo protocolo de fenol-clorofórmio  
773 (Sambrook & Russel, 2001) foram marcados diferencialmente por *nick translation* (Jena Bioscience,  
774 Alemanha) utilizando Atto550-dUTP para coloração do genoma da espécie em que as metáfases  
775 foram utilizadas como referência (*C. yacare* em Alligatoridae e *C. siamensis* em Crocodylidae)  
776 enquanto o DNAg das outras espécies a serem comparadas foram marcados com Atto448-dUTP e  
777 utilizados em experimentos de hibridizações recíprocas. Em todos os experimentos as sequências de  
778 DNA repetitivo foram bloqueadas por DNA competidor não marcado (i.e., porção genômica do DNA  
779 enriquecida de sequencias moderadamente e altamente repetitivas), preparado a partir de C<sub>0</sub>t-1 DNA  
780 (500ng DNAg de *C. yacare* + 500ng DNAg da espécie a ser comparada + 6 $\mu$ g de C<sub>0</sub>t-1 DNA de cada  
781 espécie) ou (500ng DNAg de *C. siamensis* + 500ng DNAg da espécie a ser comparada + 9 $\mu$ g de C<sub>0</sub>t-  
782 1 DNA de cada espécie) (Zwick et al., 1997) para evitar competição da sonda com alvos inespecíficos.  
783 As sondas foram precipitadas com etanol absoluto puro (100%), secas em estufa a 37 °C por 15 min  
784 e ressuspendidas em mix de hibridização (50% de formamida + 2xSSC + SDS 10% + sulfato dextrano  
785 10% e solução Denhardt's, pH 7). A proporção sonda vs. C<sub>0</sub>t-1 DNA baseou-se em experimentos  
786 realizados para o desenvolvimento deste trabalho como descrito em Oliveira et al., (2021). Os  
787 experimentos de hibridização ocorreram de acordo com Symonová et al., (2015) e com Sember et al.,  
788 (2018).

### 789 **5.2.7. Microdissecção Cromossômica**

#### 790 **5.2.7.1. Seleção dos Cromossomos**

791 Selecionamos o cromossomo 1 de *A. mississippiensis* (AMI 1), cromossomo 1 de *C. siamensis*  
792 (CSIA 1) e cromossomos 1, 4 e 19 de *O. tetraspis* (OST-1; OST-4 e OST-19, respectivamente) para  
793 serem microdissectados e utilizados como sondas em experimentos de pintura cromossômica total

794 (WCP). A seleção destes cromossomos em especial deveu-se a escolha na utilização de pelo menos  
795 um representante dos cariótipos mais distintos morfologicamente ( $2n$  e NF) da Ordem Crocodylia e  
796 que poderiam estar provavelmente envolvidos em rearranjos cromossômicos. Assim, ~12 cópias de  
797 cada cromossomo foram microdissectadas no laboratório Molekulare Zytogenetik  
798 (Universitätsklinikum Jena – Alemanha) chefiado pelo Dr. Thomas Liehr, seguindo o protocolo de  
799 Kosyakova et al. (2017) com modificações.

#### 800 5.2.7.2. *Preparação do Material de Microdissecção*

801 As agulhas de vidro utilizadas na microdissecção foram preparadas em um *puller* PB-7  
802 (Narishige, Japão) a partir de bastões de vidro com diâmetro de 2mm (Schott, Alemanha) e expostas  
803 à radiação ultravioleta para esterilização por 30 minutos. Na preparação das micropipetas, foram  
804 utilizadas pipetas do tipo Pasteur 250 mm (Assistant, Alemanha) siliconizadas em  
805 dimetildiclorosilano 1% no mesmo *puller* e posteriormente incubadas em estufa a 100 °C por 30  
806 minutos.

#### 807 5.2.7.3. *Processo de Microdissecção*

808 Os cromossomos foram microdissectados a partir de duas gotas de suspensão cromossômica em  
809 cada lamínula das espécies *A. mississippiensis*, *C. siamensis* e *Osteolaemus tetraspis*, coradas com  
810 Giemsa 2,5% por 8 minutos. Para realizar o procedimento foi utilizado um microscópio invertido  
811 Axiovert 135, um micromanipulador mecânico (ambos, Zeiss, Alemanha) e uma agulha estéril usados  
812 para remover os cromossomos coletados e transferi-los para uma micropipeta com solução de  
813 incubação (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 + 10 mM NaCl + SDS 0,1% + 1mM EDTA, pH 7,5 + Triton X-  
814 100 1% + 1.44 mg/ml de Proteinase K e 30% de glicerol) e incubação em câmara úmida por 1h a 60  
815 °C.

#### 816 5.2.7.4. *Síntese de sondas por DOP-PCR*

817 Para a realização da amplificação, os cromossomos microdissectados foram inseridos em uma  
818 solução de 100 µM de dNTPs + 5mM de DOP GMW (5' -CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG- 3')  
819 + Tampão Sequenase (24 mM Tris HCl, pH 7,5 + 12 mM MgCl<sub>2</sub> e 30 mM NaCl) e o processo ocorreu  
820 em um termociclador (Axygen Therm-1000) seguindo o protocolo de Kosyakova et al. (2017). Para  
821 iniciar a amplificação usamos a DNA Polimerase T7 (USB, EUA) no ciclo (90 °C por 1 min; 25 °C  
822 por 2 min; 34 °C por 2 min) repetido por 7 vezes, desnaturação por 5 minutos a 92 °C e adição de 0,3  
823 U de Sequenase durante o reanelamento em cada ciclo e para finalizar adicionou-se 50 µl de um mix

824 contendo *Taq* Polimerase (0,1 U *Taq* Polimerase + 0.2 mM dNTPs + 20 µM primer DOP + 25 mM  
825 MgCl<sub>2</sub> + 34.23 µl H<sub>2</sub>O) com um novo ciclo (92 °C por 1 min, 56 °C por 2 minutos, 72 °C por 2  
826 minutos), seguido de extensão final a 72 °C por 5 minutos. As sondas foram marcadas com Spectrum  
827 Orange-dUTP e Spectrum Green-dUTP (Vysis, Downers Grove, EUA) em uma DOP-PCR  
828 secundária (*Degenerate Oligonucleotide-Primed Polymerase Chain Reaction*) usando como DNA  
829 molde, 1 µl do produto primário amplificado de acordo com Kosyakova et al. (2017) e os  
830 experimentos de pintura cromossômica entre espécies (também conhecido como ZOO-FISH) foi  
831 realizado seguindo Yano et al. (2017).

### 832 **5.2.8. Reconstrução do estado ancestral**

833 O número diploide ancestral da família Crocodylidae incluindo os grupos externos  
834 (Gavialidae e Alligatoridae) foi reconstruído com máxima parcimônia (Fitch, 1971; Dobigny et al.,  
835 2004) usando o Mesquite v.3.51 (Maddison & Maddison, 2018). A filogenia dos crocódilios e o  
836 tempo de divergência foram adaptados do trabalho de Oaks (2011) e Colston et al. (2020). *Crocodylus*  
837 *halli* foi adicionado manualmente e sua posição na árvore ainda precisa ser definida. Dados  
838 cromossômicos foram obtidos de Cohen & Gans (1970), Kawagoshi et al. (2008), Hekkala et al.  
839 (2011), Srikulnath et al. (2015), Oliveira et al. (2021), Olmo & Signorino (2022) e neste estudo.

## 6. CAPÍTULOS

Os resultados obtidos no desenvolvimento da presente tese são apresentados a seguir, no formato de capítulos, assim como suas respectivas discussões.

**Capítulo 1** – Revisitando os cariótipos de Aligátors e Jacarés (Crocodylia, Alligatoridae) depois de meio século: Preenchendo uma lacuna na evolução dos Répteis.

Oliveira, V.C.S.; Altmanová, M.; Viana, P.F.; Ezaz, T.; Bertollo, L.A.C.; Ráb, P.; Liehr, T.; Al-Rikabi, A.; Feldberg, E.; Hatanaka, T.; Scholz, S.; Meurer, A.; Cioffi, M. B. Revisiting the karyotypes of Alligators and Caimans (Crocodylia, Alligatoridae) after a Half-century delay: Bridging the gap in the chromosomal Evolution of Reptiles. *Cells*, 10: 1397. doi: 10.3390/cells10061397.

**Capítulo 2** – Pintura cromossômica e mapeamento de DNA repetitivo ilumina a evolução cariotípica em Crocodilos (Crocodylidae).

Sales-Oliveira, V.; Altmanová, M.; Gvoždík, V.; Kretschmer, R.; Ezaz, T.; Liehr, T.; Padutsch, N.; Badjedjea, G.; Utsunomia, R.; Tanomtong, A.; Cioffi, M. Cross-species chromosome painting and repetitive DNA mapping illuminate the karyotype evolution in true crocodiles (Crocodylidae). *Chromosoma*, doi: 10.1007/s00412-023-00806-6.

840 **6.1.CAPÍTULO 1**

841

842 **Revisitando os cariótipos de Aligátors e Jacarés (Crocodylia, Alligatoridae)**  
843 **depois de meio século: Preenchendo uma lacuna na evolução dos Répteis.**

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

## 861 **Introdução**

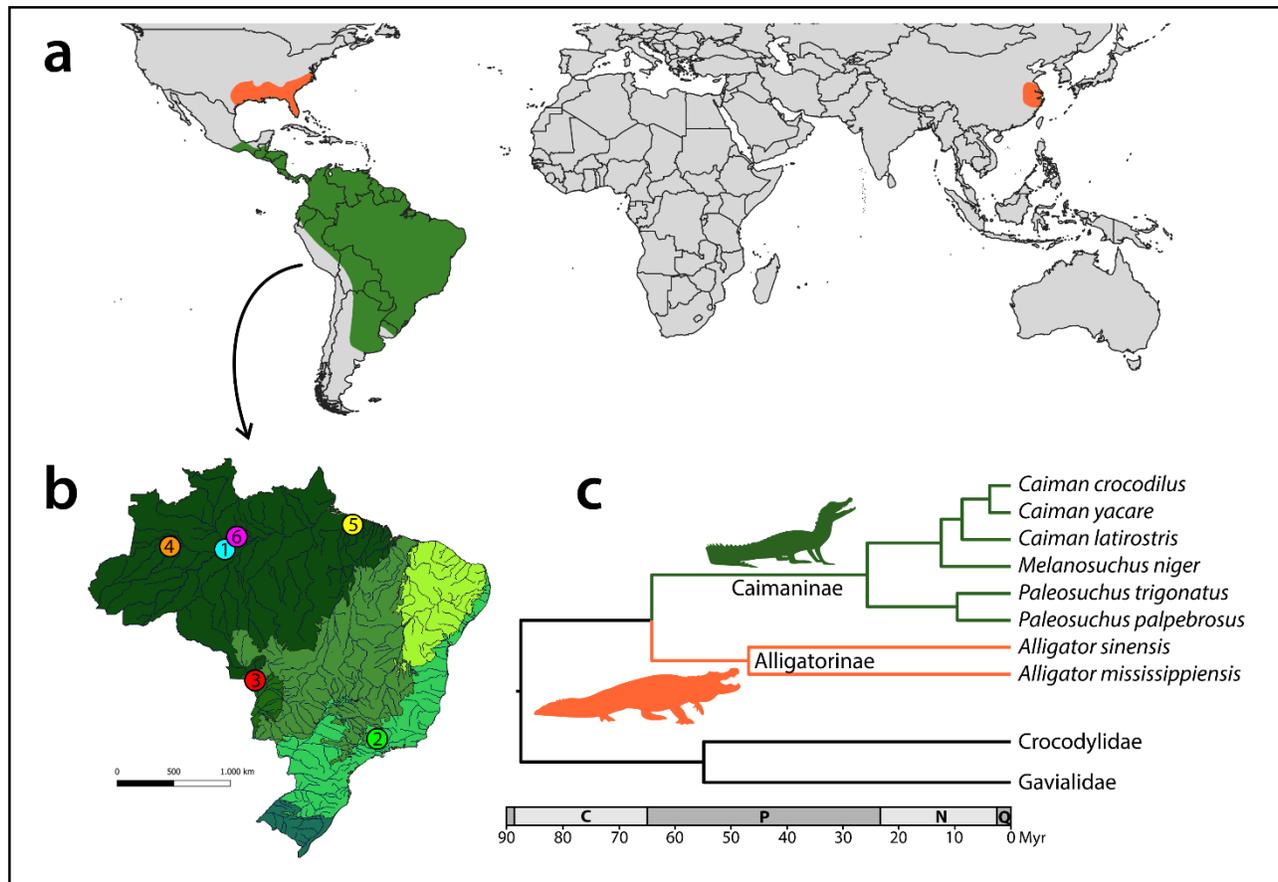
862 Diferentemente de outros vertebrados que passaram por mudanças substanciais, as espécies  
863 atuais de crocodilianos vêm mantendo similaridades morfológicas e ecológicas por quase 100  
864 Milhões de anos (M.a) (Grigg et al., 2001; Brochu, 2003; Bronzati et al., 2015; Stubbs et al., 2021).  
865 Crocodilianos em conjunto com dinossauros, pterossauros e aves formam um clado monofilético  
866 conhecido como Arcossauros, que são representados atualmente pelas aves e répteis não-aviários.  
867 Essa premissa é suportada por dados moleculares filogenéticos que indicam que aves e crocodilianos  
868 formam um grupo monofilético (Janke & Arnason, 1997; Iwabe et al., 2005; Green et al., 2014; Pan  
869 et al., 2021).

870 A ordem Crocodylia é um modelo muito útil para utilização em estudos biogeográficos, pois  
871 suas espécies demonstram uma distribuição circumtropical com pelo menos um representante em  
872 cada continente, exceto pela Europa e Antártica (Espinosa et al., 1998; Rueda-Almonacid et al.,  
873 2007). Tal distribuição circum-oceânica combinada com sua antiguidade e posição filogenética  
874 distinta, faz dos crocodilianos um modelo atrativo para entender características evolutivas e  
875 biogeográficas, principalmente pelo fato de demonstrarem eventos de dispersão de várias linhagens  
876 de vertebrados. Apesar de dados sobre sua biogeografia ainda serem um mistério, alguns estudos  
877 recentes propõem uma travessia transatlântica recente, da África para o Novo Mundo e do Indo  
878 Pacífico para o Novo Mundo como provavelmente ocorreu com algumas espécies de crocodilo  
879 (Stubbs et al., 2021; Meredith et al., 2011; Oaks, 2011).

880 Crocodylia divide-se em três famílias (**Figura 3**): Crocodylidae, Gavialidae e Alligatoridae,  
881 e a quantidade de espécies varia entre 23 e 27 (Brochu, 2003; McAliley et al., 2006; Martin, 2008;  
882 Hekkala et al., 2011; Shirley et al., 2014; Srikulnath et al., 2015; Barreiros, 2016; Muniz et al., 2019;  
883 Uetz et al., 2020). Crocodylidae é representado por três gêneros, *Crocodylus*, *Mecistops* e  
884 *Osteolaemus*, composto por 16 espécies (Martin, 2008; Hekkala et al., 2011; Shirley et al., 2014;  
885 Srikulnath et al., 2015; Barreiros, 2016; Muniz et al., 2019; Uetz et al., 2020; Nicolai & Matzke,  
886 2019) – potencialmente chegando a 17, dependendo de uma revisão taxonômica formal e validação  
887 de espécies (Hekkala et al., 2011; Shirley et al., 2014; Nicolai & Matzke, 2019; Shirley et al., 2018).  
888 Essa família está distribuída na Ásia, Austrália, África e América (Meredith et al., 2011). Gavialidae  
889 possui somente uma espécie, o gavial, *Gavialis gangeticus*, nativo do Nepal e da Índia (Bezuijen et  
890 al., 2014; Lee & Yates, 2018). Entretanto, a posição filogenética do falso gavial, *Tomistoma*

891 *schlegelii*, uma espécie distribuída no sul da Ásia continua sob debate, apesar de análises moleculares  
892 colocarem *Tomistoma* em Gavialidae (Pan et al., 2021; Oaks, 2011). A terceira e última família  
893 Alligatoridae, possui oito espécies distribuídas em quatro gêneros: *Alligator* que forma a  
894 monogenérica subfamília Alligatorinae, *Melanosuchus*, *Paleosuchus* e *Caiman* pertencentes a  
895 Caimaninae (Uetz et al., 2020; Pan et al., 2021) [mas, veja Muniz et al., 2019; Bittencourt et al., 2019,  
896 que sugerem a existência de outras espécies crípticas]. Exceto por *Alligator*, onde *A. mississippiensis*  
897 e *A. sinensis* estão restritos ao sudoeste dos Estados Unidos e da China, respectivamente, a  
898 distribuição das espécies de Caimaninae varia do México a América do Sul, sendo especialmente  
899 espalhados pelo Brasil (Brochu, 2003; Oaks, 2011). Contudo, *Caiman crocodilus*, por exemplo, foi  
900 introduzido em outras regiões como Porto Rico, Cuba e Flórida (Balaguera-Reina & Velasco, 2019).  
901 *A. sinensis* representa uma das espécies de crocodilianos mais ameaçada de extinção, listada no  
902 CITES apêndice I, na categoria de “criticamente em perigo” pela União Internacional para a  
903 Conservação da Natureza (IUCN). A pesquisa mais recente, realizada em 2015 indicou que a  
904 população selvagem estava estimada em 136-173 indivíduos (32 adultos) concentrados em uma  
905 pequena região ao sudeste da província de Anhui (Jiang & Wu, 2018) – apenas uma fração de sua  
906 antiga distribuição (Thorbjarnason et al., 2002).

907 Répteis demonstram uma grande diversidade em número diploide ( $2n$ ) e em morfologia  
908 cariotípica, com várias combinações de macro e microcromossomos, assim como sistemas de  
909 determinação sexual (Olmo, 2008; Deakin & Ezaz, 2019; Straková et al., 2020). Técnicas de  
910 citogenética molecular vem sendo amplamente aplicadas, fornecendo uma melhor compreensão sobre  
911 sua evolução cromossômica (revisado em Deakin & Ezaz, 2019). De maneira adicional aos  
912 experimentos de mapeamento de sequências repetitivas e de Pintura Cromossômica Completa  
913 (WCP), a utilização recente da Hibridização Genômica Comparativa (CGH) tem permitido a  
914 comparação do grau de similaridade genômica a nível de conteúdo de DNA repetitivo entre espécies  
915 relacionadas filogeneticamente (Ezaz et al., 2005; Ezaz et al., 2006; Kawai et al., 2007; Martinez et  
916 al., 2008; Badenhorst et al., 2013; Koubová et al., 2014; Matsubara et al., 2014; Montiel et al., 2016;  
917 Viana et al., 2019; Viana et al., 2020). Entretanto, dados citogenéticos em Crocodylia são usualmente  
918 restritos a descrição do  $2n$ , composição cariotípica e a alguns bandeamentos convencionais (Cohen  
919 & Clark, 1967; Cohen & Gans, 1970; King et al., 1986; Lui et al., 1994), apenas alguns autores  
920 usaram ferramentas citogenéticas moleculares (King et al., 1986; Valleley et al., 1994; Kawagoshi et  
921 al., 2008; Uno et al., 2012; Kasai et al., 2012; Oliveira et al., 2021).



922

923 **Figura 3** – Distribuição recente (a), pontos de amostragem (b) e relações filogenéticas (c) das espécies de  
 924 Alligatoridae. Mapa do Brasil com destaque para os pontos de coleta (círculos coloridos) das espécies de  
 925 Caimaninae analisadas no presente trabalho: 1. *Caiman crocodilus* (círculo em azul); 2. *Caiman latirostris*  
 926 (círculo verde); 3. *Cayman yacare* (círculo vermelho); 4. *Melanosuchus niger* (círculo laranja); 5. *Paleosuchus*  
 927 *palpebrosus* (círculo amarelo); 6. *Paleosuchus trigonatus* (círculo rosa). O mapa foi criado usando os softwares  
 928 QGis 3.4.3 e Adobe Photoshop CC 2020. Árvore filogenética datada adaptada para a Ordem Crocodylia, com  
 929 foco em Alligatoridae, baseado em dados gerados por Oaks (2011), para uma datação alternativa ver Pan  
 930 (2021). C- Cretáceo, P – Paleogeno, N – Neogeno, Q – Quaternário e M.a – Milhões de anos atrás.

931

932 O número diploide em crocodilianos varia de 30 a 42 e tem uma correlação positiva com o  
 933 número de cromossomos acrocêntricos em seu complemento. A baixa variedade no número de braços  
 934 cromossômicos, NF = 56-60/62 (NF, *nombre fundamental*), sugere que os cariótipos evoluíram em  
 935 sua maioria por fissão/fusão cromossômica (Srikulnath et al., 2015; Cohen & Gans, 1970; Olmo &  
 936 Signorino, 2020). Sua estrutura cariotípica, contudo, não apresenta microcromossomos. Este padrão  
 937 contrasta com o padrão encontrado em aves e tartarugas, uma vez que seus cariótipos possuem, com  
 938 algumas exceções, 50 cromossomos, no mínimo, incluindo alguns macrocromossomos e vários

939 microcromossomos indistinguíveis entre si (Deakin & Ezaz, 2019; Montiel et al., 2016; Olmo &  
940 Signorino, 2020; Degrandi et al., 2020

941 Adicionalmente, o padrão de banda G é bastante conservado em *Crocodylia*, demonstrando  
942 um padrão similar entre os cromossomos de *Crocodylus porosus*, *Crocodylus johnstoni* e *Caiman*  
943 *crocodilus* (King et al., 1986), apontando para uma estrutura de replicação cromossômica geralmente  
944 conservada sem uma aparente reorganização inter- ou intracromossômica entre as espécies. Outra  
945 característica crocodiliana notável é de que todos os seus membros compartilham a determinação  
946 sexual através do ambiente (ESD). O efeito da temperatura da incubação na razão sexual da ninhada  
947 foi observado amplamente e por outro lado, cromossomos sexuais não foram identificados em  
948 nenhuma das espécies estudadas citogeneticamente (Kawai et al., 2007; Cohen & Gans, 1970;  
949 Amavet et al., 2003; Valenzuela, 2004; González et al., 2019).

950 Portanto, baseado principalmente em métodos convencionais, a citogenética de *Crocodylia*  
951 ainda representa uma peça faltante no entendimento dos padrões de evolução cromossômica em  
952 répteis. Para preencher essa lacuna, nós analisamos a organização cariotípica de todas as espécies  
953 reconhecidas taxonomicamente de *Alligatoridae* através de técnicas diferenciais de coloração  
954 convencional e citogenética molecular, a saber, mapeamento cromossômico de sequências de DNA  
955 repetitivos, WCP e CGH. Os resultados foram comparados e discutidos com dados previamente  
956 publicados. Este estudo é parte de uma série de estudos sobre citogenética e citogenômica em  
957 crocodilianos.

## 958 **Material e Métodos**

959 Neste estudo utilizamos 51 animais das diferentes espécies da família *Alligatoridae*, conforme  
960 está descrito na **Tabela 3**.

961 **Tabela 3.** Espécies, tamanho da amostra (N), sexo, localidade e coordenadas geográficas dos pontos de coleta dos  
962 indivíduos analisados.

<b>Espécies</b>	<b>N</b>	<b>Localidade</b>	<b>Origem das Amostras</b>
<i>C. crocodilus</i> (Jacaretinga)	02♀, 02♂	Amazonas (BR) (Bacia Amazônica)	3°22'34.7" S 60°19'20.7" W
<i>C. latirostris</i> (Jacaré-do-papo-amarelo)	04♀, 06♂	São Paulo (BR) (Cerrado)	22°33'53.1" S 48°00'35.2" W
<i>C. yacare</i> (Jacaré-do-pantanal)	02♀, 08♂	Mato Grosso (BR) (Pantanal)	16°19'32.0" S 57°46'35.7" W

<i>M. niger</i> (Jacaré-açu)	02♀, 02♂	Amazonas (BR) (Bacia Amazônica)	3°25'50.4" S 66°02'35.0" W
<i>P. palpebrosus</i> (Jacarepaguá)	03♀, 03♂	Pará (BR) (Bacia Amazônica)	1°18'19.7" S 48°19'05.0" W
<i>P. trigonatus</i> (Jacaré-coroa)	03♀, 04♂	Amazonas (BR) (Bacia Amazônica)	3°06'52.0" S 60°01'58.0" W
<i>A. mississippiensis</i> (Jacaré-norte-americano)	02♀, 02♂	Coleção da Universidade de Canberra (Austrália)	
<i>A. sinensis</i> (Jacaré-chinês)	04♀, 01♂, 01 não identificado	Coleções Particulares (Alemanha)	

963

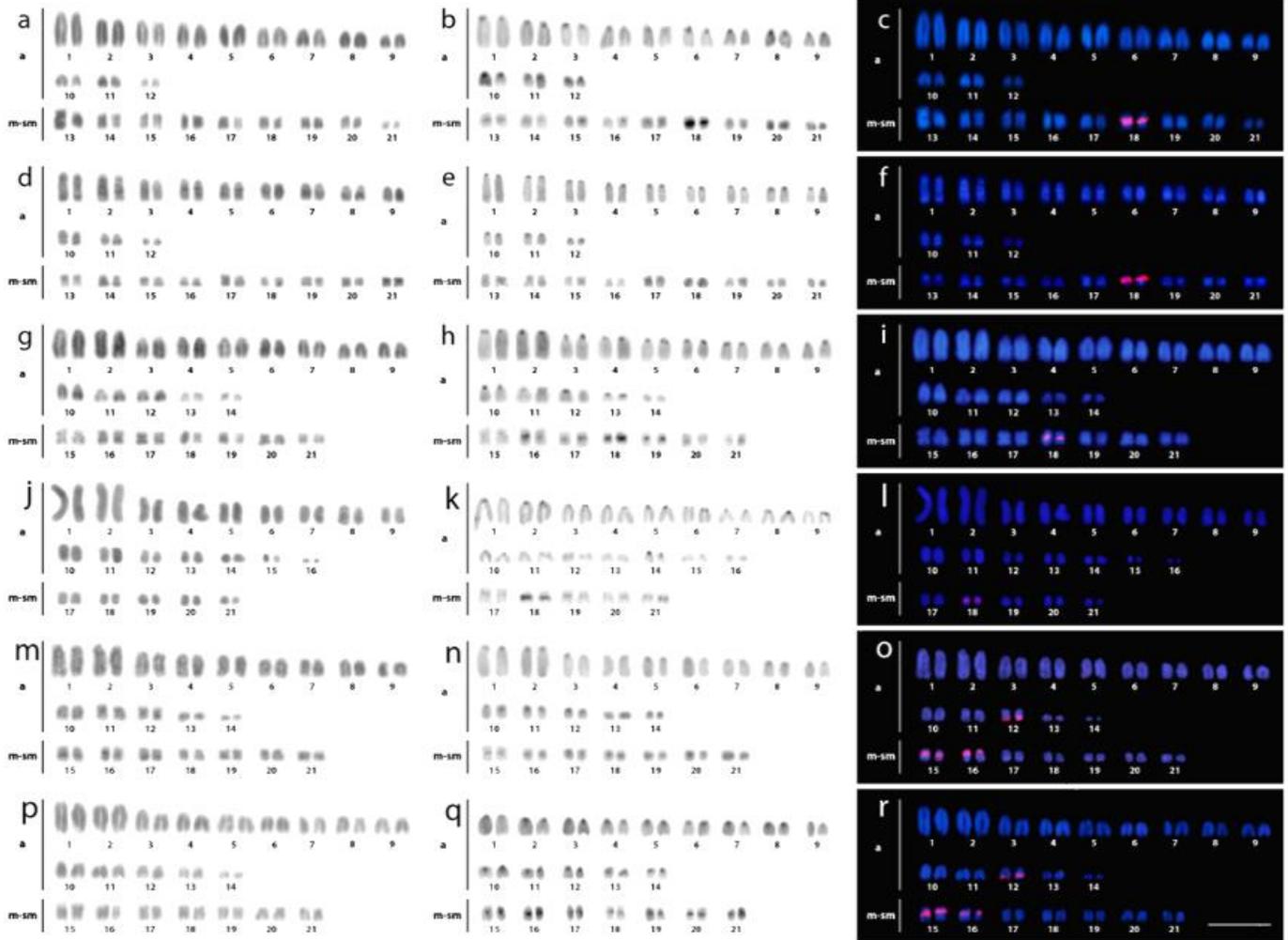
964 As análises metodológicas utilizadas neste estudo (obtenção de material cromossômico,  
965 técnicas convencionais e moleculares, mapeamento de sequências e microdissecção) estão todas  
966 descritas detalhadamente na seção Material e Métodos desta tese, descrita anteriormente.

## 967 **Resultados**

### 968 **Cariótipos, Bandeamento C e coloração com Cromomicina A<sub>3</sub>**

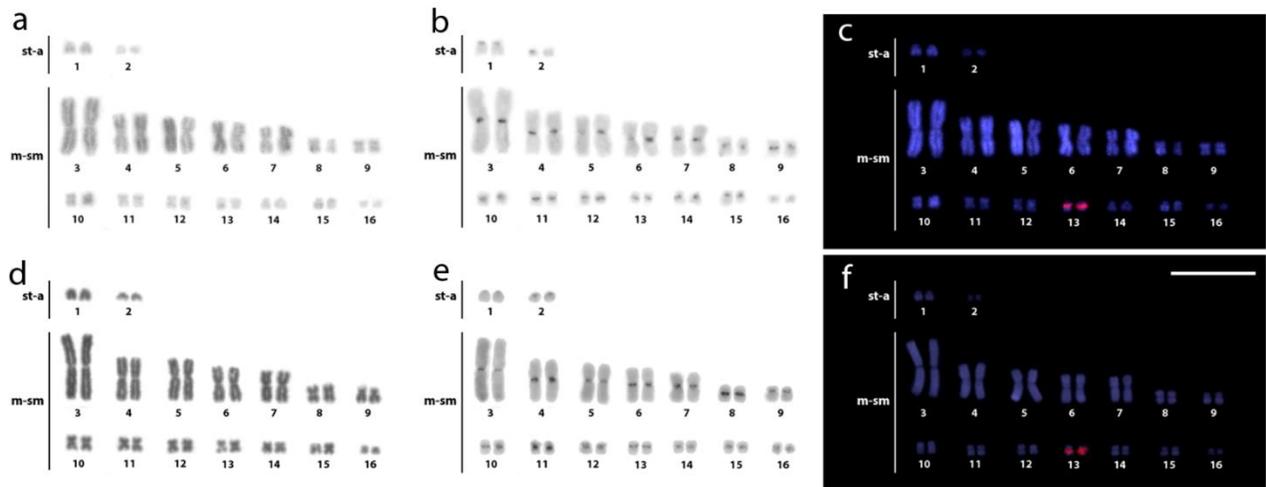
969 O  $2n$  de todas as espécies pertencentes a Caimaninae é de 42 cromossomos para ambos os  
970 sexos. Seus cariótipos são compostos de 24a + 18m/sm em *C. crocodilus* e em *C. latirostris*, 28a +  
971 14m/sm em *C. yacare*, *P. palpebrosus* e em *P. trigonatus* e 32a + 10m/sm em *M. niger*. Já os  
972 aligátors *A. mississippiensis* e *A. sinensis* apresentam  $2n = 32$  e a mesma fórmula cariotípica 4a +  
973 28m/sm. Não foram observadas variabilidade cromossômica intraindividuais, nem entre machos e  
974 fêmeas, indicando assim a ausência de cromossomos sexuais heteromórficos.

975 Por esta razão, estes dados ampliam e consolidam informações prévias para estas espécies  
976 (Cohen & Clark, 1967; Cohen & Gans, 1970; King et al., 1986; Lui et al., 1994; Oliveira et al., 2021;  
977 Amavet et al., 2003; Matthey & van Brink, 1957; Ohno, 1967; Beçak & Beçak, 1971; Olmo, 1986;  
978 Amavet et al., 2000). Bandas heterocromáticas C-positivas foram detectadas em regiões  
979 centroméricas de praticamente todos os cromossomos, com bandas mais proeminentes nos pares  
980 cromossômicos que carregam o DNAr (**Figuras 4 e 5**). Bandas CMA3+ foram observadas nas regiões  
981 centroméricas de quase todos os cromossomos, com sinais conspícuos nos menores cromossomos do  
982 complemento (**Figura 6**).



983

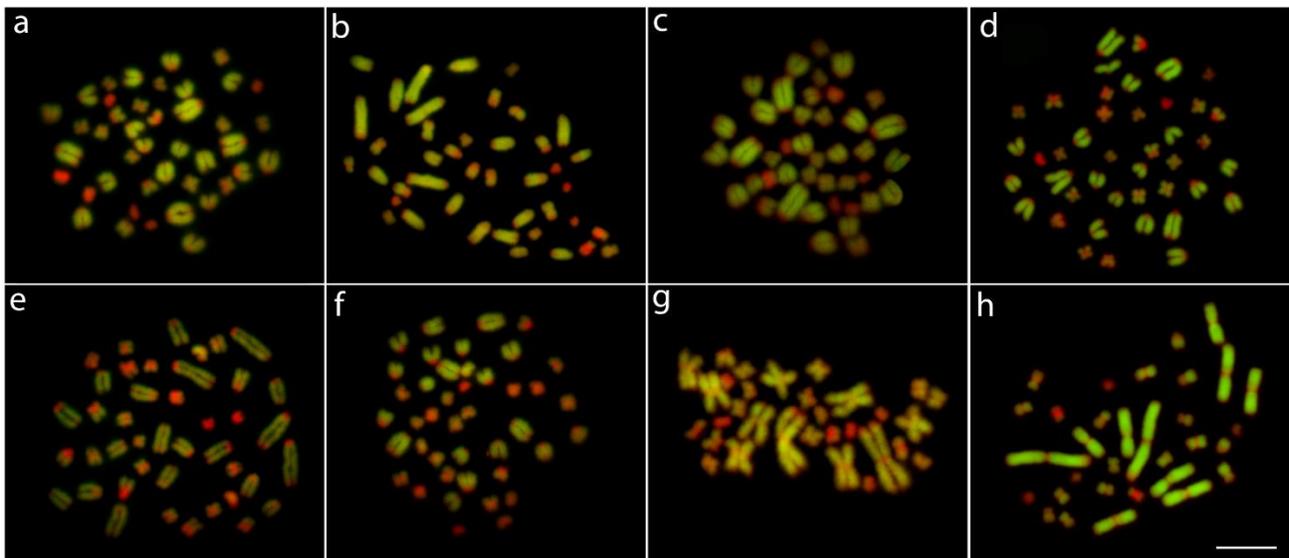
984 **Figura 4.** Cariótipos de fêmeas de *Caiman crocodilus* (a-c), *C. latirostris* (d-f), *C. yacare* (g-i), *Melanosuchus niger* (j-  
 985 l), *Paleosuchus palpebrosus* (m-o) e *P. trigonatus* (p-r) após coloração com Giemsa (a, d, g, j, m, p), bandeamento C (b,  
 986 e, h, k, n, q) e FISH com sonda de DNAr 18S (em vermelho) (c, f, i, l, o, r). Barra = 20µm.  
 987



988

989 **Figura 5.** Cariótipos de fêmeas de *Alligator mississippiensis* (a-c) e *A. sinensis* (d-f) após coloração com Giemsa (a, d)  
 990 bandeamento C (b, e) e FISH com sonda de DNAr 18S (em vermelho) (c, f). Barra = 20µm.

991



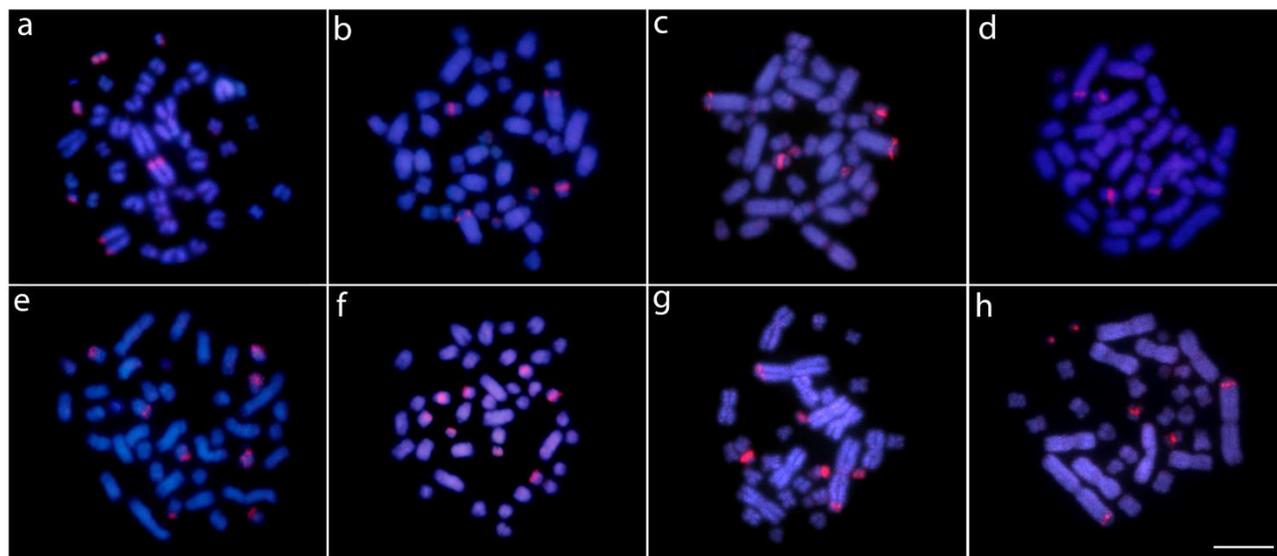
992

993 **Figura 6.** Cromossomos metafásicos de fêmeas de *Caiman crocodilus* (a), *C. latirostris* (b), *C. yacare* (c), *Melanosuchus*  
 994 *niger* (d), *Paleosuchus palpebrosus* (e), *P. trigonatus* (f), *Alligator mississippiensis* (g) e *A. sinensis* (h) após bandeamento  
 995 com CMA3/DAPI (regiões ricas em GC e AT pseudocoloridas em vermelho e verde, respectivamente). Barra = 20µm.

996

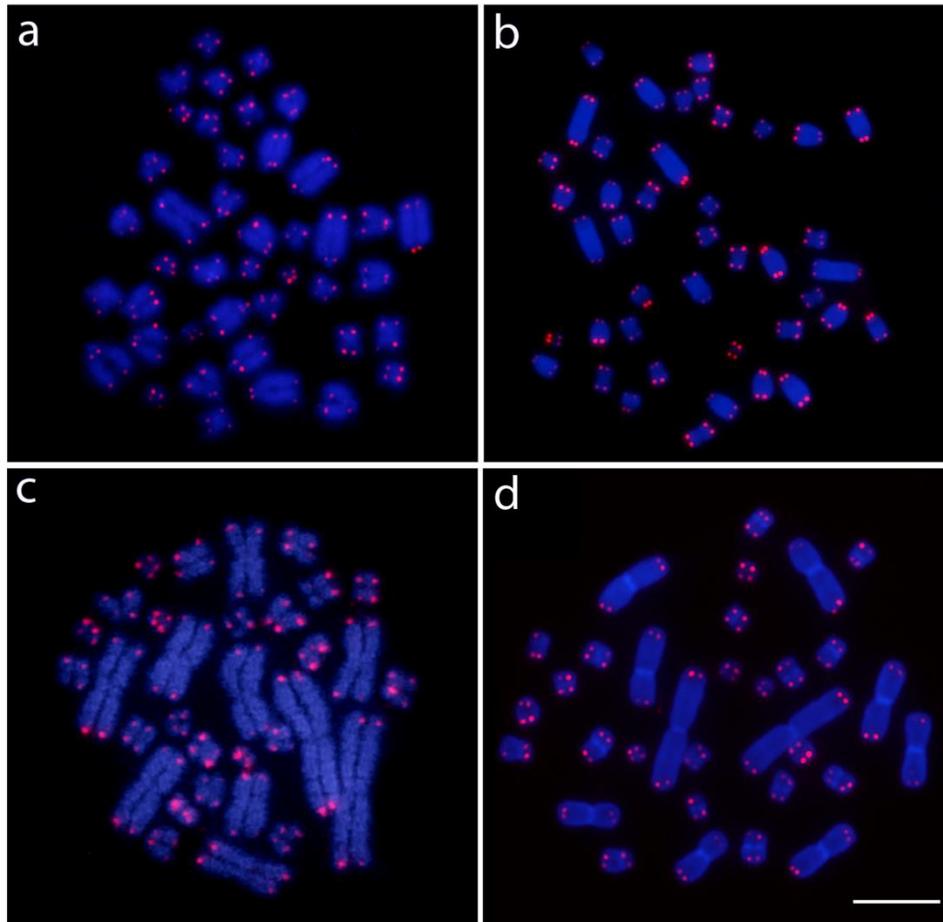
997 **Mapeamento de sequências repetitivas com Hibridização Fluorescente In Situ (FISH)**

998 Dois padrões distintos de distribuição de sítios de DNAr 18S foram observados. Em todas as  
999 três espécies de *Caiman*, em *M. niger*, e nas duas espécies de *Alligator* estes sítios estão localizados  
1000 apenas na região centromérica do par 18. Entretanto, nos cariótipos de ambas as espécies de  
1001 *Paleosuchus* seis cromossomos exibem sítios de DNAr 18S (**Figuras 4 e 5**). Para o microssatélite  
1002 (CGG)<sub>10</sub>, todas as espécies apresentaram sinais de hibridização, entre quatro e oito cromossomos  
1003 demonstraram conter estes motivos. Adicionalmente aos sinais apresentados em quatro dos menores  
1004 pares de cromossomos (apenas 2 em *Melanosuchus*), todas as espécies compartilham um sinal na  
1005 posição terminal do maior par cromossômico, com exceção para as espécies de *Paleosuchus* onde  
1006 não foi observado a hibridização desses motivos nestes sítios em particular, mas com sinais presentes  
1007 em outros quatro pares cromossômicos (**Figura 7**). Foi realizada FISH utilizando sonda telomérica  
1008 (TTAGGG)<sub>n</sub> em quatro espécies: *C. latirostris*, *P. palpebrosus*, *A. mississippiensis* e *A. sinensis*, com  
1009 sinais de hibridização na região telomérica de todos os cromossomos, sem sítios intersticiais  
1010 teloméricos (ITS) (**Figura 8**).



1011

1012 **Figura 7.** Cromossomos metafásicos de fêmeas de *Caiman crocodilus* (**a**), *C. latirostris* (**b**), *C. yacare* (**c**), *Melanosuchus*  
1013 *niger* (**d**), *Paleosuchus palpebrosus* (**e**), *P. trigonatus* (**f**), *Alligator mississippiensis* (**g**) e *A. sinensis* (**h**) hibridizadas com  
1014 sonda de microssatélite (CGG)<sub>10</sub> (vermelho). Cromossomos estão contracorados com DAPI (azul). Barra = 20µm.

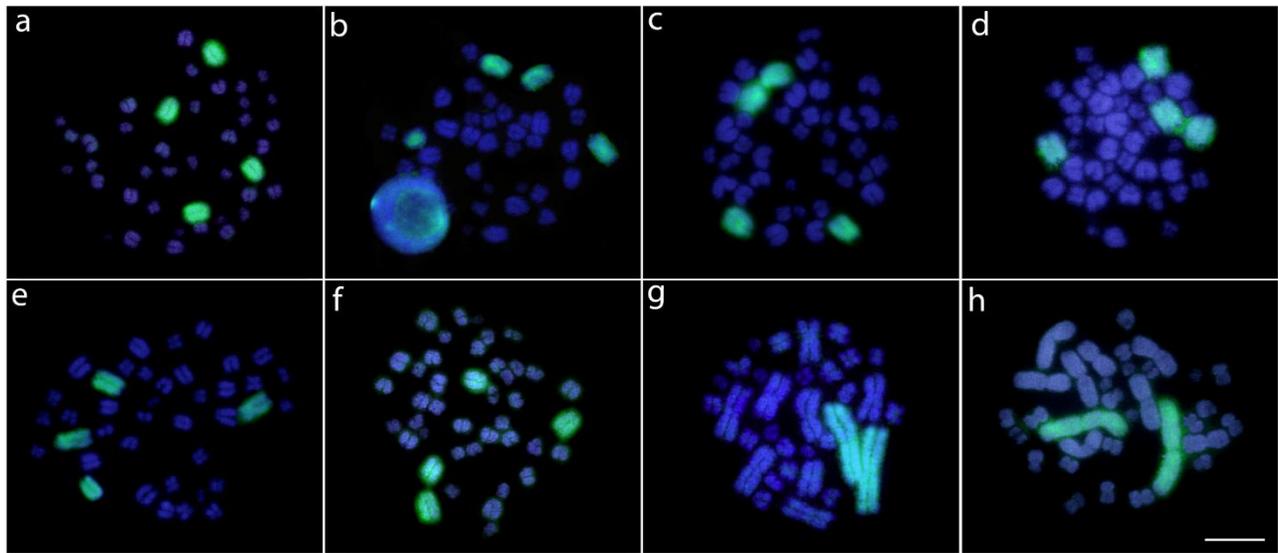


1015

1016 **Figura 8.** Placas metafásicas de fêmeas de *C. latirostris* (a), *P. palpebrosus* (b), *A. mississippiensis* (c) e *A. sinensis* (d)  
 1017 com sonda telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> (vermelho). Barra = 5µm.

1018 **Pintura Cromossômica (WCP) com sonda AMI-1**

1019 A sonda AMI-1 quando aplicada contra as metáfases de *A. mississippiensis* e *A. sinensis*,  
 1020 pintaram completamente o maior par cromossômico do complemento. Por outro lado, a hibridização  
 1021 nas espécies de Caimaninae ocorreram em dois pares cromossômicos acrocêntricos (**Figura 9**).



1022

1023 **Figura 9.** Experimentos de Zoo-FISH utilizando a sonda AMI-1 (verde) contra placas metafásicas de *Caiman crocodilus*  
 1024 (a), *C. latirostris* (b), *C. yacare* (c), *Melanosuchus niger* (d), *Paleosuchus palpebrosus* (e), *P. trigonatus* (f), *Alligator*  
 1025 *mississippiensis* (g) e *A. sinensis* (h). Cromossomos estão contracolorados com DAPI (azul). Barra = 20µm.  
 1026

1027

### Hibridização Genômica Comparativa (CGH)

1028

1029

1030

1031

1032

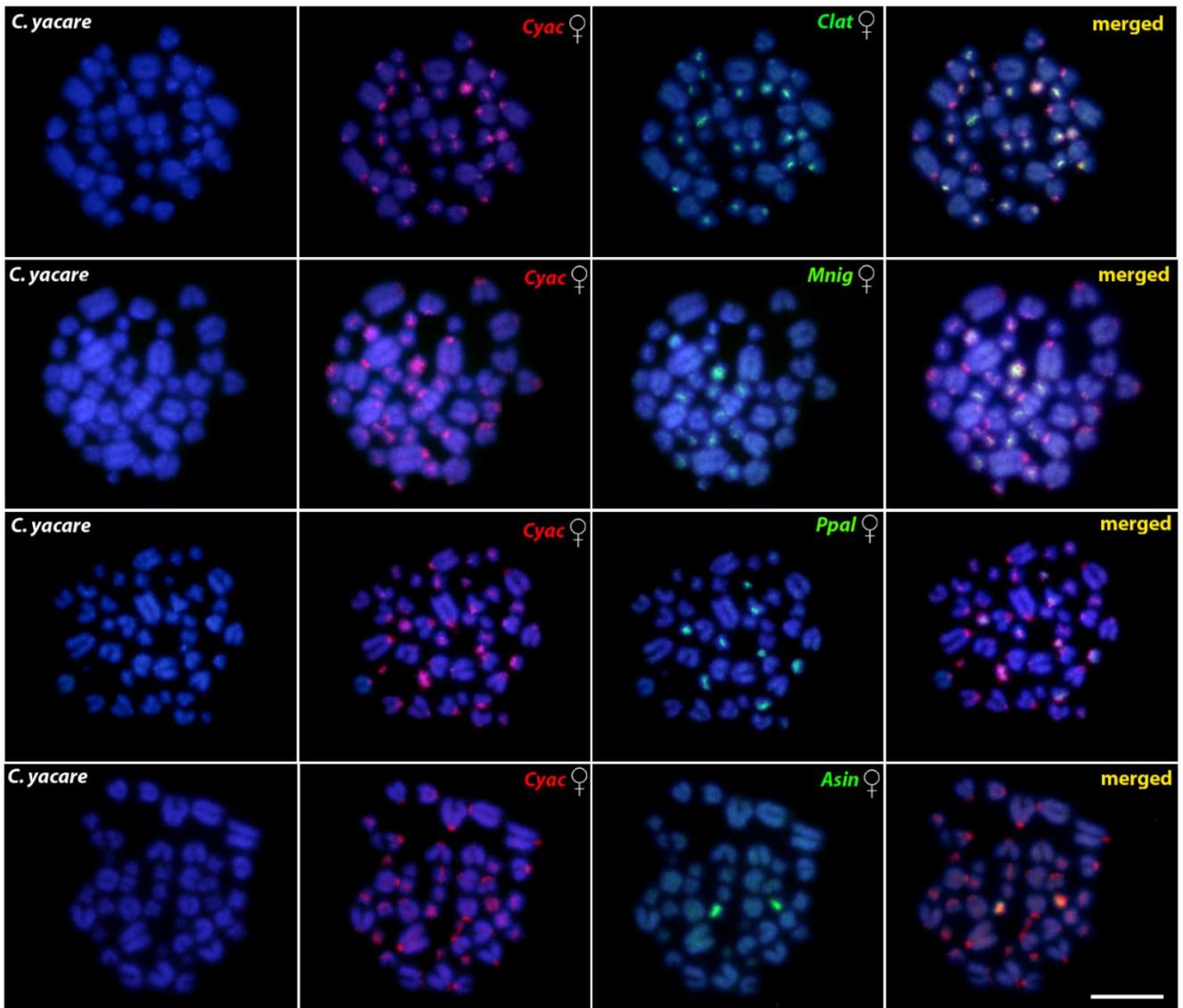
1033

1034

1035

1036

O DNA genômico total (DNAg) de *C. yacare* hibridizado contra o seu próprio complemento cromossômico, realçou abundantes blocos heterocromáticos na região centromérica da maior parte de seus cromossomos. Os experimentos de CGH usando sondas de DNAg provenientes de *C. latirostris* e *M. niger* nos cromossomos de *C. yacare* demonstraram que vários sinais se sobrepuseram na região do centrômero, indicando que o centrômero destas espécies é enriquecido em sequências repetitivas similares, apesar de *M. niger* possuir quantidades menores e/ou com repetições diferentes. Contudo, *P. palpebrosus* e *A. sinensis* compartilham um pouco de conteúdo repetitivo com *C. yacare*, restrito praticamente aos pares portadores do DNAr 18S, indicando um alto grau de diferenciação da sequência centromérica (**Figura 10**).



1037

1038 **Figura 10.** Cromossomos metafásicos de fêmeas de *C. yacare* após hibridizações interespecíficas de CGH. Primeira  
 1039 coluna: imagens em DAPI (azul). Segunda coluna: padrão de hibridização da sonda de *C. yacare* (vermelho). Terceira  
 1040 coluna: padrão de hibridização da sonda de cada espécie analisada (verde). Quarta coluna: imagens sobrepostas das duas  
 1041 sondas genômicas e da coloração em DAPI. As regiões genômicas em comum aparecem em amarelo. Clat = *C. latirostris*,  
 1042 Cyac = *C. yacare*, Mnig = *M. niger*, Ppal = *P. palpebrosus* e Asin = *A. sinensis*. Barra = 10µm.

1043 **Discussão**

1044 A história evolutiva de répteis não-aviários (tartarugas, crocodilianos e escamados) levou a  
1045 uma acentuada assimetria de riqueza de espécies entre os grupos – de 11.341 espécies atualmente  
1046 descritas, apenas aproximadamente 26 são crocodilianos (0.23%) (Uetz et al., 2020). Como o grupo  
1047 dos crocodylomorfos habita a Terra por mais de 100 milhões de anos e apresenta diferentes adaptações  
1048 a habitats e alimentares, a pergunta mais intrigante é, por que existem tão poucas espécies de  
1049 crocodilianos atualmente? Alfaro et al. (2009), descobriram que eles diversificam 1.000 vezes mais  
1050 devagar do que o esperado. Este fator corrobora a baixa taxa de disparidade, sendo cerca de 10.000  
1051 vezes menor que outros grupos com mesma escala evolutiva de tempo, como aves e lepidossauros  
1052 (Jetz et al., 2012; Pyron et al., 2013).

1053 A baixa taxa de diversificação ao longo do tempo pode estar relacionada a evolução do  
1054 cariótipo em crocodilianos (Grigg et al., 2001; Cohen & Gans, 1970). Enquanto aves ( $2n = 40-142$ ),  
1055 tartarugas ( $2n = 28-68$ ) e escamados ( $2n = 16-62$ ) possuem elevados níveis de variabilidade no  
1056 número diploide e na morfologia cariotípica, crocodilianos exibem uma variação muito menor (Olmo,  
1057 2008; Deakin & Ezaz, 2019; Olmo & Signorino, 2020; Degrandi et al., 2020; Bista & Valenzuela,  
1058 2020; Rovatsos et al., 2017). De fato, a investigação citogenética de 23 das 26 espécies de  
1059 crocodilianos revela padrões cariotípicos generalistas, já que apresentam um baixo  $2n = 30-42$  e a  
1060 predominância de alguns grandes cromossomos, em conjunto com a ausência de microcromossomos  
1061 em seu cariótipo (Srikulnath et al., 2015). O cariótipo ancestral previsto para arcossauros e tartarugas  
1062 mostra pelo menos oito pares de macrocromossomos e vários microcromossomos indistinguíveis.  
1063 Desta forma, a linhagem crocodiliana diverge fortemente do padrão ancestral, desde que todos os  
1064 microcromossomos desapareceram por eventos de fusão entre eles (Uno et al., 2012).

1065 Enquanto o  $2n$  varia entre 30 e 34 nos representantes de Crocodylidae e Gavialidae (com  
1066 exceção para o Crocodilo-anão, com  $2n = 38$ ), duas principais vias podem ser reconhecidas na  
1067 diferenciação cromossômica em Alligatoridae: i) conservadorismo de um baixo número diploide ( $2n$   
1068 = 32) e cariótipos compostos em sua maioria por cromossomos com dois braços em *A.*  
1069 *mississippiensis* e *A. sinensis* (Cohen & Gans, 1970; este estudo) e ii) alto número cromossômico  $2n$   
1070 = 42 nas espécies de *Caiman*, *Melanosuchus* e *Paleosuchus*, com cariótipos dominado por  
1071 cromossomos acrocêntricos (Cohen & Gans, 1970; Oliveira et al., 2021; este estudo). Isto sugere que  
1072 rearranjos cromossômicos extensivos devem ter ocorrido durante a evolução cariotípica após a

1073 separação entre Alligatorinae e Caimaninae. Desde que um número diploide baixo pode ser  
1074 reconhecido como uma condição ancestral para a ordem Crocodylia (Srikulnath et al., 2015), parece  
1075 que a diversificação cariotípica do ancestral em comum de Caimaninae foi acompanhada por uma  
1076 série de eventos de fissão após a divisão de *Alligator* (~70 M.a) (Müller & Reisz, 2005), aumentando  
1077 então o  $2n$ . Os nossos resultados de Zoo-FISH suportam este cenário ao destacar a homeologia entre  
1078 o maior par cromossômico metacêntrico presente em ambas as espécies de *Alligator* com quatro  
1079 cromossomos acrocêntricos menores em todos os três gêneros de Caimaninae (**Figura 9**).

1080 A hipótese alternativa que considera  $2n = 42$  um estado plesiomórfico pode ser válida sob o  
1081 cenário em que jacarés seriam uma linhagem irmã de todos os outros crocodilianos. Entretanto, de  
1082 acordo com a atual filogenia, Alligatorinae + Caimaninae é irmã de Crocodylidae + Gavialidae e a  
1083 hipótese alternativa não é suportada nem pelo  $2n = 30-32$  amplamente distribuído nas outras linhagens  
1084 de Crocodylia, nem pelos nossos resultados de FISH utilizando sondas de DNA telomérico.  
1085 Sequências teloméricas intersticiais (ITS) podem refletir remanescentes de telômeros em neo-  
1086 cromossomos originados por fusão cromossômica de dois cromossomos ancestrais (Slijepcevic,  
1087 1998). Entretanto, em jacarés, apenas a terminologia padrão de telômeros é observada para todos os  
1088 cromossomos, sem ITS que indique prováveis pontos de fusão nos grandes metacêntricos (**Figura 8**).  
1089 Apesar de alguns crocodilianos não exibirem uma grande divergência cariotípica entre as espécies  
1090 atuais, os vários rearranjos cromossômicos, especialmente aqueles presentes nos jacarés, podem ter  
1091 tido um papel crucial na radiação das espécies. Neste contexto, não podemos descartar que o aumento  
1092 do  $2n$  pode haver favorecido uma alta taxa de recombinação, trazendo então algum tipo de vantagem  
1093 na colonização dos espécimes no novo ambiente Sul-americano.

1094 Na maioria dos reptéis e aves, clusters de DNAr estão frequentemente localizados em um  
1095 único par cromossômico (Degrandi et al., 2020; Porter et al., 1994; Sochorová et al., 2018), com  
1096 poucas exceções demonstrando um número amplificado de sítios DNAr em cobras (Camper & Hanks,  
1097 1995; O'Meally et al., 2010), lagartos (Rovatsos et al., 2019), tartarugas (Mazzoleni et al., 2020) e  
1098 aves (revisado em Degrandi et al., 2020). Aqui esse mesmo padrão geral é seguido por todas as  
1099 espécies de Alligatoridae, exceto por ambas as espécies de *Paleosuchus*, que possuem três pares  
1100 cromossômicos carregando estas sequências (**Figura 4**). De fato, sítios de DNAr únicos são  
1101 usualmente encontrados em linhagens antigas, como observado em antigos grupos de peixe, e.g.,  
1102 peixes actinoptérgios não-teleósteos (Sochorová et al., 2018).

1103 Cromossomos que demonstram sequencias menores que 30 Mb – como microcromossomos  
1104 – são amplamente documentados em praticamente todos os grupos de vertebrados (Perry et al., 2021).  
1105 Especificamente, os sauropsidas atuais (algumas aves e répteis) geralmente também apresentam esses  
1106 componentes principais em seus cariótipos (Burt, 2002; Norris et al., 2004). Em tartarugas e aves,  
1107 microcromossomos exibem uma alta densidade genica e conteúdo GC (Auer et al., 1987; McQueen  
1108 et al., 1998; Smith et al., 2000; Andreozzi et al., 2001; Kuraku et al., 2006). Similarmente,  
1109 microcromossomos de repteis escamados também demonstram conteúdo rico em GC em comparação  
1110 com macrocromossomos, apesar de que seus sinais CMA3+ nunca foram tão fortes quanto em aves  
1111 (e.g. Johnson Pokorná et al., 2016), uma diferença na composição cromossômica/genômica que  
1112 também é confirmada por técnicas que utilizam abordagem genômica (Perry et al., 2021).

1113 Nossos resultados demonstraram que todas as espécies de Alligatoridae também possuem um  
1114 alto acúmulo de blocos GC-positivos em pequenos cromossomos, com sinais fortes e nítidos  
1115 colocalizados com os clusters de DNAr 18S. Esse padrão pode ser descrito como único, exibindo um  
1116 padrão de banda G preservado e similar em toda a ordem (King et al., 1986). O padrão escasso em  
1117 sequencias GC nos cromossomos maiores indica a existência de regiões sequência-específicas,  
1118 característica que influencia na redução da taxa de recombinação cromossômica (Olmo, 2005).

1119 Tartarugas e crocodilianos possuem grandes genomas, com um maior conteúdo de DNA  
1120 variável comparado com outros repteis, principalmente devido a tendencia de acumular e preservar  
1121 DNAs repetitivos (Olmo, 1986; Olmo, 2008). Eles também possuem poucas Sequencias Simples  
1122 Repetidas (Simple Short Repeats – SSR) quando comparados com espécies de lagartos (Shedlock et  
1123 al., 2007). De fato, microssatélites ou SSRs é uma das classes de DNA mais representativa e mais  
1124 distribuída em várias espécies de vertebrados (Alföldi et al., 2011; Adams et al., 2016; Kapusta et al.,  
1125 2017) e são conhecidos por demonstrar um papel dinâmico no funcionamento genômico (Balaresque  
1126 et al., 2014). Devido as altas taxas de mutação e de evolução rápida, usualmente modulada pela  
1127 associação com elementos moveis (Ramsay et al., 1999; Cordaux & Batzer, 2009; Janes et al., 2010;  
1128 Figliuolo et al., 2020), a paisagem genômica pode variar drasticamente entre grupos relacionados.

1129 Répteis não-aviários, por exemplo, se destacam neste cenário (Adams et al., 2016; Pasquesi  
1130 et al., 2018; Ahmad et al., 2020). Interessantemente, crocodilianos parecem ser o grupo com menor  
1131 quantidade de conteúdo SSR entre repteis aviários e não-aviários (Green et al., 2014; Adams et al.,  
1132 2016), sendo assim a densidade e o conteúdo de repetições SSR são relativamente similares entre as

1133 espécies, com baixas taxas de mutação e evolução quando comparados com outras linhagens. Jacarés  
1134 constituem um grupo único sem dados de mapeamento de SSR até o momento, (CGG)<sub>n</sub> mostrou certo  
1135 acúmulo, mas em apenas dois pares cromossômicos em *M. niger*, em três pares nas espécies de  
1136 *Caiman* e *Alligator* e quatro pares nas espécies de *Paleosuchus*.

1137 Apesar de conservada, as frações de DNA repetitivo mostram divergências entre as espécies  
1138 de *Caiman*, como demonstrado pelos nossos experimentos de CGH, onde ambas as espécies de  
1139 *Paleosuchus* se destacam como as mais divergentes (**Figura 10**). Seguindo a hipótese filogenética, a  
1140 similaridade citogenética entre as repetições centroméricas de *Caiman* e *M. niger* (que divergiram há  
1141 ~12 M.a) são maiores do que comparadas a *Paleosuchus*, que é filogeneticamente distante e divergiu  
1142 do gênero *Caiman* + *Melanosuchus* há 22 Ma (Oaks, 2011). As extensivas características  
1143 citogenéticas compartilhadas de *Caiman* e *Melanosuchus* são suportadas também pelos experimentos  
1144 de CGH, com poucas diferenças no padrão geral de hibridização demonstrando um alto grau de  
1145 homologia de sequencias.

1146 Apesar do tempo de divergência entre Caimaninae não ter sido aparentemente longo o  
1147 suficiente para fixação de diferenças no cariótipo, em relação ao  $2n$  e a composição cariotípica, é  
1148 permitido que as mudanças nos padrões da fração do DNA repetitivo seja devido as diferentes  
1149 dinâmicas evolutivas. Os experimentos de CGH entre Caimaninae e Alligatorinae sugerem um  
1150 avançado estágio de divergência da sequência, exceto pelos sinais conspícuos, altamente  
1151 correspondentes com sítios de RONS (como podemos comparar com as prévias análises de FISH  
1152 DNAr). Cenário similar já havia sido previamente descrito em genomas distantemente relacionados  
1153 ou que divergiram substancialmente (Lim et al., 2007; Majka et al., 2017; Barby et al., 2019).

1154 A redução temporal progressiva da homologia de cromossomos em Caimaninae parece ter  
1155 ocorrido lentamente e sugere uma tendencia de reorganização interna nos cromossomos operando  
1156 para reduzir gradualmente o grau de colinearidade e de sintenia conservada, como observado em  
1157 diferentes grupos de animais (Matsuoka et al., 2004). Estase cariotípica caracterizada pela ausência  
1158 de modificações conspícuas durante a história evolutiva, já foi descoberta em vários grupos  
1159 biológicos, como plantas (Mandáková et al., 2010; Bomfleur et al., 2014; Samad et al., 2016), anfíbios  
1160 (Sessions & Kezer, 1991; Aprea et al., 2004), aves (Ellegren, 2010) e peixes (Molina, 2007;  
1161 Gaffaroglu et al., 2020). Entre os peixes, por exemplo, os notopterídeos de Gondwana (Teleostei,  
1162 Osteoglossiformes), cuja espécies divergiram há mais de 100 M.a, demonstram cariótipos

1163 conservados durante longas escalas evolutivas do tempo, com apenas leves distúrbios em sua  
1164 colinearidade.

1165 Entretanto, a manutenção destes traços conservativos por milhões de anos não são sempre  
1166 bem entendidos e sugere algumas causas prováveis, como a seleção estabilizadora (Wake et al.,  
1167 1983), o modelo do equilíbrio pontuado (Stockdale & Benton, 2021) ou por processos ortoseletivos  
1168 (White, 1973; King, 1981). Em crocodilianos, os antigos períodos de divergência evolutiva entre as  
1169 linhagens não corroboram a hipótese de estase cariotípica como um subproduto de processos recentes  
1170 de especiação. Assim como a diversificação cariotípica e cromossômica pode acompanhar a  
1171 especiação (White, 1973; King, 1981; Potter et al., 2017), a baixa diversidade de espécies de  
1172 crocodilianos pode estar diretamente ligada às características do cariótipo, o que pode ter sido  
1173 influenciado pelas flutuações climáticas que ocorreram durante o período Cenozóico (Stubbs et al.,  
1174 2021).

## 1175 **CONCLUSÕES**

1176 Este estudo é o primeiro a oferecer dados cromossômicos confiáveis para todas as espécies  
1177 taxonomicamente reconhecidas de Alligatoridae, baseado em técnicas convencionais e moleculares  
1178 de citogenética e o primeiro a prover uma visão sobre a história evolutiva e evolução cromossômica  
1179 de jacarés e aligátors. Nos observamos uma dicotomia estável entre o gênero *Alligator* ( $2n = 32$ ) e  
1180 *Caiman*, *Melanosuchus* e *Paleosuchus* ( $2n = 42$ ), onde  $2n = 32$  representa o aparente estado ancestral,  
1181 o que é suportado por outros dados cromossômicos. Logo, a diversificação cariotípica em Caimaninae  
1182 foi seguida por uma série de rearranjos Robertsonianos onde as fissões cêntricas desempenharam um  
1183 papel principal. Investigações adicionais nas relações entre o jacaré-americano e o jacaré-chinês com  
1184 os jacarés da América do Sul podem prover informações posteriores no papel dos fatores  
1185 biogeográficos na diferenciação cariotípica dos Crocodylia.

## **6.2.CAPÍTULO 2**

**Pintura cromossômica e mapeamento de DNA repetitivo ilumina a evolução cariotípica em Crocodilos (Crocodylidae).**

1186

1187

1188

1189

1190

1191

1192

1193

1194

1195

1196

1197

1198

1199

1200

1201

1202

1203

## 1204 **Introdução**

1205 Crocodilianos (Crocodylia) são organismos intrigantes que tem demonstrado estase  
1206 morfológica e sucesso evolutivo ao longo da história do planeta Terra. Em contraste com outros  
1207 vertebrados, que experienciaram variações tremendas, as espécies de crocodilianos atuais mantem  
1208 similaridades morfológicas e ecológicas há aproximadamente 100 Milhões de Anos (M.a) (Grigg et  
1209 al., 2001; Brochu, 2003; Bronzati et al., 2015). Crocodilianos são uma peça-chave na filogenia dos  
1210 vertebrados, por serem membros do grupo monofilético conhecido como arcossauros, que inclui  
1211 também os dinossauros, pterossauros e as aves modernas. Da mesma forma, dados filogenéticos  
1212 moleculares revelam que aves são seus parentes vivos mais próximos (Janke & Arnason, 1997; Iwabe  
1213 et al., 2005; Green et al., 2014). Por possuírem uma ampla distribuição global, historia evolutiva  
1214 antiga e boa adaptabilidade a diversos tipos de ambientes, crocodilianos são um grupo importante  
1215 para investigações sob a ótica evolutiva.

1216 Crocodylia é comumente dividida em três famílias (algumas vezes em subfamílias de uma  
1217 única família Crocodylidae): Crocodylidae, Gavialidae e Alligatoridae, o número de espécies  
1218 atualmente varia entre 27-28 (Brochu 2003; McAliley et al. 2006; Martin 2008; Hekkala et al. 2011;  
1219 Shirley et al. 2014; Srikulnath et al. 2015; Barreiros 2016; Uetz et al. 2023). Crocodylidae é composta  
1220 por 18 espécies reconhecidas pertencentes a três gêneros: *Crocodylus* (13), *Osteolaemus* (3) e  
1221 *Mecistops* (2) distribuídas na Asia, Australia, África e no Novo Mundo (Hekkala et al. 2011; Shirley  
1222 et al. 2014, 2018; Nicolai & Matzke 2019; Pough 2022). *Osteolaemus* e *Mecistops* são linhagens  
1223 irmãs, ambas distribuídas na região Central e Oeste da África que as vezes são tratadas como  
1224 membros da subfamília Osteolaeminae, uma linhagem irmã da subfamília Crocodylinae  
1225 (monogenérica, possuindo apenas o gênero *Crocodylus*; Brochu 2003; Hekkala et al. 2021). O gênero  
1226 monotípico *Tomistoma* do Sudeste Asiático, conhecido como falso-gavial, ainda não está  
1227 sistematicamente definido, mas existem evidencias que afirmam que *Tomistoma* é um representante  
1228 da família Gavialidae (Oaks 2011; Lee & Yates 2018; Colston et al. 2020; Hekkala et al. 2021; Pan  
1229 et al. 2021).

1230 De acordo com dados citogenéticos publicados, o número diploide ( $2n$ ) de crocodilianos varia  
1231 de 30 (*Crocodylus palustris* e *C. siamensis* (asiáticos), *C. rhombifer* (Americano/Cubano) e  
1232 *Mecistops cataphractus* (Africano)) a 42 (todas as espécies Neotropicais de Caimaninae da família  
1233 Alligatoridae) e o número fundamental (NF) varia de 56 a 62 (King et al. 1986; Amavet et al. 2003;  
1234 Kawagoshi et al. 2008; Olmo & Signorino 2022; Oliveira et al. 2021). Crocodilianos e aves são

1235 relacionados, mas diferentemente das aves, estes possuem baixo  $2n$  e cromossomos com tamanho  
1236 gradualmente decrescente, sem uma distinção clara entre macrocromossomos e microcromossomos  
1237 (como usual para répteis). Isto ocorre devido a sequência de fusões que aconteceram entre eles depois  
1238 da divergência entre crocodilianos e aves cerca de 220-250 M.a (Kawagoshi et al. 2008). Até o  
1239 momento não houve nenhum relato da presença de cromossomos sexuais heteromórficos, todos os  
1240 animais aparentam depender de temperatura para determinação do sexo (Amavet et al. 2003;  
1241 Valenzuela & Lance 2004; Kawai et al. 2007).

1242 Contudo, a maioria dos dados citogenéticos de Crocodylia é limitado a descrição do  $2n$  e da  
1243 composição cariotípica, baseado em algumas técnicas de coloração e bandeamento tradicional (Cohen  
1244 & Clark 1967; Cohen & Gans 1970; King et al. 1986; Lui et al. 1994). Até o momento apenas alguns  
1245 estudos relataram a aplicação de técnicas citogenéticas moleculares (Kawagoshi et al. 2008; Uno et  
1246 al. 2012; Kasai et al. 2012; Oliveira et al. 2021). Utilizando ambas as abordagens, citogenética  
1247 molecular e convencional, nosso recente trabalho foi o primeiro a fornecer dados cromossômicos para  
1248 todas as espécies de Alligatoridae (Oliveira et al. 2021). As descobertas permitiram um primeiro olhar  
1249 na história evolutiva e na evolução cromossômica de jacarés e aligátors com as análises do  
1250 mapeamento cromossômico de DNA repetitivo, WCP (pintura cromossômica completa) e CGH  
1251 (hibridização genômica comparativa) indicando que a diversificação cariotípica de Caimaninae foi  
1252 seguida por uma série de rearranjos Robertsonianos, com as fissões cêntricas desempenhando um  
1253 papel fundamental (Oliveira et al. 2021).

1254 Em Crocodylia, Kasai et al (2012) examinaram a homologia dos cromossomos 1-8 da galinha  
1255 (*Gallus gallus*) com os cromossomos do crocodilo-do-Nilo (*C. niloticus*) e os resultados indicaram  
1256 sintenia entre o maior par cromossômico da galinha e do crocodilo e adicionalmente que eventos de  
1257 fusão e de fissão ocorreram na evolução do cariótipo de crocodilos. Srikulnath et al. (2015)  
1258 propuseram também que rearranjos cromossômicos (i.e., fusão/fissão cêntrica) foram o fator principal  
1259 por trás da diversificação cariotípica observada em crocodilianos. Todavia, permanece obscuro ainda  
1260 o mecanismo preciso e quais os cromossomos estiveram envolvidos nesses rearranjos. Logo, neste  
1261 estudo, nos revisitamos os cariótipos de seis espécies de crocodilos verdadeiros para examinar os  
1262 representantes dos principais números diploides  $2n = 30/32/38$ , exceto  $2n = 34$  (não disponível no  
1263 momento para nós), que são filogeneticamente informativos usando as técnicas convencionais e  
1264 moleculares – nomeadamente, Banda C, CGH, WCP e mapeamento de sequências repetitivas. Nossos  
1265 resultados combinados demonstram quatro principais rearranjos cromossômicos (CRs) que ocorreram  
1266 durante o processo de diversificação cariotípica. Imagina-se que estes CRs surgiram de um cariótipo

1267 ancestral com  $2n = 32$ . Este estudo faz parte de uma série de citogenética e citogenética de  
 1268 crocodilianos.

## 1269 Material e Métodos

1270 Neste estudo utilizamos 20 animais das diferentes espécies da família Crocodylidae, conforme  
 1271 está descrito na **Tabela 4**.

1272  
 1273 **Tabela 4.** Espécies, tamanho da amostra (N), sexo, localidade e distribuição dos indivíduos analisados. DRC,  
 1274 República Democrática do Congo

Espécies	N	Distribuição	Origem das Amostras
<i>C. mindorensis</i> (Crocodilo-filipino)	01 não identificado	Filipinas	Zoológico de Crocodilos de Protóvin
<i>C. moreletii</i> (Crocodilo-de-Morelet)	01 não identificado	América Central	Zoológico de Crocodilos de Protóvin
<i>C. rhombifer</i> (Crocodilo-cubano)	03♀, 02♂	Cuba	Coleção Particular, distrito de Kanchanadit, Tailândia
<i>C. siamensis</i> (Crocodilo-siamês)	02♀, 02♂	Sudeste Asiático	Coleção Particular, distrito de Kanchanadit, Tailândia
<i>O. osborni</i> (Crocodilo-anão-do-Congo)	01♀	Bacia do Congo	Coleção Particular, Kinshasa, DRC
<i>O. tetraspis</i> (Crocodilo-anão)	08 não identificados	África Central/Oeste Africano	Zoológico de Pilsen, República Tcheca

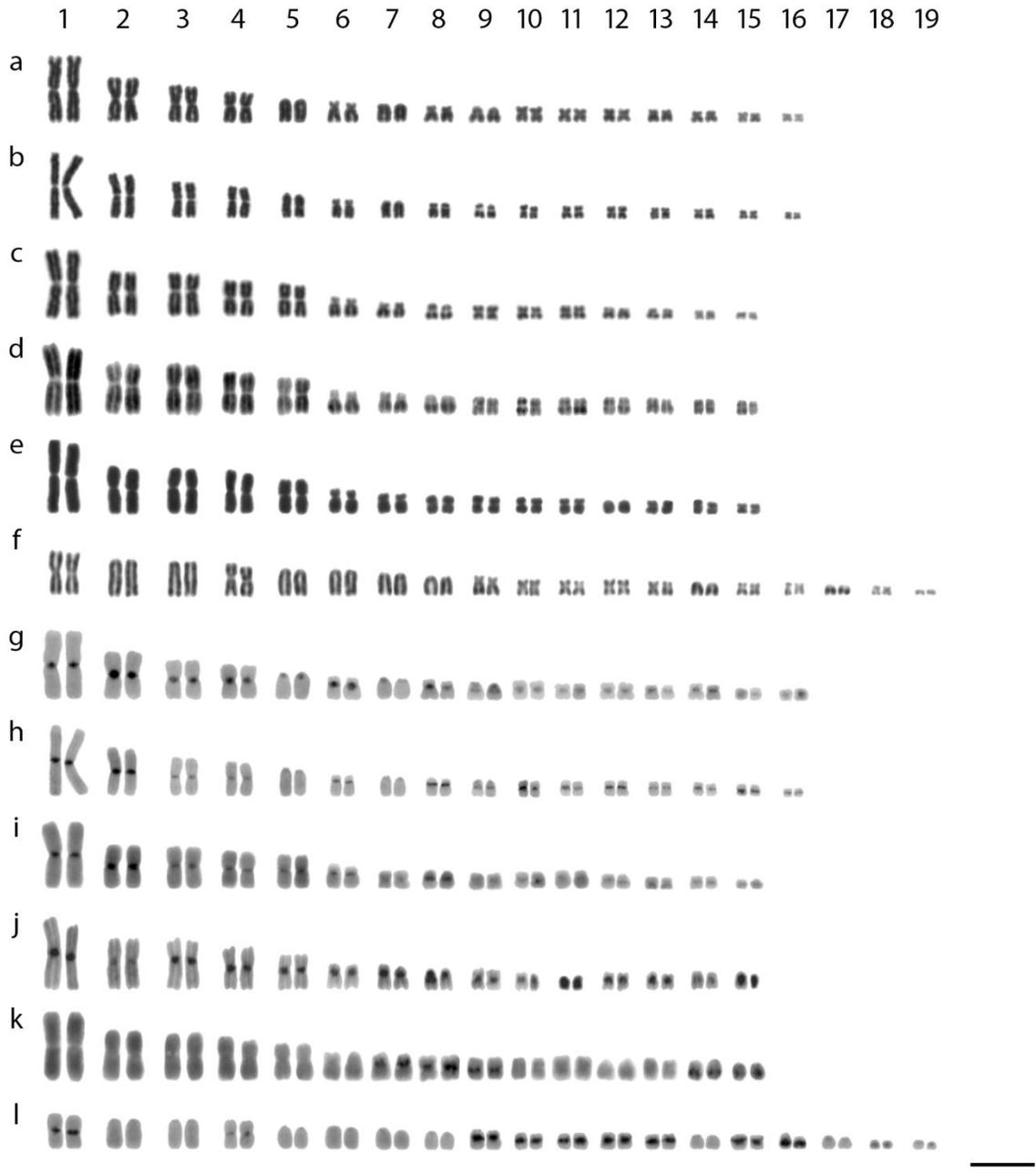
1275  
 1276 As análises metodológicas utilizadas neste estudo (obtenção de material cromossômico, técnicas  
 1277 convencionais e moleculares, mapeamento de sequências, microdissecção e reconstrução do estado  
 1278 ancestral) estão todas descritas detalhadamente na seção Material e Métodos desta tese, descrita  
 1279 anteriormente.

## 1280 Resultados

### 1281 Cariótipo e Bandeamento C

1282 Dentre as espécies examinadas, três números diploides distintos ( $2n$ ) foram observados:  $2n =$   
 1283 32 em *C. mindorensis* e *C. moreletii*;  $2n = 30$  em *C. rhombifer*, *C. siamensis* e *O. osborni* e  $2n = 38$   
 1284 em *O. tetraspis*. Exceto por *O. tetraspis*, todos os cariótipos apresentaram cromossomos com dois  
 1285 braços. Geralmente, nenhuma variabilidade cromossômica intraespecífica foi identificada, nem entre  
 1286 machos e fêmeas (**Figura 11 a-d**). As bandas heterocromáticas C-positivas foram observadas na

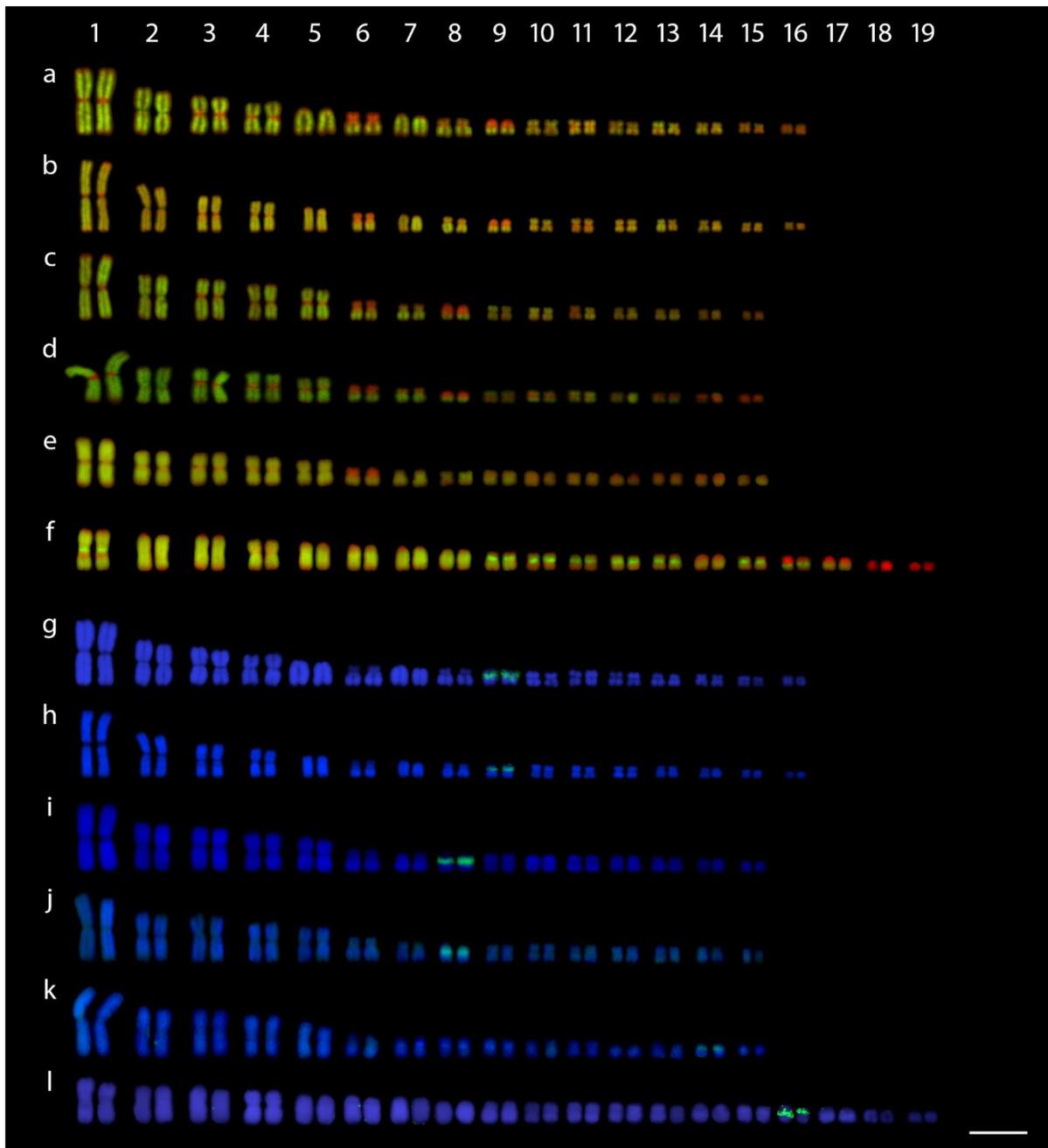
1287 região centromérica da maioria dos cromossomos, exceto nas duas espécies de *Osteolaemus*, onde  
 1288 alguns pares aparentam não possuir blocos heterocromáticos em seus centrômeros. (**Figura 11 e-g**).  
 1289



1290  
 1291 **Figura 11** – Cariótipos de *Crocodylus mindorensis* (**a, g**), *Crocodylus moreletii* (**b, h**), *Crocodylus rhombifer* (**c, i**),  
 1292 *Crocodylus siamensis* (**d, j**), *Osteolaemus osborni* (**e, k**) e *Osteolaemus tetraspis* (**f, l**) analisados após coloração  
 1293 convencional com Giemsa (**a-f**) e Bandeamento C (**g-l**). Barra = 20µm.

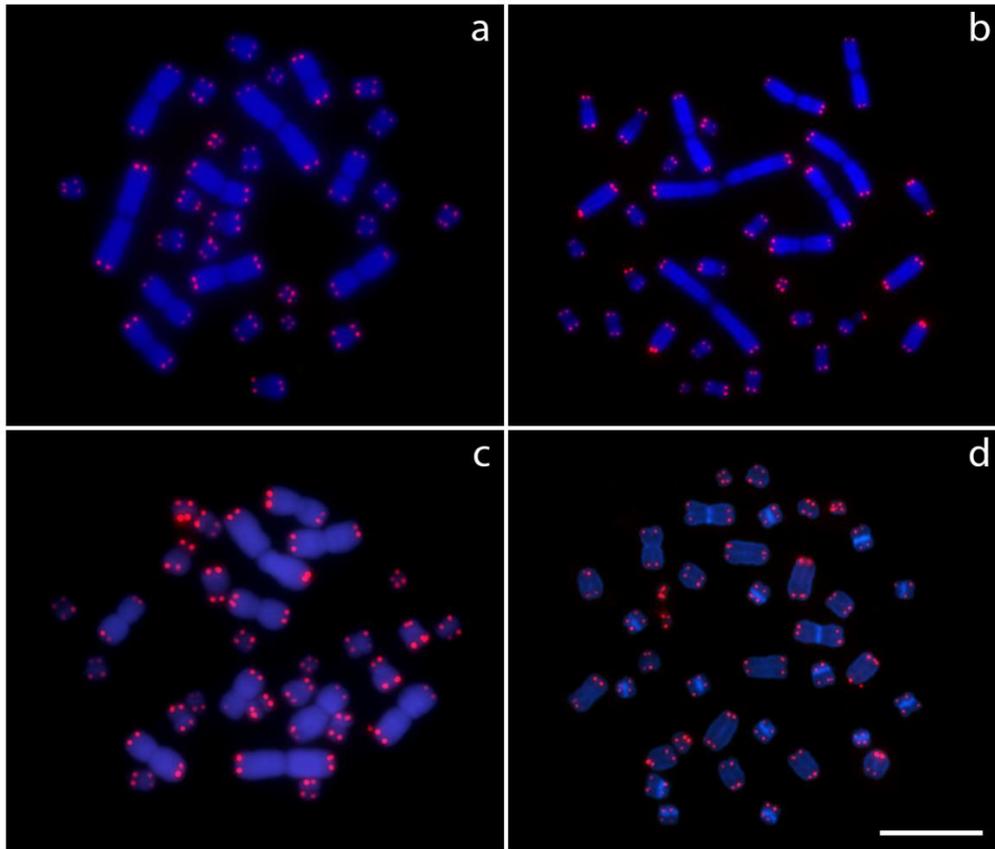
1294           **Mapeamento de DNAs repetitivos usando coloração de Cromomicina A<sub>3</sub> e Híbridização**  
1295 **Fluorescente in situ (FISH)**

1296           Bandas de CMA3+, que refletem a presença de regiões ricas em GC, foram encontradas em  
1297 praticamente todas as regiões centroméricas, com sinais mais fortes nos braços curtos de dois pares  
1298 cromossômicos de todas as espécies. Além disso, os quatro menores cromossomos em *O. tetraspis*  
1299 apresentaram sinais conspícuos de CMA3+ nos braços longos e curtos (**Figura 12a-f**). Em todas as  
1300 espécies foram encontrados sítios de DNAr 18S na região centromérica de um par cromossômico  
1301 acrocêntrico (**Figura 12g-l**). FISHs realizadas com a sonda telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> não exibiram  
1302 presença de ITS (sítios teloméricos intersticiais) em nenhuma das espécies analisadas. Quatro  
1303 espécies representativas, *C. rhombifer* ( $2n = 30$ ), *C. moreletii* ( $2n = 32$ ), *O. osborni* ( $2n = 30$ ) e *O.*  
1304 *tetraspis* ( $2n = 38$ ), foram escolhidas para apresentar os resultados (**Figura 13**).



1305

1306 **Figura 12** - Cariótipos de *Crocodylus mindorensis* (**a, g**), *Crocodylus moreletii* (**b, h**), *Crocodylus rhombifer* (**c, i**),  
 1307 *Crocodylus siamensis* (**d, j**), *Osteolaemus osborni* (**e, k**) e *Osteolaemus tetraspis* (**f, l**) analisados após bandeamento  
 1308 CMA3/DAPI (regiões GC e AT-ricas pseudocoloridas em vermelho e verde, respectivamente, **a-f**) e FISHs realizadas  
 1309 com sonda de DNAr 18S (verde) (**g-l**). Barra = 20µm.

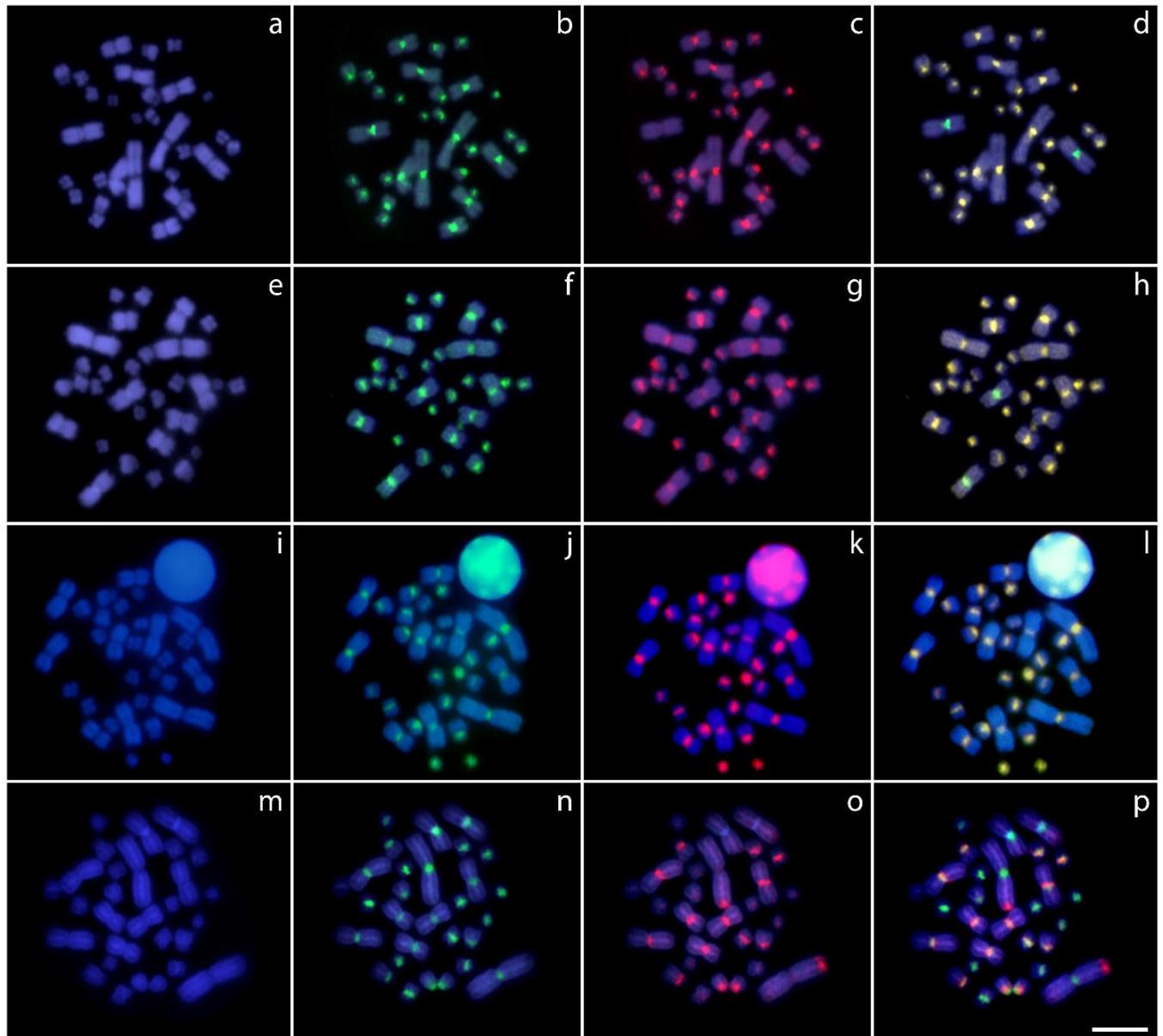


1310

1311 **Figura 13** - Placas metafásicas de fêmeas de *C. rhombifer* (a), *C. moreletii* (b), *O. osborni* (c) e *O. tetraspis*  
 1312 (d) com sonda telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> (vermelho). Barra = 5µm.

1313 **Hibridização Genômica Comparativa**

1314 Sondas derivadas de gDNA (DNA genômico) de *C. siamensis* e das outras espécies de crocodilo  
 1315 revelaram uma localização preferencial em regiões centroméricas e pericentroméricas de todos os  
 1316 cromossomos (sinais amarelos, i.e., uma mistura do vermelho e do verde), demonstrando o conteúdo  
 1317 repetitivo em comum em tais regiões (**Figura 14 a-l**). A única exceção surgiu quando o genoma de  
 1318 *C. siamensis* foi comparado com o genoma de *C. mindorensis* e *C. moreletii* onde observou-se um  
 1319 acúmulo de sequências *C. siamensis*-específicas no par 2 (**Figura 14 c-h**). Investigações de CGH  
 1320 intergenéricas comparando os genomas de *C. siamensis* e de *O. tetraspis* demonstraram uma  
 1321 variedade de sinais *Crocodylus*-específico que não se sobrepõe assim como extensivos sinais de  
 1322 hibridização das repetições altamente abundantes de *O. tetraspis* na área centromérica dos  
 1323 cromossomos e na região telomérica do primeiro par cromossômico (**Figura 14 m-p**).

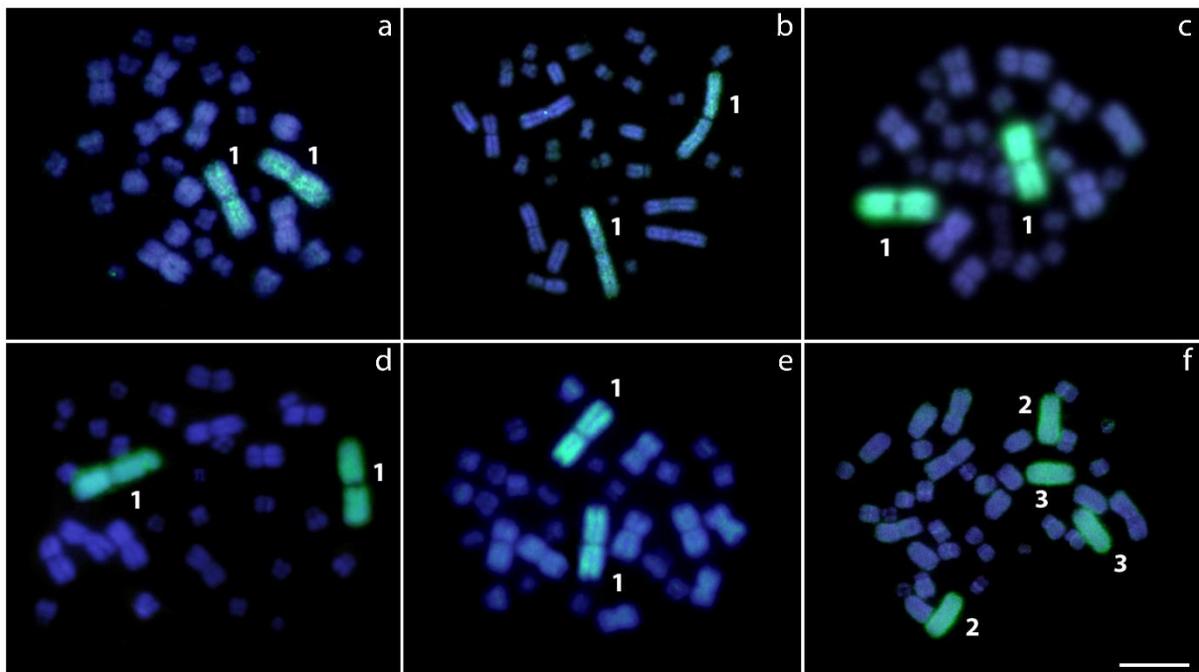


1324

1325 **Figura 14** - Cromossomos metafásicos de fêmeas de *C. siamensis* após hibridizações interespecíficas de CGH. Primeira  
 1326 coluna (**a, e, i, m**): imagens em DAPI (azul). Segunda coluna (**b, f, j, n**): padrão de hibridização da sonda de *C. siamensis*  
 1327 (verde). Terceira coluna (**c, g, k, o**): padrão de hibridização da sonda de cada espécie analisada (vermelho) de *C.*  
 1328 *mindorensis* (**c**), *Crocodylus moreletii* (**g**), *Crocodylus rhombifer* (**k**) e *Osteolaemus tetraspis* (**o**). Quarta coluna (**d, h, l,  
 1329 **p**): imagens sobrepostas das duas sondas genômicas e da coloração em DAPI. As regiões genômicas em comum aparecem  
 1330 em amarelo. Sinais em verde mostram regiões específicas ou enriquecidas altamente abundantes no genoma de *C.*  
 1331 *siamensis*. Sinais em vermelho apontam para regiões com conteúdo repetitivo em comum, mas com grande abundância  
 1332 dessas repetições no genoma das espécies competitivas (i.e., *O. tetraspis*, p). Barra = 20µm.**

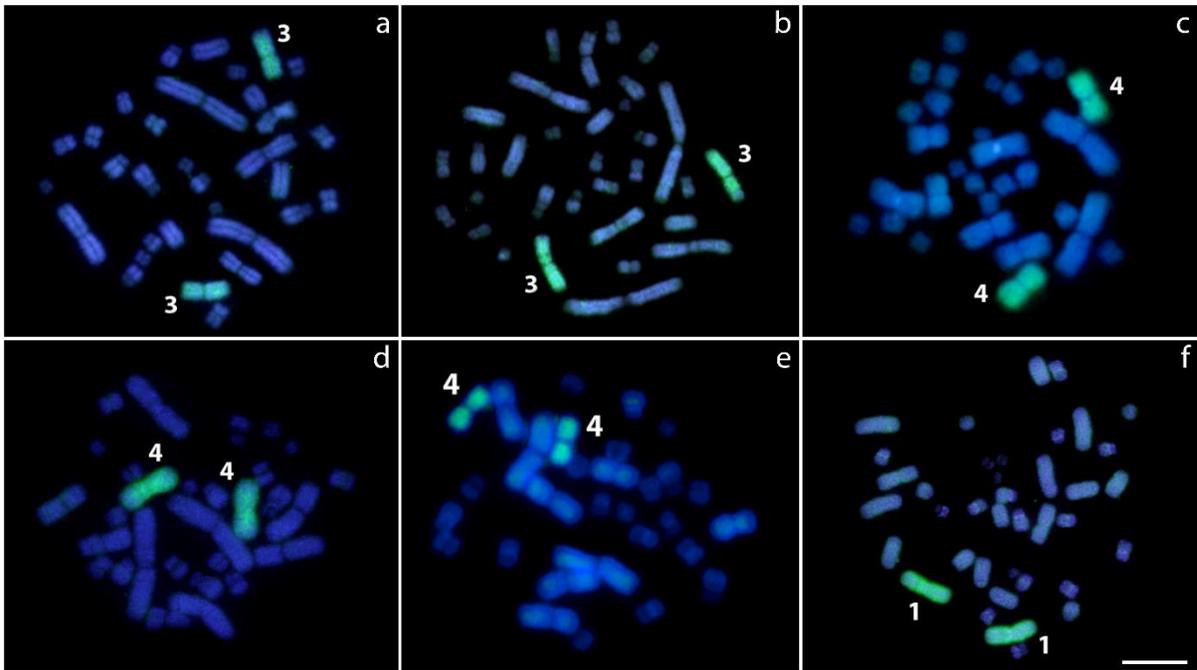
1333 **Detecção de homólogias cromossômicas através de experimentos de Zoo-FISH**

1334 Hibridizações realizadas com a sonda CSI-1 pintaram o maior par cromossômico metacêntrico  
1335 (par 1) em todas as espécies de *Crocodylus* e em *O. osborni*. Entretanto, foram pintados quatro pares  
1336 cromossômicos acrocêntricos (pares 2 e 3) em *O. tetraspis* (**Figura 15**). O maior par metacêntrico  
1337 (par 1) de *O. tetraspis*, assim como o par 3 metacêntrico (em *C. mindorensis* e em *C. moreletii*) e o  
1338 par 4 (em *C. siamensis*, *C. rhombifer* e *O. osborni*) que foram completamente pintados pela sonda  
1339 OST-1 (**Figura 16**). De forma similar, OST-4 pintou completamente o segundo maior par  
1340 cromossômico metacêntrico (par 4) em *O. tetraspis*, assim como os pares metacêntricos 4 (de *C.*  
1341 *mindorensis* e *C. moreletii*) e os pares 5 (de *C. siamensis*, *C. rhombifer* e *O. osborni*) (**Figura 17**).  
1342 Além disso, a sonda OST-19 pintou completamente o menor par cromossômico em *O. tetraspis* (par  
1343 19) e os braços curtos do par 6 em todas as espécies de *Crocodylus* e em *O. osborni* (**Figura 18**). Os  
1344 resultados das pinturas entre as espécies estão sumarizados nos ideogramas de cada forma cariotípica  
1345 (**Figura 19**).



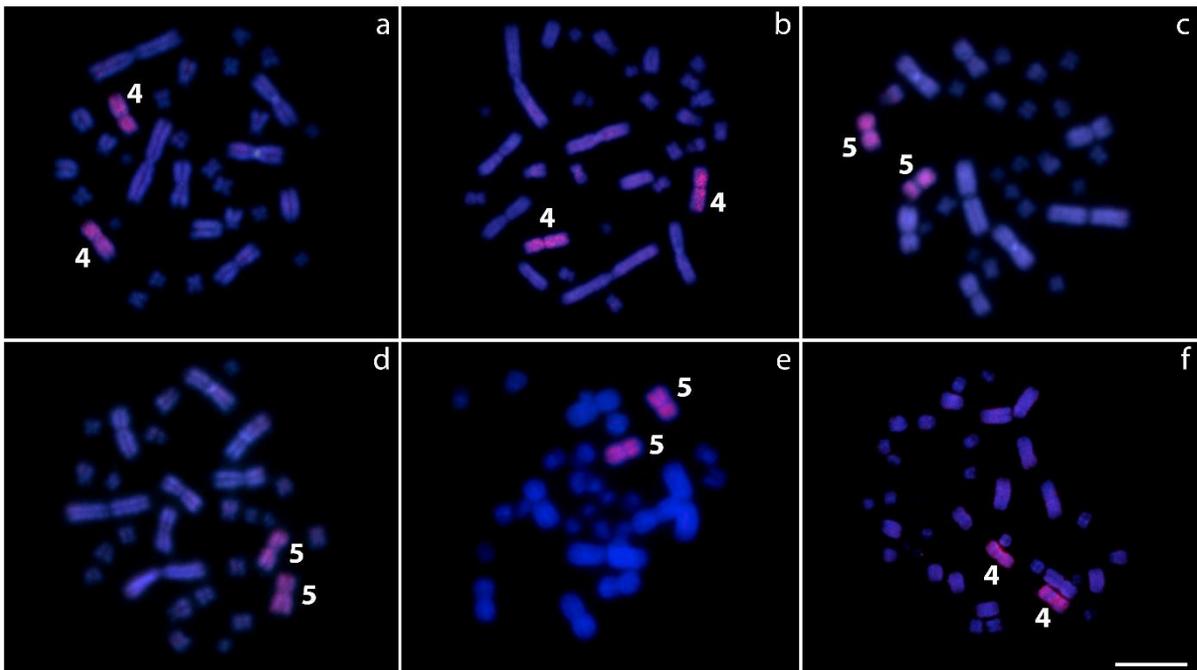
1346 **Figura 15** – Resultados de Zoo-FISH onde utilizamos a sonda CSI-1 em placas metafásicas de *Crocodylus mindorensis*  
1347 (a), *Crocodylus moreletii* (b), *Crocodylus rhombifer* (c), *Crocodylus siamensis* (d), *Osteolaemus osborni* (e) e *O. tetraspis*  
1348 (f) demonstrando homologia cromossômica. Note que o primeiro par metacêntrico, compartilhado por todas as espécies,  
1349 parece estar dividido em quatro pares acrocêntricos em *O. tetraspis* (f). Barra = 20µm.

1351



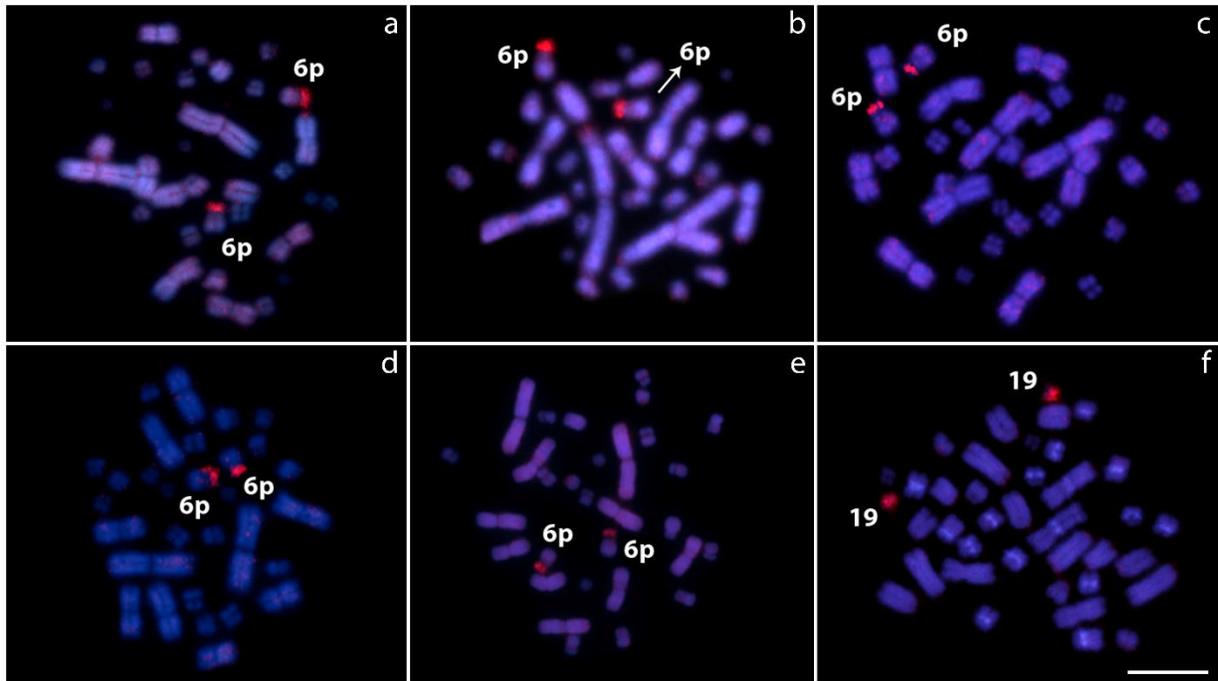
1352

1353 **Figura 16** – Resultados de Zoo-FISH após a utilização da sonda OST-1 nas placas metafásicas de *Crocodylus mindorensis*  
 1354 (a), *Crocodylus moreletii* (b), *Crocodylus rhombifer* (c), *Crocodylus siamensis* (d), *Osteolaemus osborni* (e) e *O. tetraspis*  
 1355 (f). Barra = 20µm.



1356

1357 **Figura 17** - Resultados de Zoo-FISH após a utilização da sonda OST-4 nas placas metafásicas de *Crocodylus mindorensis*  
 1358 (a), *Crocodylus moreletii* (b), *Crocodylus rhombifer* (c), *Crocodylus siamensis* (d), *Osteolaemus osborni* (e) e *O. tetraspis*  
 1359 (f). Barra = 20µm.



1360

1361 **Figura 18** - Resultados de Zoo-FISH após a utilização da sonda OST-19 nas placas metafásicas de *Crocodylus*  
 1362 *mindorensis* (a), *Crocodylus moreletii* (b), *Crocodylus rhombifer* (c), *Crocodylus siamensis* (d), *Osteolaemus osborni* (e)  
 1363 e *O. tetraspis* (f). Barra = 20µm.

#### 1364 **Reconstrução do estado ancestral**

1365 A reconstrução do estado ancestral identificou como o número diploide ancestral como  $2n =$   
 1366 32 não somente para a família Crocodylidae, assim como para a Ordem Crocodylia (**Figura 19**).  
 1367 Baseados nas reconstruções filogenéticas disponíveis (Oaks, 2011; Meredith et al., 2011; Colston et  
 1368 al., 2020), a redução do  $2n$  ocorreu pelo menos três vezes de forma independente durante a evolução  
 1369 do cariótipo dos crocodilos (todas as espécies possuindo  $2n = 30$ ) - em *C. rhombifer*, no ancestral em  
 1370 comum de *C. siamensis* e *C. palustris* e no ancestral da subfamília Osteolaeminae. De forma análoga,  
 1371 um aumento no número de cromossomos ocorreu pelo menos três vezes de maneira independente em  
 1372 - *C. suchus* ( $2n = 34$ ), *C. porosus* ( $2n = 34$ ) e *O. tetraspis* ( $2n = 38$ ).



1384 **Discussão**

1385 Dados citogenéticos de crocodilos estavam limitados às pesquisas da década de 70, onde  
1386 definiram  $2n$  e a composição cariotípica usando bandeamento e coloração convencional. Estes  
1387 estudos mostraram que os cariótipos dos crocodilos tem um baixo número diploide ( $2n = 30-38$ ),  
1388 cromossomos grandes que diminuem seu tamanho de forma gradual, onde o menor par possui  
1389 tamanho similar a microcromossomo e com pouca variação interespecífica (Cohen & Clark, 1967;  
1390 Cohen & Gans, 1970; King et al., 1986). Aqui, nós combinamos as metodologias convencionais e  
1391 moleculares para revisar os cariótipos de seis espécies de crocodilos que representam números  
1392 diploide distintos. Consequentemente, nós descobrimos a maioria dos rearranjos cromossomais  
1393 envolvidos na reorganização do cariótipo que ocorreram de uma suposta condição ancestral durante  
1394 o seu caminho evolutivo cariotípico, em complemento a elucidação das principais características  
1395 deles.

1396 **Características gerais dos cromossomos dos crocodilos**

1397 Quatro principais número diploide (i.e.,  $2n = 30/32/34/38$ ) são observados em crocodilos, nós  
1398 examinamos espécies representantes de todos os tipos, exceto pelo  $2n = 34$  (observado apenas em *C.*  
1399 *porosus* e em *C. suchus*) (Cohen & Gans, 1970; Hekkala et al., 2011).

1400 Nossos dados corroboram a primeira informação cariológica para estas espécies, descritas por  
1401 Cohen & Gans (1970), exceto por *O. osborni* e *C. siamensis*, onde ao observar nossos dados, todos  
1402 eles inequivocamente, apontaram para o estabelecimento do  $2n = 30$  nestas espécies. Cohen & Gans  
1403 (1970) examinaram primeiro o cariótipo de *C. siamensis* e determinaram que o número diploide era  
1404 de  $2n = 34$ , enquanto estudos citogenéticos subsequentes encontraram o mesmo  $2n = 30$ , como  
1405 observamos neste estudo (Chavananikul et al., 1994; Kawagoshi et al., 2008).

1406 Tais diferenças podem ser consequência dos avanços dos métodos citogenéticos que  
1407 superaram as limitações técnicas previas. De fato, outros problemas como a identificação correta das  
1408 espécies ou uma origem híbrida também não podem ser descartados, especialmente quando  
1409 consideramos que algumas espécies de crocodilo são comumente hibridizados em fazendas na Ásia  
1410 (Ariyaphong et al., 2023). A espécie endêmica do Congo, *Osteolaemus osborni* foi recentemente  
1411 proposta como uma espécie, em vez do status anterior de subespécie de *O. tetraspis*, como discutido  
1412 por vários autores (Brochu, 2006, 2007; McAliley et al., 2006; Eaton et al., 2009; Shirley et al., 2014;

1413 Grigg & Kirshner, 2015). Cohen & Gans (1970) mencionam que incluíram *O. tetraspis osborni* entre  
1414 os indivíduos cariotipados (todos os indivíduos eram provenientes de zoos americanos), mas não  
1415 encontraram diferenças entre as subespécies. Em nosso estudo, nós encontramos, em concordância  
1416 com Cohen & Gans (1970)  $2n = 38$  em *O. tetraspis*, porém, um cariótipo distinto em *O. osborni* com  
1417  $2n = 30$  (**Figura 11**). Nós assumimos que o espécime usado por Cohen & Gans de “*O. osborni*” foi  
1418 provavelmente identificada erroneamente como *O. tetraspis* sensu stricto ou possivelmente a espécie  
1419 de *Osteolaemus* do Oeste africano, que anda não foi formalmente identificada (Shirley et al., 2014;  
1420 Grigg & Kirshner, 2015). *Osteolaemus osborni* é a primeira espécie divergente dentro da diversidade  
1421 existente em *Osteolaemus* (Eaton et al., 2009; Shirley et al., 2014). Seu número cromossômico de  $2n$   
1422  $= 30$  corresponde ao encontrado em *Mecistops* (gênero irmão), sugerindo que o número diploide do  
1423 ancestral em comum ou potencialmente toda a subfamília Osteolaeminae teve  $2n = 30$  (**Figura 19**  
1424 **B**). Vale a pena mencionar que, não está claro qual das duas espécies recentemente distinguidas do  
1425 gênero *Mecistops* (Shirley et al., 2014; 2018) foi analisada citogeneticamente no passado – mesmo  
1426 que seja de fato *M. cataphractus* sensu stricto, ou *M. leptorhynchus*, ou ambos e eles tenham o mesmo  
1427 número de cromossomos. Esclarecer essa ambiguidade deve ser uma prioridade em pesquisas futuras,  
1428 examinar se as duas espécies de *Mecistops* possuem cariótipo similar ou não. Equivalentemente, o  
1429 gênero *Osteolaemus* com a espécie ainda sem nome do Oeste Africano, irmã de *O. tetraspis* sensu  
1430 stricto (Eaton et al., 2009; Shirley et al., 2018), ainda precisa ser avaliado citogeneticamente. O  
1431 conhecimento do cariótipo dessas espécies permitirá a interpretação da evolução cariotípica em  
1432 *Osteolaemus* assim como na subfamília Osteolaeminae.

1433 Na subfamília Crocodylinae, as quatro espécies de *Crocodylus* que analisamos, reforçam: i) a  
1434 preponderância de cromossomos com dois braços; ii) blocos heterocromáticos na região centromérica  
1435 de todos os cromossomos e iii) cluster de DNAr presentes apenas em um par cromossômico nas  
1436 regiões centroméricas ricas em GC em apenas um par cromossômico, com sinais fortes visíveis nos  
1437 braços curtos dos dois pares cromossômicos (**Figuras 11 e 12**). A única diferença entre os cariótipos  
1438 é de um evento único de fusão entre dois cromossomos no cariótipo  $2n = 32$ , originando um cariótipo  
1439  $2n = 30$  (como sera discutido adiante). Assim, seus cariótipos não exibem rearranjos macroestruturais  
1440 significantes. Em seguida, os resultados do CGH corroboraram estas descobertas pois, pouca variação  
1441 no padrão de hibridização de uma maneira geral sugere um alto grau de similaridade de sequências  
1442 repetitivas entre as espécies de *Crocodylus* estudadas. A única exceção ocorreu quando o genoma de  
1443 duas espécies  $2n = 32$  (*C. mindorensis* e *C. moreletii*) foram comparados ao genoma de *C. siamensis*

1444 e a região centromérica do par número 2 demonstrou possuir uma composição de DNA divergente e  
1445 espécie-específica (**Figura 13**).

1446           Exceto pela existência de clusters de DNAr em apenas um par de cromossomos, *O. tetraspis*  
1447 demonstrou diferentes padrões para a maioria dos já mencionados traços gerais que compartilha com  
1448 sua espécie-irmã *O. osborni* e com as outras espécies de *Crocodylus* (**Figura 12**). *O. tetraspis* possui  
1449 um cariótipo bem distinto, com o maior número diploide ( $2n = 38$ ) entre os crocodilos, mas sem  
1450 grandes cromossomos metacêntricos e com a presença de pequenos pares acrocêntricos (**Figura 11**).  
1451 Todavia, apenas 9 pares cromossômicos incluíram blocos de heterocromatina C-positiva (a aparente  
1452 tendência acerca de perda de heterocromatina pelos grandes cromossomos de *O. osborni*) e os  
1453 menores pares possuem um acúmulo substancial de blocos GC-ricos (**Figura 12**). O CGH realizado  
1454 entre as espécies revelou que *O. tetraspis* e *C. siamensis* estavam em um estágio avançado de  
1455 divergência das sequências. Isto já era de certa forma esperado, levando em consideração a cisão  
1456 evolutiva entre estas linhagens (~35 M.a) (Colston et al., 2020). Apenas alguns sinais de hibridização  
1457 estavam sobrepostos, a maioria em blocos heterocromáticos nos centrômeros, vários pares  
1458 cromossômicos demonstraram sequências espécie-específicas com sinais substanciais de  
1459 hibridização nas regiões centroméricas e na porção terminal do maior par cromossômico (**Figura 13**).

1460           Crocodilianos possuem um padrão cariotípico tipicamente conservado, diferindo  
1461 significativamente dos outros taxa de répteis. Com exceção de Sphenodontia, que detém apenas uma  
1462 espécie vivente (*S. punctatus* conhecido popularmente como tuatara) (Hay et al. 2010; Simões et al.  
1463 2022; Uetz et al. 2023), Testudine e Squamata contam com uma ampla gama de  $2n$ , variando de 26 a  
1464 68 e 20 a 62, respectivamente (revisado em Deakin & Ezaz, 2019). Trabalhos recentes com anfíbios,  
1465 aves e mamíferos suportam a noção de que linhagens antigas são responsáveis pela diversidade de  
1466 espécies contemporâneas (mais até do que a taxa de diversificação) (McPeck & Brown 2007; Marin  
1467 & Hedges 2016). Crocodilianos, com apenas aproximadamente 30 espécies viventes (representando  
1468 0.20% da atual biodiversidade de répteis não-aviários (Uetz et al. 2023), põe em dúvida o ponto de  
1469 vista da clássica “Hipótese do Tempo”. De acordo com este conceito, tempo e história são fatores que  
1470 contam na riqueza de espécies, desde que estas tenham tido mais tempo para evoluir (e.g., Axelrod,  
1471 1952; Cronquist, 1968; Willis, 1922; Jablonski et al. 2006).

1472           Por esta razão, a coloração CMA3/DAPI demonstrou que os genomas de crocodilos são  
1473 claramente compartimentalizados como em mamíferos, resultados similares foram observados em

1474 aves (revisado em Bernardi, 2007). Uma análise múltipla dos genomas de mamíferos, répteis aviários  
1475 e não-aviários revelou uma forte ligação entre a existência de microcromossomos e alto conteúdo em  
1476 GC em várias taxa (Janes et al. 2010). Crocodilianos são tradicionalmente apresentados como os  
1477 répteis que não possuem microcromossomos – caracterizados por tamanhos que variam de 0.5 – 2.5  
1478  $\mu\text{m}$  (Rodionov, 1996) ou mais precisamente maior que 1.5  $\mu\text{m}$  (Srikulnath et al. 2021). Nossos  
1479 resultados mostram que o menor par cromossômico se encaixa nessa variação e em conjunto com  
1480 (algumas partes de) vários cromossomos, eles são GC-ricos. Essa descoberta pode implicar que os  
1481 cromossomos corados mais intensamente em crocodilianos são homólogos aos microcromossomos  
1482 aviários originais e que eles retiveram algumas regiões intactas após eventos de fusão. De fato, isto  
1483 tem sido encontrado em várias espécies de aves onde fusões de microcromossomos são comuns,  
1484 falcoes e papagaios demonstraram que estes cromossomos não são propensos a quebra (O'Connor et  
1485 al. 2019).

1486 Clusters de DNAr únicos foram identificados em todas as espécies investigadas, como já é  
1487 típico na maioria dos répteis e aves (Porter et al., 1994; Sochorová et al., 2018; Degrandi et al., 2020)  
1488 (**Figura 12**). Com exceção das duas espécies de *Paleosuchus* (Alligatoridae) que tiveram três pares  
1489 cromossômicos carregando essas sequências, esse padrão geral foi observado em todas as espécies  
1490 de Alligatoridae (Oliveira et al. 2021). Devido a isso sugere-se que um único cromossomo contendo  
1491 um DNAr 18S foi preservado desde a separação de crocodilianos e aves há cerca de 220-250 Ma  
1492 (Kawagoshi et al. 2008). Todavia em aves estas sequências estão localizadas em um  
1493 microcromossomo, mas em crocodilianos eles são encontrados no cromossomo menor, reforçando a  
1494 hipótese de fusões cromossômicas nas espécies de crocodilianos.

1495 **Reorganização cromossômica em Crocodilianos: bastante tempo para poucas**  
1496 **mudanças.**

1497 A Pintura Cromossômica (WCP) forneceu *insights* na evolução cromossômica em répteis,  
1498 mas não revelou rearranjos de forma precisa ou forneceu informação da existência ou não de  
1499 microcromossomos (revisado em Deakin & Ezaz, 2019). Aqui, nós criamos quatro sondas de pinturas  
1500 cromossômicas e usamos em estudos de Zoo-FISH em diferentes espécies de crocodilianos. Nós  
1501 descobrimos quatro rearranjos cromossômicos (RCs) principais que ocorreram durante o processo de  
1502 diversificação do cariótipo. Nosso mapeamento combinado de DNAr, CMA3+ e Zoo-FISH nos  
1503 permitiu identificar precisamente os cromossomos implicados na maioria dos RCs que surgiram de

1504 um provável cariótipo ancestral  $2n = 32$ , levando as formas derivadas de  $2n = 30$  e  $2n = 38$  (**Figura**  
1505 **19**).

1506 Como mostrado na **Figura 19a**, nós propomos dois possíveis caminhos: 1) fusão simples entre  
1507 dois cromossomos acrocêntricos médios presentes no cariótipo  $2n = 32$ , reduzindo o  $2n$  ao originar  
1508 um par submetacêntrico grande que é encontrado em  $2n = 30$ ; 2) uma série de três fissões  
1509 cromossômicas (envolvendo os pares 1, 6 e 9 no cariótipo  $2n = 32$ ) aumenta o  $2n$ , mais inversões e  
1510 rearranjos ocorrem, originando o  $2n = 38$  de composição similar ao atual. Apesar de não examina-lo  
1511 aqui, é provável que um evento de fissão cromossômica no cariótipo  $2n = 32$  tenha resultado no  
1512 cariótipo  $2n = 34$ , que é encontrado em *C. porosus* e *C. niloticus*. Da mesma forma, não testamos  
1513 rigorosamente aqui e pode ser interessante investigar a sintenia do cromossomo formado por fusão  
1514 (cariótipo similar a 30 cromossomos) nas linhagens de Crocodylidae. De acordo com a atual hipótese  
1515 filogenética, essa fusão provavelmente evoluiu independentemente três vezes (em *C. rhombifer*, no  
1516 ancestral em comum de *C. siamensis* e *C. palustris* e no ancestral em comum da subfamília  
1517 Osteolaeminae). Mas, não está claro se sempre ocorre o mesmo tipo de RC (e.g., fusão cêntrica) ou  
1518 se este produto formado, deve-se a diferentes mecanismos que ocorreram em diferentes linhagens e  
1519 pesquisas futuras poderão testar uma provável predisposição a determinado tipo de RC.

1520 Em contraste, tartarugas demonstram altas taxas de evolução genômica, um número diploide  
1521 e um sistema sexual diversificado (XX/XY, ZZ/ZW e determinação sexual dependente de  
1522 temperatura (TSD) como resultado de diversos RCs (inversões e translocações) juntamente com uma  
1523 das maiores taxas de evolução em répteis. Todas essas características combinadas parecem estar  
1524 conectadas com mudanças ambientais globais, especialmente porque aumentos anteriores de  
1525 temperatura se mostraram críticos (Valenzuela & Adams, 2011; Bista & Valenzuela, 2020). Pelo que  
1526 sabemos até então, crocodilianos percorreram caminho evolutivo similar, porem demonstram  
1527 respostas completamente diferentes aos mesmos gatilhos, como demonstramos neste estudo e a razão  
1528 ainda permanece desconhecida.

1529 Kasai et al. (2012) usaram citometria de fluxo para criar sondas de WCP de todos os  
1530 macrocromossomos de *C. niloticus* e realizaram testes com Zoo-FISH para demonstrar a homologia  
1531 existente entre estes cromossomos com os cromossomos de galinha (*Gallus gallus domesticus*,  $2n =$   
1532 78) e com a tartaruga-de-orelhas-vermelhas (*Trachemys scripta elegans*,  $2n = 50$ ). De fato, já vem  
1533 sendo proposto que o cariótipo ancestral dos Diapsida era um cariótipo tipicamente parecido com de

1534 aves (com 40 pares cromossômicos, incluindo 30 microcromossomos) e o número diploide reduzido  
1535 no grupo coronal Crocodylia, considerando que o estado ancestral da ordem e de  $2n = 32$  (Srikulnath  
1536 et al., 2015). Da mesma forma, as espécies de *Alligator* possuem  $2n = 32$  e cariótipos constituídos  
1537 primariamente de cromossomos com dois braços (*A. mississippiensis* e *A. sinensis*). Após a separação  
1538 de Alligatorinae e Caimaninae, eventos de fissão ocorreram, resultando em cariótipos  $2n = 42$  que  
1539 são observados em todas as espécies de Caimaninae atualmente. Nosso estudo prévio com Zoo-FISH  
1540 demonstrou a homologia entre o maior par metacêntrico de ambas as espécies de *Alligator* com os  
1541 quatro menores pares acrocêntricos das espécies de Caimaninae, mostrando alguns dos cromossomos  
1542 implicados em tais RCs (Oliveira et al., 2021).

1543 Ao longo dos anos, a aplicação da técnica de WCP vem revelando a quantidade de  
1544 reorganização cromossômica em vários taxa de vertebrados. Vários trabalhos aplicaram diferentes  
1545 conjuntos de sondas de WCP e mostraram que extensivas reorganizações cromossômicas como fusão  
1546 em tandem e cêntrica, fissão, inversões paracêntricas e pericêntricas e mudanças na posição do  
1547 centrômero, fatores responsáveis pelas diferenças cariotípicas observadas em espécies intimamente  
1548 relacionadas (Ferguson-Smith & Trifonov, 2007; Noronha et al., 2009; Lemskaya et al., 2010;  
1549 Romanenko et al., 2012; Cioffi et al., 2013; entre outros). A maioria das descobertas em aves são  
1550 baseadas em comparações feitas com as sondas de *Gallus gallus*, indicando que os  
1551 macrocromossomos ancestrais foram rearranjados em diferentes padrões. Os resultados mostram que  
1552 o cariótipo das aves e na maioria das vezes preservado, com um número diploide que gira em torno  
1553 de 80, formado por 10 pares de macrocromossomos e 30 pares de microcromossomos (revisado em  
1554 Kretschmer et al. 2018). Todavia, uma reorganização considerável do genoma tem sido encontrada  
1555 em algumas ordens de Aves, incluindo Falconiformes (Nishida et al., 2008), Pelecaniformes (Wang  
1556 et al., 2022), Psittaciformes (Nanda et al., 2007; Furo et al., 2020), e Piciformes (Kretschmer et al.,  
1557 2020). Curiosamente, essas ordens possuem um baixo número de espécies: Falconiformes (65),  
1558 Pelecaniformes (118), Psittaciformes (403) e Piciformes (449). Passeriformes por outro lado (6533  
1559 espécies) (Gill et al., 2022), tem o número diploide típico de aves, com mínimos rearranjos  
1560 intercromossômicos (Kretschmer et al., 2018).

1561 Como resultado, especula-se que a preservação do padrão cariotípico original em  
1562 Passeriformes foi crítico para a bem-sucedida diversificação do clado (Kretschmer et al. 2021). Além  
1563 disso, as taxas de mudanças cromossômicas em macro- e microcromossomos varia.  
1564 Macrocromossomos estão mais envolvidos em rearranjos, particularmente os cinco primeiros pares

1565 autossômicos (GGA1-5) (Nishida et al., 2007; Kretschmer et al., 2018). Estes pontos de quebra para  
1566 rearranjos estão tipicamente associados a características genômicas como elementos transponíveis e  
1567 sequências não-codantes conservadas e que são comumente localizadas em macrocromossomos  
1568 (Skinner & Griffin, 2012; Farré et al., 2016). Por outro lado, microcromossomos como blocos  
1569 genômicos ricos em genes, tem sido preservado de forma substancial através da evolução em aves,  
1570 com apenas algumas ordens de aves sofrendo rearranjos nestes pequenos cromossomos (O'Connor  
1571 et al., 2019).

## 1572 **Conclusões**

1573 Crocodilianos são criaturas intrigantes, e quanto mais nós aprendemos sobre eles, mais  
1574 complexos eles parecem. Muitas das questões cruciais para nosso entendimento ainda não possuem  
1575 resposta, não apenas sobre seus cromossomos, mas também sobre a dinâmica genômica de forma  
1576 geral. A estrutura cariotípica e o  $2n$  conservado entre crocodilianos tem sido preservado no decorrer  
1577 de um longo período evolutivo, com pouquíssimas mudanças colineares. Porém, porque esse arranjo  
1578 cariotípico geral se manteve praticamente inalterado por milhões de anos? Este cenário contrasta com  
1579 os outros grupos de répteis como tartarugas, lagartos e cobras onde seus cariótipos foram modificados  
1580 por numerosos rearranjos cromossômicos, resultando em uma complexa variabilidade cariotípica,  
1581 incluindo o surgimento de diferentes sistemas sexuais heterogaméticos em machos e fêmeas (Deakin  
1582 & Ezaz, 2019).

1583 Aqui nós performamos um conjunto de técnicas citogenéticas investigativas modernas para  
1584 entender melhor quais os mecanismos evolutivos que ocorreram durante a evolução cromossômica  
1585 dos atuais crocodilos. Nós obtivemos um melhor entendimento da reorganização cariotípica que  
1586 ocorreu em uma hipotética condição ancestral ao combinar as técnicas de Zoo-FISH com  
1587 mapeamento de DNA repetitivo.

1588 Esta tendência em conservação citogenética nos crocodilianos pode estar relacionada com a  
1589 baixa diversidade de espécies existentes atualmente. O gavião e o falso-gavião (*Gavialis* e *Tomistoma*,  
1590 *Gavialidae*) exibem o mesmo padrão cariotípico  $2n = 32$  (Cohen & Gans 1970) estudado aqui e  
1591 permanece como o único grupo de Crocodylia ainda não revisitado com abordagens citogenéticas  
1592 modernas. Pesquisas futuras usando o mesmo conjunto de sondas irão demonstrar se possuem  
1593 prováveis homologias e assim completar o nosso entendimento sobre a evolução cromossômica em  
1594 Crocodylia.

## 1595 **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

1596           Esta tese, é o primeiro trabalho mais abrangente sobre caracterização citogenômica em  
1597 crocodilianos, utilizando mais da metade das espécies atuais distribuídas ao redor do mundo.  
1598 Utilizamos técnicas citogenéticas convencionais e moleculares para descrição da organização e  
1599 composição cariotípica das espécies, esclarecer como ocorre a evolução cromossômica no grupo e  
1600 contar um pouco a sua história evolutiva. Observamos uma certa tendência à conservação  
1601 cromossômica numérica entre as diferentes famílias, onde as mudanças que ocorreram foram  
1602 motivadas principalmente por uma série de rearranjos cromossômicos originados em condições  
1603 ancestrais, influenciando nos cariótipos atuais. A aparente estase cariotípica que observamos em  
1604 Crocodylia, assim como a ausência de cromossomos sexuais parece se refletir na baixa diversidade  
1605 atual de espécies. Principalmente ao compararmos com o registro fóssil já conhecido. Ainda assim  
1606 faz-se necessário ampliar a amostragem de espécies, e analisá-las de forma integrada com outras  
1607 abordagens como as ômicas, análises a nível populacional, e comparativa com outros membros da  
1608 mesma Classe para termos uma visão mais ampla e completa destes indivíduos, qual o reflexo neles  
1609 e no ambiente em que estão inseridos e usar como fonte para estudos de conservação, visto os  
1610 impactos causados pelo aquecimento global.

## 1611 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1612 Abbott, J.K.; Nordén, A.K.; Hansson, B. Sex chromosome evolution: historical insights and future  
1613 perspectives. *Proc. R. Soc. B* **2017**, *284*, 20162806.
- 1614 Adams, R.H.; Blackmon, H.; Reyes-Velasco, J.; Schield, D.R.; Card, D.C.; Andrew, A.L.; Waynewood, N.;  
1615 Castoe, T.A. Microsatellite landscape evolutionary dynamics across 450 million years of vertebrate  
1616 genome evolution. *Genome* **2016**, *59*, 295–310.
- 1617 Ahmad, S.F.; Singchat, W.; Jehangir, M.; Suntronpong, A.; Panthum, T.; Malaivijitnond, M.; Srikulnath, K.  
1618 Dark matter of primate genomes: Satellite DNA repeats and their evolutionary dynamics. *Cells* **2020**, *9*,  
1619 2714.
- 1620 Alfaro, M.E.; Santini, F.; Brock, C.; Alamillo, H.; Dornburg, A.; Rabosky, D.L.; Carnevale, G.; Harmon, L.J.  
1621 Nine exceptional radiations plus high turnover explain species diversity in jawed vertebrates. *Proc. Natl.*  
1622 *Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13410–13414.
- 1623 Alföldi, J.; Di Palma, F.; Grabherr, M.; Williams, C.; Kong, L.; Mauceli, E.; Russell, P.; Lowe, C.B.; Glor,  
1624 R.E.; Jaffe, J.D.; et al. The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and  
1625 mammals. *Nature* **2011**, *477*, 587–591.
- 1626 Amavet, P.; Siroski, P.; Donayo, P.; Medina, M. Karyotype of *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Reptilia,  
1627 Alligatoridae). In Proceedings of the 15th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group, Varadero,  
1628 Cuba, 17–20 January 2000; pp. 135–138.
- 1629 Amavet, P.; Markariani, R.; Fenocchio, A. Comparative cytogenetic analysis of the South American alligators  
1630 *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Reptilia, Alligatoridae) from Argentina. *Caryologia* **2003**, *56*,  
1631 489–493.
- 1632 Amavet, P.; Rosso, E.; Markariani, R.; Piña, C.I. Microsatellite DNA markers applied to detection of multiple  
1633 paternity in *Caiman latirostris* in Santa Fe, Argentina. *J. Exp. Zool.* **2008**, *309*, 637–642.
- 1634 Amavet, P.S.; Vilardi, J.C.; Rueda, E.C.; Larriera, A.; Saidman, B.O. Mating system and population analysis  
1635 of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) using microsatellite markers. *Amphib-Reptil.* **2012**, *33*,  
1636 83–93.
- 1637 Andreozzi, L.; Federico, C.; Motta, S.; Saccone, S.; Sazanova, A.L.; Sazanov, A.A.; Smirnov, A.F.; Galkina,  
1638 S.A.; Lukina, N.A.; Rodionov, A.V.; et al. Compositional mapping of chicken chromosomes and  
1639 identification of the gene-richest regions. *Chromosome Res.* **2001**, *9*, 521–532.
- 1640 Angelini, F.; Ghiara, G. Reproductive modes and strategies in vertebrate evolution. *Boll. Zool.* **1984**, *51*, 121–  
1641 203.
- 1642 Aprea, G.; Andreone, G.; Capriglione, T.; Odierna, V.; Vences, M. Evidence for a remarkable stasis of  
1643 chromosome evolution in Malagasy tree-frogs (*Boophis*: Mantellidae). *Ital. J. Zool.* **2004**, *2*, 237–243.
- 1644 Ariyaraphong, N.; Wongloet, W.; Wattanadilokchatkun, P.; Panthum, T.; Singchat, W.; Thong, T.; Lisachov,  
1645 A.; Ahmad, S. F.; Muangmai, N.; Han, K.; Duengkae, P.; Temsiripong, Y.; Srikulnath, K. Should the  
1646 identification guidelines for Siamese Crocodiles be revised? Differing post-occipital scute scale numbers  
1647 show phenotypic variation does not result from hybridization with Saltwater Crocodiles. *Biology* **2023**,  
1648 *12*, 535.
- 1649 Axelrod, D. I. A theory of Angiosperm evolution. *Evolution* **1952**, *1*, 29–60.
- 1650 Auer, H.; Mayr, B.; Lambrou, M.; Schleger, W. An extended chicken karyotype, including the NOR  
1651 chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.* **1987**, *45*, 218–221.
- 1652 Avise, J.C. Evolutionary perspectives on clonal reproduction in vertebrate animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
1653 **2015**, *112*, 8867–8873.

1654 Badenhorst, D.; Stanyon, R.; Engstrom, T.; Valenzuela, N. A ZZ/ZW microchromosome system in the spiny  
1655 softshell turtle, *Apalone spinifera*, reveals an intriguing sex chromosome conservation in Trionychidae.  
1656 *Chromosome Res.* **2013**, *21*, 137–147.

1657 Badenhorst, D.; Hillier, L.W.; Literman, R.; Montiel, E.E.; Radhakrishnan, S.; Shen, Y.; Minx, P.; Janes, D.E.;  
1658 Warren, W.C.; Edwards, S.V.; Valenzuela, N. Physical mapping and refinement of the painted turtle  
1659 genome (*Chrysemys picta*) inform amniote genome evolution and challenge turtle-bird chromosomal  
1660 conservation. *Genome Biol. Evol.* **2015**, *7*, 2038–2050.

1661 Balaguera-Reina, S.A.; Velasco, A. *Caiman crocodilus*. *IUCN Red List Threat. Species* **2019**, 2019,  
1662 E.T46584A3009688.

1663 Balaresque, P.; King, T.E.; Parkin, E.J.; Heyer, E.; Carvalho-Silva, D.; Kraaijenbrink, T.; de Knijff, P.; Tyler-  
1664 Smith, C.; Jobling, M.A. Gene conversion violates the stepwise mutation model for microsatellites in Y-  
1665 chromosomal palindromic repeats. *Hum. Mutat.* **2014**, *35*, 609–617.

1666 Barbazuk, W.B.; Bedell, J.A.; Rabinowicz, P.D. Reduced representation sequencing: A success in maize and  
1667 a promise for other plant genomes. *BioEssays* **2005**, *27*, 839-848.

1668 Barby, F.F.; Ráb, P.; Lavoué, S.; Ezaz, T.; Bertollo, L.A.C.; Kilian, A.; Maruyama, S.R.; de Oliveira, E.A.;  
1669 Artoni, R.A.; Santos, M.H. From chromosomes to genome: Insights into the evolutionary relationships  
1670 and biogeography of Old World knifefishes (Notopteridae; Osteoglossiformes). *Genes* **2018**, *9*, 306.

1671 Barby, F.F.; Bertollo, L.A.C.; de Oliveira, E.A.; Yano, C.F.; Hatanaka, T.; Ráb, P.; Sember, A.; Ezaz, T.;  
1672 Artoni, R.F.; Liehr, T.; et al. Emerging patterns of genome organization in Notopteridae species  
1673 (Teleostei, Osteoglossiformes) as revealed by Zoo-FISH and Comparative Genomic Hybridization  
1674 (CGH). *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1112.

1675 Barreiros, J.P. *Crocodylia: Uma Longa História de Sucesso Evolutivo*, 1st ed.; Atlântida Revista de Cultura:  
1676 Açores, Portugal, 2016; pp. 1–12.

1677 Beçak, W.; Beçak, M.L. Order: CROCODYLIA, Suborder: EUSUCHIA, Family: CROCODYLIDAE, *Caiman*  
1678 *crocodilus* (Linnaeus). *Folio R-15* **1971**, *1*, 1–3.

1679 Bernardi, G. The neoselectionist theory of genome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 8385–8390.

1680 Bezuijen, M.R.; Shwedick, B.; Simpson, B.K.; Staniewicz, A.; Stuebing, R. *Tomistoma schlegelii*. *IUCN Red*  
1681 *List Threat. Species* **2014**, 2014, E.T21981A2780499.

1682 Bittencourt, P.S.; Campos, Z.; Muniz, F.L.; Marioni, B.; Souza, B.C.; Da Silveira, R.; de Thoisy, B.; Hrbek,  
1683 T.; Farias, I.P. Evidence of cryptic lineages within a small South American crocodylian: The Schneider’s  
1684 dwarf caiman *Paleosuchus trigonatus* (Alligatoridae: Caimaninae). *PeerJ* **2019**, *7*, e6580.

1685 Bista, B.; Valenzuela, N. Turtle insights into the evolution of the reptilian karyotype and the genomic  
1686 architecture of sex determination. *Genes* **2020**, *11*, 416.

1687 Blackburn, D.G. Classification of the Reproductive Patterns of Amniotes. *Herpetol. Monogr.* **2000**, *14*, 371–  
1688 377.

1689 Bomfleur, B.; Decombeix, A.-L.; Schwendemann, A.B.; Escapa, I.H.; Taylor, E.L.; Taylor, T.N.; McLoughlin,  
1690 S. Habit and ecology of the petriellales, an unusual group of seed plants from the Triassic of Gondwana.  
1691 *Int. J. Plant. Sci.* **2014**, *175*, 1062–1075.

1692 Booth, W.; Levine, B.A.; Corush, J.B.; Davis, M.A.; Dwyer, Q.; Plecker, R.D.; Schuett, G.W. Discovery of  
1693 facultative parthenogenesis in a new world crocodile. *Biol. Lett.* **2023**, *19*, 1-6.

1694 Bouckaert, R.; Heled, J.; Kühnert, D.; Vaughan, T.; Wu, C.; Xie, D.; Suchard, M.A.; Rambaut, A.; Drummond,  
1695 A.J. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLOS Comput. Biol.* **2014**, *10*,  
1696 1–6.

1697 Brana, F.; Bea, A. Biomodalité de La Reproduction Chez *Lacerta vivipara* (Reptilia, Lacertidae). *Bull. Société*  
1698 *Herpétologique Fr.* **1987**, *44*, 1–5.

- 1699 Braz, H.B.; Scartozzoni, R.R.; Almeida-Santos, S.M. Reproductive Modes of the South American Water  
1700 Snakes: A Study System for the Evolution of Viviparity in Squamate Reptiles. *Zool. Anz. J. Comp. Zool.*  
1701 **2016**, *263*, 33–44.
- 1702 Brochu, C. Phylogenetic relationship and divergence timing of *Crocodylus*, based on morphology and the  
1703 fossil record. *Copeia* **2000**, *3*, 657–673.
- 1704 Brochu, C.A. Phylogenetic approaches toward Crocodylian history. *Annu. Rev. Earth and Planet. Sci.* **2003**,  
1705 *31*, 357–397.
- 1706 Brochu, C.A. A new miniature horned crocodile from the Quaternary of Aldraba Atoll Western Indian Ocean.  
1707 *Copeia* **2006**, *2*, 149–158.
- 1708 Brochu, C.A. Morphology relationships and biogeographical significance of an extinct horned crocodile  
1709 (*Crocodylia* *Crocodylidae*) from the Quaternary of Madagascar. *Zool. J. Linn. Soc.* **2007**, *150*, 835–863.
- 1710 Bronzati, M.; Montefeltro, F.C.; Langer, M.C. Diversification events and the effects of mass extinction on  
1711 *Crocodyliformes* evolutionary history. *R. Soc. Open Sci.* **2015**, *2*, 140385.
- 1712 Buffetaut, E. Systematique, origine et évolution des Gavialidae Sud-Américains. *Geobios Mém. Spec.* **1982**,  
1713 *6*, 127–40.
- 1714 Burnham, K.P.; Anderson, D.A. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic  
1715 approach, 2nd ed.; Springer: New York. 2002; p. 488.
- 1716 Burt, D.W. Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* **2002**, *96*, 97–112.
- 1717 Busack, S.D.; Pandya, S. Geographic variation in *Caiman crocodilus* and *Caiman yacare* (*Crocodylia*:  
1718 *Alligatoridae*): systematic and legal implications. *Herpetologica* **2001**, *57*, 294–312.
- 1719 Camper, J.D.; Hanks, B. Variation in the nucleolus organizer region among new world snakes. *J. Herpetol.*  
1720 **1995**, *29*, 468–471.
- 1721 Campos, Z.M.S. Observações sobre a biologia reprodutiva de três espécies de jacarés na Amazônia Central.  
1722 *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* **2003**, Corumbá: Embrapa Pantanal.
- 1723 Card, D.C.; Jennings, W.B.; Edwards, S.V. Genome evolution and the future of phylogenomics of non-avian  
1724 reptiles. *Animals* **2023**, *13*, 471.
- 1725 Chavananikul, V.; Wattanodorn, S.; Youngprapakorn, P. Karyotypes of 5 species of crocodile kept in  
1726 Samutprakan Crocodile Farm and Zoo. Pp. 58–62 in *Crocodyles. Proceedings of the 12th Working*  
1727 *Meeting of the IUCN-SSC Crocodile Specialist Group* **1994**, IUCN: Gland, Switzerland.
- 1728 Cioffi, M.B.; Martins, C.; Bertollo, L.A.C. Comparative chromosome mapping of repetitive sequences.  
1729 Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genet.* **2009**, *10*, 34.
- 1730 Cioffi, M.B.; Liehr, T.; Trifonov, V.; Molina, W.F.; Bertollo, L.A.C. Independent sex chromosome evolution  
1731 in lower vertebrates: a molecular cytogenetic overview in the Erythrinidae fish family. *Cytogenet.*  
1732 *Genome Res.* **2013**, *141*, 186–194.
- 1733 Cohen, M.M.; Clark, H.F. The somatic chromosomes of five crocodylian species. *Cytogenetics* **1967**, *6*, 193–  
1734 203.
- 1735 Cohen, M.M.; Gans, C. The chromosomes of the Order Crocodylia. *Cytogenetics* **1970**, *9*, 81–105.
- 1736 Colston, T.J.; Kulkarni, P.; Jetz, W.; Pyron, R.A. Phylogenetic and spatial distribution of evolutionary  
1737 diversification, isolation, and threat in turtles and crocodylians (non-avian archosauromorphs). *BMC Evol.*  
1738 *Biol.* **2020**, *20*, 1–16.
- 1739 Cordaux, R.; Batzer, M.A. The impact of retrotransposon on human genome evolution. *Nat. Rev. Genet.* **2009**,  
1740 *10*, 691–703.
- 1741 Cornejo-Páramo, P.; Dissanayake, D.S.B.; Lira-Noriega, A.; Martínez-Pacheco, M.L.; Acosta, A.; Ramírez-  
1742 Suástegui, C.; Méndez-de-la-Cruz, F.R.; Székely, T.; Urrutia, A.O.; Georges, A.; Cortez, D. Viviparous

1743 reptile regarded to have temperature-dependent sex determination has old XY chromosomes. *Genome*  
1744 *Biol. Evol.* **2020**, *12*, 924–930.

1745 Coutinho, M.; Campos, Z. História de vida do jacaré (*Caiman yacare*) no Pantanal. In: Nascimento, L.B.;  
1746 Oliveira, M.E. Herpetologia no Brasil II, Sociedade Brasileira de Herpetologia: Belo Horizonte. 2007;  
1747 pp. 278 – 294.

1748 Cronquist, A. *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. United States of America, Boston, 1968.

1749 Da Silveira, R.; Magnusson, W.E; Campos, Z. Monitoring the distribution, abundance and breeding areas of  
1750 *Caiman crocodilus crocodilus* and *Melanosuchus niger* in the Anavilhanas Archipelago, Central  
1751 Amazonia, Brazil. *Journal of Herpetology* **1997**, *31*, 514-520.

1752 Da Silveira, R.; Magnusson, W.E. Diets of Spectacled and Black caiman in the Anavilhanas Archipelago,  
1753 Central Amazonia, Brazil. *Journal of Herpetology* **1999**, *33*, 181-192.

1754 Da Silveira, R.; Thorbjarnarson, J.B. Conservation implications of commercial hunting of black and spectacled  
1755 caiman in the Mamirauá Sustainable Development Reserve, Brazil. *Biological Conservation* **1999**, *88*,  
1756 103-109.

1757 Da Silveira, R.; Marioni, B.E. GISD profile of *Caiman crocodilus*. **2010**.

1758 Da Silveira, R.; Ramalho, E.E.; Thorbjarnarson, J.B.; Magnusson, W.E. Depredation by jaguars on caimans  
1759 and importance of reptiles in the diet of jaguar. *Journal of Herpetology* **2010**, *44*, 418-424.

1760 Da Silveira, R.; Campos, Z.; Thorbjarnarson, J.; Magnusson, W.E. Growth rates of black caiman  
1761 (*Melanosuchus niger*) and spectacled caiman (*Caiman crocodilus*) from two different Amazonian flooded  
1762 habitats. *Amphibia-Reptilia* **2013**, *34*, 437-449.

1763 Dalzell, P.; Miles, L.G.; Isberg, S.R.; Glenn, T.C.; King, C.; Murtagh, V.; Moran, C. Standardized Reference  
1764 Ideogram for Physical Mapping in the Saltwater Crocodile (*Crocodylus porosus*). *Cytogenet. Genome*  
1765 *Res.* **2009**, *127*, 204–212.

1766 Damas, J.; Corbo, M.; Lewin, H.A. Vertebrate Chromosome Evolution. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2021**, *9*, 1-  
1767 27.

1768 Darevsky, I. Natural Parthenogenesis in Certain Subspecies of Rock Lizard, *Lacerta saxicola*. *Dokl. Akad.*  
1769 *Nauk SSSR* **1958**, *122*, 730–732.

1770 Davis, L.M.; Glenn, T.C.; Elsey, R.M.; Dessauer, H.C.; Sawyer, R.H. Multiple paternity and mating patterns  
1771 in the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Mol. Ecol.* **2001**, *10*, 1011-1024.

1772 Deakin, J.E.; Edwards, M.J.; Patel, H.; O'Meally, D.; Lian, J.; et al: Anchoring genome sequence to  
1773 chromosomes of the central bearded dragon (*Pogona vitticeps*) enables reconstruction of ancestral  
1774 squamate macrochromosomes and identifies sequence content of the Z chromosome. *BMC Genomics*  
1775 **2016**, *17*, 447.

1776 Deakin, J.E.; Ezaz, T. Understanding the evolution of reptile chromosomes through applications of combined  
1777 cytogenetics and genomics approaches. *Cytogenet. Genome Res.* **2019**, *157*, 7–20.

1778 Degrandi, T.M.; Barcellos, S.A.; Costa, A.L.; Garnero, A.D.V.; Hass, I.; Gunski, R.J. Introducing the bird  
1779 chromosome database: an overview of cytogenetic studies in birds. *Cytogenet. Genome Res.* **2020**, *160*,  
1780 199–205.

1781 Degrandi, T.M.; Gunski, R.J.; Garnero, A.V.; Oliveira, E.H.C.; Kretschmer, R.; Souza, M.S.; Barcellos, S.A.;  
1782 Hass, I. The distribution of 45S rDNA sites in bird suggests multiple evolutionary histories. *Genet. Mol.*  
1783 *Biol.* **2020**, *43*, e20180331.

1784 Dobigny, G.; Ducroz, J.F.; Robinson, T.J.; Volobouev, V. Cytogenetics and cladistics. *Syst. Biol.* **2004**, *53*,  
1785 470–484.

1786 Dodson, P. Functional and ecological significance of relative growth in *Alligator*. *J. Zool.* **1975**, *175*, 315-355.

- 1787 Eaton, M.J.; Martin, A.; Thorbjarnarson, J.; Amato, G. Species-level diversification of African dwarf  
1788 crocodiles (Genus *Osteolaemus*): a geographic and phylogenetic perspective. *Mol. Phylogenet. Evol.*  
1789 **2009**, *50*, 496–506.
- 1790 Ellegren, H. Evolutionary stasis: The stable chromosome of birds. *Trends Ecol. Evol.* **2010**, *25*, 283–291.
- 1791 Ellegren, H. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety.  
1792 *Nature Reviews Genetics* **2011**, *12*, 157–166.
- 1793 Erickson, G.M.; Gignac, P.M.; Lappin, A.K.; Vliet, K.A.; Brueggen, J.D.; Webb, G.J.W. A comparative  
1794 analysis of ontogenetic bite-force scaling among Crocodylia. *J. Zool.* **2014**, *292*, 48–55.
- 1795 Espinosa, E.; Godshalk, R.; Hall, P.; Thorbjarnarson, J.; Tucker, A.; Verdade, L. Species Accounts. In *Status*  
1796 *Survey and Conservation Action Plan: Revised Action Plan for Crocodiles*, 2nd ed.; Ross, P., Ed.;  
1797 IUCN/SSC Crocodile Specialist Group: Gland, Switzerland; Cambridge, UK, 1998; Volume 1, pp. 3–73.
- 1798 Ezaz, T.; Quinn, A.E.; Miura, I.; Sarre, S.D.; Georges, A.; Graves, J.A.M. The dragon lizard *Pogona vitticeps*  
1799 has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. *Chromosome Res.* **2005**, *13*, 763–776.
- 1800 Ezaz, T.; Valenzuela, N.; Grützner, F.; Miura, I.; Georges, A.; Burke, R.L.; Graves, J.A.M. An XX/XY sex  
1801 microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: *Chelidae*) with  
1802 genetic sex determination. *Chromosome Res.* **2006**, *14*, 139–150.
- 1803 Ezaz, T.; Moritz, B.; Waters, P.; Graves, J.A.M.; Georges, A.; Sarre, S.D. The ZW sex microchromosomes  
1804 of an Australian dragon lizard share no homology with those of other reptiles or birds. *Chromosome Res.*  
1805 **2009**, *17*, 965–973.
- 1806 Faircloth, B.C.; McCormack, J.E.; Crawford, N.G.; Harvey, M.G.; Brumfield, R.T.; Glenn, T.C.  
1807 Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary  
1808 timescales. *Systematic Biology* **2012**, *61*, 717–726.
- 1809 Faircloth, B.C.; Sorenson, L.; Santini, F.; Alfaro, M.E. A phylogenomic perspective on the radiation of Ray-  
1810 finned fishes based upon targeted sequencing of Ultraconserved Elements (UCEs). *PLoS ONE* **2013**, *8*,  
1811 e65923.
- 1812 Farias, I.P.; Da Silveira, R.; Thoisy, B.; Mongeló, L.A.; Thorbjarnarson, J.; Hrbek, T. Genetic diversity and  
1813 population structure of Amazonian crocodylians. *Animal Conservation* **2004**, *7*, 265–272.
- 1814 Farias, I.P.; Marioni, B.; Verdade, L.M.; Bassetti, L.; Coutinho, M.E.; Mendonça, S.H.S.T.; Vieira, T.Q.;  
1815 Magnusson, W.E.; Campos, Z. Avaliação do risco de extinção do jacaré-tinga *Caiman crocodilus*  
1816 (Linnaeus, 1758) no Brasil. In: *Avaliação do Estado de Conservação dos Crocodylianos. Biodiversidade*  
1817 *Brasileira* **2013**, *3*, 4–12.
- 1818 Farré, M.; Robinson, T.J.; Ruiz-Herrera, A. An integrative breakage model of genome architecture, reshuffling  
1819 and evolution. *Bioessays* **2015**, *37*, 479–488.
- 1820 Farré, M.; Narayan, J.; Slavov, G.T.; Damas, J.; Auvil, L.; Li, C.; Jarvis, E.D.; Burt, D.W.; Griffin, D.K.;  
1821 Larkin, D.M. Novel insights into chromosome evolution in birds, archosaurs, and reptiles. *Genome Biol.*  
1822 *Evol.* **2016**, *8*, 2442–2251.
- 1823 Ferguson-Smith, M.A.; Trifonov, V. Mammalian karyotype evolution. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 950–962.
- 1824 Figliuolo, V.S.P.; Goll, L.; Viana, P.F.; Feldberg, E.; Gross, M.C. First record on sex chromosomes in a species  
1825 of the family Cynodontidae: *Cynodon gibbus* (Agassiz, 1829). *Cytogenet. Genome Res.* **2020**, *160*, 29–  
1826 37.
- 1827 Fitch, W.M. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology. *Syst.*  
1828 *Zool.* **1971**, *20*, 406–416.
- 1829 Fredga, K.; Gropp, A.; Winking, H.; Frank, F. A hypothesis explaining the exceptional sex ratio in the wood  
1830 lemming (*Myopus schisticolor*). *Hereditas* **1977**, *85*, 101–104.

1831 Furo, I.O.; Kretschmer, R.; O'Brien, P.C.M.; Pereira, J.C.; Garnero, A.D.V.; Gunski, R.J.; O'Connor, R.E.;  
1832 Griffin, D.K.; Gomes, A.J.B.; Ferguson-Smith, M.A.; de Oliveira, E.H.C. Chromosomal evolution in the  
1833 phylogenetic context: a remarkable karyotype reorganization in neotropical Parrot *Myiopsitta monachus*  
1834 (Psittacidae). *Front. Genet.* **2020**, *11*, 721.

1835 Gaffaroglu, M.; Majtánová, Z.; Symonová, R.; Pelikánová, S.; Unal, S.; Lajbner, Z.; Ráb, P. Present and future  
1836 salmonid cytogenetics. *Genes* **2020**, *11*, 1462.

1837 Gamble, T.; Coryell, J.; Ezaz, T.; Lynch, J.; Scantlebury, D.P.; Zarkower, D. Restriction site-associated DNA-  
1838 sequencing (RAD-Seq) reveals an extraordinary number of transitions among Gecko Sex-determining  
1839 systems. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *32*, 1296-1309.

1840 Gamble, T.; Castoe, T.A.; Nielsen, S.V.; Banks, J.L.; Card, D.C.; Schield, D.R.; Schuett, G.W.; Booth, W.  
1841 The discovery of XY Sex Chromosomes in a Boa and Python. *Curr. Biol.* **2017**, *27*, 2148-2153.

1842 Garrick, R.C.; Bonatelli, I.A.S.; Hyseni, C.; Morales, A.; Pelletier, T.A.; Perez, M.F.; Rice, E.; Satler, J.D.;  
1843 Symula, R.E.; Thomé, M.T.C.; Carstens, B.C. The evolution of phylogeographic data sets. *Molecular*  
1844 *Ecology* **2015**, *24*, 1164-1171.

1845 Gill, F.; Donsker, D.; Rasmussen, P. IOC World Bird List (v121). <https://www.worldbirdnames.org/new/>.  
1846 2022, Acessado em 18 de Julho de 2022.

1847 Giovannotti, M.; Caputo, V.; O'Brien, P.C.; Lovell, F.L.; Trifonov, V.; Cerioni, P.N.; Olmo, E.; Ferguson-  
1848 Smith, M.A.; Rens, W. Skinks (Reptilia: Scincidae) have highly conserved karyotypes as revealed by  
1849 chromosome painting. *Cytogenet. Genome Res.* **2009**, *127*, 224–231.

1850 González, E.J.; Martínez-López, M.; Morales-Garduza, M.A.; García-Morales, R.; Charruau, P.; Gallardo-  
1851 Cruz, J.A. The sex determination pattern in crocodylians: A systematic review of three decades of  
1852 research. *J. Anim. Ecol.* **2019**, *88*, 1417–1427.

1853 Green, R.E.; Braun, E.L.; Armstrong, J.; Earl, D.; Nguyen, N.; Hickey, G.; Vandeweghe, M.W.; St. John, J.A.;  
1854 Capella-Gutiérrez, S.; Castoe, T.A. Three crocodylian genomes reveal ancestral patterns of evolution  
1855 among archosaurs. *Science* **2014**, *346*, 1254449.

1856 Gregory, T.R. Coincidence, Coevolution, or Causation? DNA Content, Cell size, and the C-Value Enigma.  
1857 *Biol. Rev.* **2001**, *76*, 65–101.

1858 Gregory, T.R. Genome Size Evolution in Animals. In *The Evolution of the Genome*; Gregory, T.R., Ed.;  
1859 Academic Press: Burlington, VT, USA, 2005; pp. 3–87. ISBN 978-0-12-301463-4.

1860 Grigg, G.; Gans, C. Morphology and physiology of the crocodylia. In: *Fauna of Australia, Amphibia and*  
1861 *Reptilia*. Australian Government Publishing Service: Canberra. 1993. pp. 326-336.

1862 Grigg, G.; Seebacher, F.; Franklin, C.E. (Eds.) *Crocodylian Biology and Evolution*, 1st ed.; Surrey Beatty:  
1863 Chipping Norton, Australia, 2001; p. 446.

1864 Grigg, G.; Kirshner, D. *Biology and evolution of Crocodylians*. Cornell University Press, Ithaca and London,  
1865 2015.

1866 Guerra, M.S. *Introdução à Citogenética Geral*. Guanabara Koogan. 1988. 144p.

1867 Hay, J.M.; Sarre, S.D.; Lambert, D.M.; Allendorf, F.W.; Daugherty, C.H. Genetic diversity and taxonomy: a  
1868 reassessment of species designation in tuatara (*Sphenodon*: Reptilia). *Conserv. Genet.* **2010**, *11*, 1063–  
1869 1081.

1870 Hedges, S.B.; Dudley, J.; Kumar, S. TimeTree: A Public Knowledge-Base of Divergence Times among  
1871 Organisms. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 2971–2972.

1872 Hekkala, E.; Shirley, M.H.; Amato, G.; Austin, J.D.; Charter, S.; Thorbjarnarson, J.; Vliet, K.A.; Houck, M.L.;  
1873 Desalle, R.; Blum, M.J. An ancient icon reveals new mysteries: Mummy DNA resurrects a cryptic species  
1874 within the Nile crocodile. *Mol. Ecol.* **2011**, *20*, 4199–4215.

1875 Hekkala, E.; Gatesy, J.; Narechania, A.; Meredith, R.; Russello, M.; Aardema, M.L.; Jensen, E.; Montanari, S.;  
1876 Brochu, C.; Norel, M.; Amato, G. Paleogenomics illuminates the evolutionary history of the extinct  
1877 Holocene “horned” crocodile of Madagascar *Voay robustus*. *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 505.

1878 Heulin, B. Données Nouvelles Sur Les Populations Ovipares de *Lacerta vivipara*. *C. R. Académie Sci. Sér. 3*  
1879 *Sci. Vie* **1988**, *306*, 63–68.

1880 Hickam, C.P.; Roberts, L.S.; Larson, A. Princípios integrados de zoologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,  
1881 2006.

1882 Hillier, L.W.; Miller, W.; Birney, E.; Warren, W.; Hardison, R.C.; Ponting, C.P.; Bork, P.; Burt, D.W.;  
1883 Groenen, M.A.M.; Delany, M.E.; Dodgson, J.B. Sequence and comparative análisis of the chicken  
1884 genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* **2004**, *432*, 695–716.

1885 Hrbek, T.; Vasconcelos, W.R.; Rebelo, G.; Farias, I.P. Phylogenetic relationships of south american  
1886 alligatorids and the *Caiman* of Madeira River. *Journal of Experimental Zoology* **2008**, 307A.

1887 Ijdo, J.W.; Wells, R.A.; Baldini, A.; Reeders, S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe  
1888 (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 4780.

1889 Iwabe, N.; Hara, Y.; Kumazawa, Y.; Shibamoto, K.; Saito, Y.; Miyata, T.; Katoh, K. Sister group relationship  
1890 of turtles to the bird-crocodilian clade revealed by nuclear DNA-coded proteins. *Mol. Biol. Evol.* **2005**,  
1891 *22*, 810–813.

1892 Jablonski, D.; Roy, K.; Valentine, J.W. Out of the tropics: evolutionary dynamics of the latitudinal diversity  
1893 gradient. *Science* **2006**, *314*, 102–106.

1894 Janes, D.E.; Organ, C.L.; Fujita, M.K.; Shedlock, A.M.; Edwards, S.V. Genome evolution in reptilia, the sister  
1895 group of mammals. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **2010**, *11*, 239–264.

1896 Janke, A.; Arnason, U. The complete mitochondrial genome of *Alligator mississippiensis* and the separation  
1897 between recent Archosauria (birds and crocodiles). *Mol. Biol. Evol.* **1997**, *14*, 1266–1272.

1898 Jetz, W.; Thomas, G.H.; Joy, J.B.; Hartmann, K.; Mooers, A.O. The global diversity of birds in space and time.  
1899 *Nature* **2012**, *491*, 444–448.

1900 Jiang, H.; Wu, X. *Alligator sinensis*. *IUCN Red List Threat. Species* **2018**, 2018.

1901 Johnson Pokorná, M.; Altmanová, M.; Rovatsos, M.; Velenský, P.; Vodička, R.; Reháč, I.; Kratochvíl, L. First  
1902 description of the karyotype and sex chromosomes in the Komodo dragon (*Varanus komodoensis*).  
1903 *Cytogenet. Genome Res.* **2016**, *148*, 284–291.

1904 Kapusta, A.; Suh, A.; Feschotte, C. Dynamics of genome size evolution in birds and mammals. *Proc. Natl.*  
1905 *Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 1–10.

1906 Kasahara, S. *Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados*. Sociedade Brasileira de Genética:  
1907 Ribeirão Preto. 2009. 160p.

1908 Kasai, F.; O’Brien, P.C.M.; Martin, S.; Ferguson-Smith, M.A. Extensive homology of chicken  
1909 macrochromosomes in the karyotypes of *Trachemys scripta elegans* and *Crocodylus niloticus* revealed  
1910 by chromosome painting despite long divergence times. *Cytogenet. Genome Res.* **2012**, *136*, 303–307.

1911 Kawagoshi, T.; Nishida, C.; Ota, H.; Kumazawa, Y.; Endo, H.; Matsuda, Y. Molecular structures of  
1912 centromeric heterochromatin and karyotypic evolution in the Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*)  
1913 (Crocodylidae, Crocodylia). *Chromosome Res.* **2008**, *16*, 1119–1132.

1914 Kawai, A.; Nishida-Umehara, C.; Ishijima, J.; Tsuda, Y.; Ota, H.; Matsuda, Y. Different origins of bird and  
1915 reptile sex chromosomes inferred from comparative mapping of chicken Z-linked genes. *Cytogenet.*  
1916 *Genome Res.* **2007**, *117*, 92–102.

1917 Kichigin, I.G.; Giovannotti, M.; Makunin, A.I.; Ng, B.L.; Kabilov, M.R.; Tupikin, A.E.; Barucchi, V.C.;  
1918 Splendiani, A.; Ruggeri, P.; Rens, W.; O’Brien, P.C.M.; Ferguson-Smith, M.A.; Graphodatsky, A.S.;

1919 Trifonov, V.A. Evolutionary dynamics of *Anolis* sex chromosomes revealed by sequencing of flow  
1920 sorting-derived microchromosome-specific DNA. *Mol. Genet Genomics* **2016**, *291*, 1955–1966.

1921 Kilian, A.; Wenzl, P.; Huttner, E.; Carling, J.; Xia, L.; Blois, H.; Caig, V.; Heller-Uszynska, K.; Jaccoud, D.;  
1922 Hopper, C.; Aschenbrenner-Kilian, M.; Evers, M.; Peng, K.; Cayla, C.; Hok, P.; Uszynski, G. Diversity  
1923 Arrays Technology: A Generic Genome Profiling Technology on Open Platforms. *Methods Mol. Biol.*  
1924 **2012**, 67–89.

1925 King, F.W.; Burke, R.L. *Crocodylian, tuatara, and turtle species of the world: a taxonomic and geographic*  
1926 *reference*. Association Systematics Collections: Washington, DC, 1989.

1927 King, M. Chromosome change and speciation in lizards. In *Essays on Evolution and Speciation in Honour of*  
1928 *M. J. D.*, 1st ed.; Atchley, W.R., Woodruff, D.S., Eds.; Cambridge University Press: London, UK, 1981;  
1929 pp. 262–285.

1930 King, M.; Honeycutt, R.; Contreras, N. Chromosomal repatterning in crocodiles: C, G, and N-banding and the  
1931 in situ hybridization of 18S and 26S rRNA cistrons. *Genetica* **1986**, *70*, 191–201.

1932 King, M. *Species Evolution: The Role of Chromosome Change*, 3rd ed.; Cambridge University Press:  
1933 Cambridge, UK, 1995; p. 322.

1934 Koubová, M.; Pokorná, M.J.; Rovatsos, M.; Farkačová, K.; Altmanová, M.; Kratochvíl, L. Sex determination  
1935 in Madagascar geckos of the genus *Paroedura* (Squamata: Gekkonidae) are differentiated sex  
1936 chromosomes indeed so evolutionary stable? *Chromosome Res.* **2014**, *22*, 441–452.

1937 Kostmann, A.; Kratochvíl, L.; Rovatsos, M. Poorly differentiated XX/XY sex chromosomes are widely shared  
1938 across skink radiation. *Proc. R Soc. B* **2021**, *288*(1943):20202139.

1939 Kosyakova, N.; Liehr, T.; Al-Rikabi, A. FISH-microdissection. In *Fluorescence in Situ Hybridization*  
1940 *(FISH)—Application Guide*, 2nd ed.; Liehr, T., Ed.; Springer: Berlin, Germany, 2017; Volume 1, pp. 81–  
1941 99.

1942 Kratochvíl, L.; Gamble, T.; Rovatsos, M. Sex chromosome evolution among amniotes: Is the origin of sex  
1943 chromosomes nonrandom? *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2021**, doi:10.1098/rstb.2020.0108.

1944 Kretschmer, R.; Ferguson-Smith, M.A.; de Oliveira, E.H.C. Karyotype evolution in birds: from conventional  
1945 staining to chromosome painting. *Genes* **2018**, *9*, 181.

1946 Kretschmer, R.; Furo, I.O.; Cioffi, M.B.; Gunski, R.J.; Garner, A.D.V.; O'Brien, P.C.M.; Ferguson-Smith,  
1947 M.A.; de Freitas, T.R.O.; de Oliveira, E.H.C. Extensive chromosomal fissions and repetitive DNA  
1948 accumulation shaped the atypical karyotypes of two Ramphastidae (Aves: Piciformes) species. *Biol. J.*  
1949 *Linn. Soc.* **2020**, *130*, 839–849.

1950 Kretschmer, R.; Rodrigues, B.S.; Barcellos, S.A.; Costa, A.L.; Cioffi, M.B.; Garner, A.V.; Gunski, R.J.; de  
1951 Oliveira, E.H.C.; Griffin, D.K. Karyotype evolution and genomic organization of repetitive DNAs in the  
1952 saffron finch *Sicalis flaveola* (Passeriformes Aves). *Animals* **2021**, *11*, 1456.

1953 Kubat, Z.; Hobza, R.; Vyskot, B.; Kejnovsky, E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene*  
1954 *latifolia*. *Genome* **2008**, *51*, 350–356.

1955 Kumar, S.; Stecher, G.; Suleski, M.; Hedges, S.B. TimeTree: A Resource for Timelines, Timetrees, and  
1956 Divergence Times. *Mol. Biol. Evol.* **2017**, *34*, 1812–1819.

1957 Kumar, S.; Suleski, M.; Craig, J.E.; Kasprowitz, A.E.; Sanderford, M.; Li, M.; Stecher, G.; Hedges, S.B.  
1958 TimeTree 5: An expanded resource for species divergence times. *Mol. Bio. Evol.* **2022**.

1959 Kuraku, S.; Ishijima, J.; Nishida-Umehara, C.; Agata, K.; Kuratani, S.; Matsuda, Y. cDNA-based gene  
1960 mapping and GC3 profiling in the soft-shelled turtle suggest a chromosomal size-dependent GC bias  
1961 shared by sauropsids. *Chromosome Res.* **2006**, *14*, 187–202.

1962 Lafferriere, N.A.R.; Antelo, R.; Alda, F.; Mårtensson, D.; Hailer, F.; Castroviejo-Fisher, S.; Ayarzagüena, J.;  
1963 Ginsberg, J.R.; Castroviejo, J.; Doadrio, I.; Vilá, C.; Amato, G. Multiple paternity in a reintroduced

- 1964 population of the Orinoco Crocodile (*Crocodylus intermedius*) at the El Frío Biological Station,  
1965 Venezuela. *PLoS One*, **2016**, *11*, e0150245.
- 1966 Lavoué, S. Was Gondwanan breakup the cause of the intercontinental distribution of Osteoglossiformes? A  
1967 time-calibrated phylogenetic test combining molecular, morphological, and paleontological evidence.  
1968 *Mol. Phylogenet. Evol.* **2016**, *99*, 34–43.
- 1969 Lee, M.S.Y.; Yates, A.M. Tip-dating and homoplasy: Reconciling the shallow molecular divergences of  
1970 modern gharials with their long fossil record. *Proc. R. Soc. B.* **2018**, *285*, 20181071.
- 1971 Lemmon, E.M.; Lemmon, A.R. High-throughput genomic data in systematics and phylogenetics. *Annu. Rev.*  
1972 *Ecol. Evol. Syst.* **2013**, *44*, 99–121.
- 1973 Lemskaya, N.A.; Romanenko, S.A.; Golenishchev, F.N.; Rubtsova, N.V.; Sablina, O.V.; Serdukova, N.A.;  
1974 O'Brien, P.C.M.; Fu, B.; Yiğit, N.; Ferguson-Smith, M.A.; Yang, F.; Graphodatsky, A.S. Chromosomal  
1975 evolution of Arvicolinae (Cricetidae Rodentia) III Karyotype relationships of ten *Microtus* species.  
1976 *Chromosome Res.* **2010**, *18*, 459–471.
- 1977 Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*  
1978 **1964**, *52*, 201–220.
- 1979 Lim, K.Y.; Kovarik, A.; Matyasek, R.; Chase, M.W.; Clarkson, J.J.; Grandbastien, M.A.; Leitch, A.R.  
1980 Sequence of events leading to near-complete genome turnover in allopolyploid *Nicotiana* within five  
1981 million years. *New Phytol.* **2007**, *175*, 756–763.
- 1982 Lowe, C.H.; Wright, J.W. Evolution of Parthenogenetic Species of *Cnemidophorus* (Whiptail Lizards) in  
1983 Western North America. *J. Ariz. Acad. Sci.* **1966**, *4*, 81–87.
- 1984 Lui, J.F.; Valencia, E.F.T.; Boer, J.A. Karyotypic analysis and chromosome biometry of cell cultures of the  
1985 yellow throated alligator (*Caiman latirostris* DAUDIN). *Rev. Brasil. Genet.* **1994**, *17*, 165–169.
- 1986 Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Moreira-Filho, O.; Margarido V.P. Propidium iodide for making heterochromatin  
1987 more evidente in the C-banding technique. *Biotech. Histochem.* **2012**, *87*, 433–438.
- 1988 Maddison, W.P.; Maddison, D.R. (2018) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.4.  
1989 <https://www.mesquiteproject.org>. Acessado em 10 de Fevereiro de 2019.
- 1990 Magnusson, W.E.; da Silva, E.V.; Lima, A.P. Diets of Amazonian Crocodylians. *J. Herpetol.* **1987**, *21*, 85–95.
- 1991 Magnusson, W.E.; Lima, A.P. The ecology of a cryptic predator, *Paleosuchus trigonatus*, in a tropical  
1992 rainforest. *J. Herpetol.* **1991**, *25*, 41–48.
- 1993 Majka, J.; Majka, M.; Kwiatek, M.; Wísniowska, H. Similarities and differences in the nuclear genome  
1994 organization within Pooideae species revealed by comparative genomic in situ hybridization (GISH). *J.*  
1995 *Appl. Genet.* **2017**, *58*, 151–161.
- 1996 Mandáková, T.; Joly, S.; Krzywinski, M.; Mummenhoff, K.; Lysak, M.A. Fast diploidization in close  
1997 mesopolyploid relatives of *Arabidopsis*. *Plant. Cell* **2010**, *22*, 2277–2290.
- 1998 Mank, J.E.; Ellegren, H. Parallel divergence and degradation of the avian W sex chromosome. *Trends Ecol.*  
1999 *Evol.* **2007**, *22*(8):389–391
- 2000 Marin, J.; Hedges, S.B. Time best explains global variation in species richness of amphibians, birds and  
2001 mammals. *J. Biogeogr.* **2016**, *43*, 1069–1079.
- 2002 Marioni, B.; Da Silveira, R.; Magnusson, W.E.; Thorbjarnarson, J. Feeding behavior of two sympatric Caiman  
2003 species, *Melanosuchus niger* and *Caiman crocodilus*, in the Brazilian Amazon. *J. Herpetol.* **2008**, *42*,  
2004 768–772.
- 2005 Marioni, B.; Farias, I.; Verdade, L.M.; Bassetti, L.; Coutinho, M.E.; Mendonça, S.H.S.T.; Vieira, T.Q.;  
2006 Magnusson, W.E.; Campos, Z. Avaliação de risco de extinção do jacaré-açu *Melanosuchus niger* (Spix,  
2007 1825) no Brasil *Bio. Brasil* **2013**, *1*, 31–39.

- 2008 Marioni, B.; Magnusson, W.E.; Vogt, R.C.; Villamarín, F. Home range and movement patterns of male dwarf  
2009 caimans (*Paleosuchus palpebrosus* and *Paleosuchus trigonatus*) living in sympatry in Amazonian  
2010 floodpains streams. *Neotrop. Biodivers.* **2022**, *8*, 156-166.
- 2011 Martin, S. Global diversity of crocodiles (*Crocodylia*, Reptilia) in freshwater. *Hydrobiologia* **2008**, *595*, 587–  
2012 591.
- 2013 Martinez, P.A.; Ezaz, T.; Valenzuela, N.; Georges, A.; Graves, J.A.M. An XX/XY heteromorphic sex  
2014 chromosome system in the Australian chelid turtle *Emydura macquarii*: A new piece in the puzzle of sex  
2015 chromosome evolution in turtles. *Chromosome Res.* **2008**, *16*, 815–825.
- 2016 Matsubara, K.; Gamble, T.; Matsuda, Y.; Zarkower, D.; Sarre, S.D.; Georges, A.; Graves, J.A.M.; Ezaz, T.  
2017 Non-homologous sex chromosomes in two geckos (Gekkonidae: Gekkota) with female heterogamety.  
2018 *Cytogenet. Genome Res.* **2014**, *143*, 251–258.
- 2019 Matsuoka, M.P.; Gharrett, A.J.; Wilmot, R.L.; Smoker, W.W. Genetic linkage mapping of allozyme loci in  
2020 even- and odd-year pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *J. Hered.* **2004**, *95*, 421–429.
- 2021 Matthey, R.; van Brink, J.M. Sex chromosomes in Amniota. *Evolution* **1957**, *11*, 163–165.
- 2022 Matzke, N.J. Probabilistic historical biogeography: new models for founder-event speciation, imperfect  
2023 detection, and fossils allow improved accuracy and model-testing. *Front. Biogeogr.* **2013**, *5*, 242–248.
- 2024 Mazzoleni, S.; Augstenová, B.; Clemente, L.; Auer, M.; Fritz, U.; Prschag, P.; Protiva, T.; Velenský, P.;  
2025 Kratochvíl, L.; Rovatsos, M. Sex is determined by XX/XY sex chromosomes in Australasian side-necked  
2026 turtles (Testudines: Chelidae). *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4276.
- 2027 McAliley, L.R.; Willis, R.E.; Ray, D.A.; White, P.S.; Brochu, C.A.; Densmore, L.D. Are crocodiles really  
2028 monophyletic? — Evidence for subdivisions from sequence and morphological data. *Mol. Phylogenet.*  
2029 *Evol.* **2006**, *39*, 16–32.
- 2030 McCormack, J.E.; Hird, S.M.; Zellmer, A.J.; Carstens, B.C.; Brumfield, R.T. (2013). Applications of next-  
2031 generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**,  
2032 *66*(2), 526–538.
- 2033 McQueen, H.A.; Siriaco, G.; Bird, A.P. Chicken microchromosomes are hyperacetylated, early replicating,  
2034 and gene rich. *Genome Res.* **1998**, *8*, 621–630.
- 2035 McPeck, M.A.; Brown, J.A. Clade age and not diversification rate explains species richness among Animal  
2036 taxa. *Am. Nat.* **2007**, *169*, 4.
- 2037 McVay, J.D.; Rodriguez, J.D.; Rainwater, T.R.; Dever, J.A.; Platt, S.G.; McMurry, S.T.; Forstner, M.R.J.;  
2038 Densmore III, L.D. Evidence of multiple paternity in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) in  
2039 Belize, CA, inferred from microsatellite markers. *J. Exp. Zool.* **2008**, *309*, 643-648.
- 2040 Meredith, R.W.; Hekkala, E.R.; Amato, G.; Gatesy, J. A phylogenetic hypothesis for *Crocodylus* (Crocodylia)  
2041 based on mitochondrial DNA: Evidence for a trans-Atlantic voyage from Africa to the New World. *Mol.*  
2042 *Phylogenet. Evol.* **2011**, *60*, 183–191.
- 2043 Milián-García, Y.; Venegas-Anaya, M.; Frías-Soler, R.; Crawford, A.J.; Ramos-Targarona, R.; Rodríguez-  
2044 Soberón, R.; Alonso-Tabet, M.; Thorbjarnarson, J.; Sanjur, O. I.; Espinosa-López, G.; Bermingham, E.  
2045 Evolutionary history of Cuban Crocodiles *Crocodylus rhombifer* and *Crocodylus acutus* inferred from  
2046 multilocus markers. *J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol.* **2011**, *315*, 358–375.
- 2047 Milián-García, Y.; Jensen, E.L.; Mena, S.R.; Fleitas, E.P.; Rodríguez, G.S.; Manchena, L.G.; López, G.E.;  
2048 Russelo, M.A. Genetic evidence for multiple paternity in the critically endangered Cuban crocodile  
2049 (*Crocodylus rhombifer*). *Amphib-reptil.* **2016**, *37*, 273-281.
- 2050 Müller, J.; Reisz, R.R. Four well-constrained calibration points from the vertebrate fossil record for molecular  
2051 clock estimates. *BioEssays* **2005**, *27*, 1069–1075.

2052 Molina, W.F. Chromosomal changes and stasis in marine fish groups. In *Fish Cytogenetics*, 1st ed.; Pisano,  
2053 E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2007; pp. 69–  
2054 110.

2055 Moorhead, P. S.; Nowell, P.C.; Mellmam, W.J.; Battips, D.M.; Hungerford, D.A. Chromosome Preparations  
2056 of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood. *Exp. Cell Res.* **1960**, *20*, 613-616.

2057 Montiel, E.E.; Badenhorst, D.; Tamplin, J.; Burke, R.L.; Valenzuela, N. Discovery of the youngest sex  
2058 chromosomes reveals first case of convergent co-option of ancestral autosomes in turtles. *Chromosoma*  
2059 **2016**, *126*, 105–113.

2060 Muniz, F.L.; Da Silveira, R.; Campos, Z.; Magnusson, W.E.; Hrbek, T.; Farias, I.P. Multiple paternity in the  
2061 Black Caiman (*Melanosuchus niger*) population in the Anavilhanas National Park, Brazilian Amazonia.  
2062 *Amphib-reptil.* **2011**, *32*, 428-434.

2063 Muniz, F.L.; Campos, Z.; Rangel, S.M.H.; Martínez, J.G.; Souza, B.C.; De Thoisy, B.; Botero-Arias, R.;  
2064 Hrbek, T.; Farias, I.P. Delimitation of evolutionary units in Cuvier's dwarf caiman, *Paleosuchus*  
2065 *palpebrosus* (Cuvier, 1807): Insights from conservation of a broadly distributes species. *Conserv. Genet.*  
2066 **2018**, *19*, 599–610.

2067 Muniz, F.L.; Ximenes, A.M.; Bittencourt, P.S.; Hernández-Rangel, S.M.; Campos, Z.; Hrbek, T.; Farias, I.P.  
2068 Detecting population structure of *Paleosuchus trigonatus* (Alligatoridae: Caimaninae) through  
2069 microsatellites markers developed by next generation sequencing. *Mol. Biol. Rep.* **2019**, *46*, 1–12.

2070 Nicholas, F.W. *Introdução à Genética Veterinária*. Artmed. 1999. 347 p.

2071 Nanda, I.; Karl, E.; Griffin, D.K.; Schartl, M.; Schmid, M. Chromosome repatterning in three representative  
2072 parrots (Psittaciformes) inferred from comparative chromosome painting. *Cytogenet. Genome Res.* **2007**,  
2073 *117*, 43–53.

2074 Nicolai, M.P.J.; Matzke, N.J. Trait-based range expansion aided in the global radiation of Crocodylidae. *Glob.*  
2075 *Ecol. Biogeogr.* **2019**, *28*, 1244–1258.

2076 Nishida, C.; Tsuda, Y.; Ishijima, J.; Ando, J.; Fujiwara, A.; Matsuda, Y.; Griffin, D.K. The molecular basis of  
2077 chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds. *Chromosome Res.*  
2078 **2007**, *15*, 721–734.

2079 Nishida, C.; Ishijima, J.; Kosaka, A.; Tanabe, H.; Habermann, F.A.; Griffin, D.K.; Matsuda, Y.  
2080 Characterization of chromosome structures of Falconinae (Falconidae, Falconiformes, Aves) by  
2081 chromosome painting and delineation of chromosome rearrangements during their differentiation.  
2082 *Chromosome Res.* **2008**, *16*, 171–181.

2083 Noronha, R.C.R.; Nagamachi, C.Y.; O'Brien, P.C.M.; Ferguson-Smith, M.A.; Pieczarka, J.C.N. Neo-XY  
2084 body: an analysis of XY1Y2 meiotic behavior in *Carollia* (Chiroptera, Phyllostomidae) by chromosome  
2085 painting. *Cytogenet. Genome Res.* **2009**, *124*, 37–43.

2086 Norris, T.B.; Rickards, G.K.; Daugherty, C.H. Chromosomes of tuatara, *Sphenodon*, a chromosome  
2087 heteromorphism and an archaic reptilian karyotype. *Cytogenet. Genome Res.* **2004**, *105*, 93–99.

2088 O'Connor, R.E.; Kiazim, L.; Skinner, B.; Fonseka, G.; Joseph, S.; Jennings, R.; Larkin, D.M.; Griffin, D.K.  
2089 Patterns of microchromosome organization remain highly conserved throughout avian evolution.  
2090 *Chromosoma* **2019**, *128*, 21–29.

2091 O'Meally, S.; Patel, H.R.; Stiglec, R.; Sarre, S.D.; Georges, A.; Graves, J.A.M.; Ezaz, T. Non-homologous  
2092 sex chromosomes of birds and snakes share repetitive sequences. *Chromosome Res.* **2010**, *18*, 787–800.

2093 Oaks, J.R. A time-calibrated species tree of Crocodylia reveals a recent radiation of the true crocodiles.  
2094 *Evolution* **2011**, *65*, 3285–3297.

2095 Ohno, S. Sex Chromosomes and Sex-linked Genes. In *Monographs on Endocrinology*, 1st ed.; Labhart, A.,  
2096 Mann, T., Samuels, L.T., Zander, J., Eds.; Springer: Berlin, Germany; New York, NY, USA, 1967;  
2097 Volume 1, pp. 33–46.

2098 Ojeda, G.N.; Amavet, P.S.; Rueda, E.C.; Siroski, P.A.; Larriera, A. Mating system of *Caiman yacare* (Reptilia:  
2099 Alligatoridae) described from microsatellite genotypes. *J. Hered.* **2017**, *108*, 135-141.

2100 Oliveira, D.P.; Farias, I.P.; Marioni, B.; Campos, Z.; Hrbek, T. Microsatellite markers for mating system and  
2101 population analyses of the spectacled caiman *Caiman crocodilus* (Linnaeus 1758). *Conserv. Genet.*  
2102 *Resour.* **2010**, *2*, 181-184.

2103 Oliveira, D.P.; Marioni, B.; Farias, I.P.; Hrbek, T. Genetic evidence for polygamy as a mating strategy in  
2104 *Caiman crocodilus*. *J. Hered.* **2014**, *105*, 485-492.

2105 Oliveira, V.C.S.; Altmanová, M.; Viana, P.F.; Ezaz, T.; Bertollo, L.A.C.; Ráb, P.; Liehr, T.; Al-Rikabi, A.;  
2106 Feldberg, E.; Hatanaka, T.; Scholz, S.; Meurer, A.; Cioffi, M.B. Revisiting the karyotypes of Alligators  
2107 and Caimans (Crocodylia, Alligatoridae) after a half-century delay: bridging the gap in the chromosomal  
2108 evolution of Reptiles. *Cells* **2021**, *10*, 1397.

2109 Oliveira, V.C.S.; Viana, P.F.; Gross, M.C.; Feldberg, E.; Da Silveira, R.; Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C.;  
2110 Schneider, C.H. Looking for genetic effects of polluted anthropized environments on *Caiman crocodilus*  
2111 *crocodilus* (Reptilia, Crocodylia): A comparative genotoxic and chromosomal analysis. *Ecotoxicol.*  
2112 *Environ. Saf.* **2021**, *209*, 111835.

2113 Olmo, E.A. Reptilia. In *Animal Cytogenetics. Chordata 3*, 1st ed.; John, B., Ed.; Gebrueder Borntraeger:  
2114 Berlin, Germany; Stuttgart, Germany, 1986; Volume 4, pp. 1–100.

2115 Olmo, E. Rate of chromosome changes and speciation in reptiles. *Genetica* **2005**, *125*, 185–203.

2116 Olmo, E. Trends in the evolution of reptilian chromosomes. *Integr. Comp. Biol.* **2008**, *48*, 486–493.

2117 Olmo, E.; Signorino, G.G. Chromorep: A Reptile Chromosomes Database. Available online:  
2118 <http://chromorep.univpm.it/?q=node/13> (acessado em 15 de Dezembro de 2019).

2119 Olmo, E.; Signorino, G.G. Chromorep: A Reptile Chromosomes Database. Available online:  
2120 <http://chromorep.univpm.it/?q=node/13> (acessado em 24 de Agosto de 2020).

2121 Olmo, E.; Signorino, G.G. Chromorep: A Reptile Chromosomes Database. Available online:  
2122 <http://chromorep.univpm.it/?q=node/13> (acessado em 08 de Março de 2022).

2123 Ouboter, P.E.; Nanho, L.M.R. An ecological study of *Caiman crocodilus crocodilus* in northern Suriname.  
2124 Unpublished. MS Thesis, 233, Zoöl. Lab. Afd. Dieroecologie, Kath. Univ. Nijmegen. 1984.

2125 Ouboter, P. E. *Ecological Studies on Crocodylians in Suriname: Niche Segregation and Competition in Three*  
2126 *Predators*. SPB Academic Publishing: Amsterdam and New York. 1996.

2127 Pan, T.; Miao, J.-S.; Zhang, H.-B.; Yan, P.; Lee, P.-S.; Jiang, X.-Y.; Ouyang, J.-H.; Deng, Y.-P.; Zhang, B.-  
2128 W.; Wu, X.-B. Near-complete phylogeny of extant Crocodylia (Reptilia) using mitogenome-based data.  
2129 *Zool. J. Linn. Soc.* **2021**, *191*, 1075–1089.

2130 Pasquesi, G.I.M.; Adams, R.H.; Card, D.C.; Schield, D.R.; Corbin, A.B.; Perry, B.W.; Reyes-Velasco, J.;  
2131 Ruggiero, R.P.; Vandeweghe, M.W.; Shortt, J.A.; et al. Squamate reptiles challenge paradigms of genomic  
2132 repeat element evolution set by birds and mammals. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2774.

2133 Pendás, A.M.; Morán, P.; Freije, J.P.; Garcia-Vásquez, E. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of  
2134 two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet. Cell Genet.* **1994**, *67*, 31–36.

2135 Pereira, A. C.; Malvasio, A. Síntese das características da ordem Crocodylia. *Biota Amazônia*, v.4, n.1, **2014**,  
2136 111-118.

2137 Perry, B.W.; Schield, D.R.; Adams, R.H.; Castoe, T.A. Microchromosomes exhibit distinct features of  
2138 vertebrate chromosome structure and function with underappreciated ramifications for genome evolution.  
2139 *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 904–910.

2140 Pokorná, M.; Kratochvíl, L. Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex  
2141 chromosomes an evolutionary trap? *Zool. J. Linn. Soc.* **2009**, *156*, 168-183.

2142 Pokorná, M.; Giovannotti, M.; Kratochvíl, L.; Caputo, V.; Olmo, E.; Ferguson-Smith, M.A.; Rens, W.  
2143 Conservation of chromosomes syntenic with avian autosomes in squamate reptiles revealed by  
2144 comparative chromosome painting. *Chromosoma* **2012**, *121*, 409– 418.

2145 Pokorná, M.; Rens, W.; Rovatsos, M.; Kratochvíl, L. A ZZ/ZW sex chromosome system in the thick-tailed  
2146 gecko (*Underwoodisaurus milii*; Squamata: Gekkota: Carphodactylidae), a member of the ancient gecko  
2147 lineage. *Cytogenet Genome Res.* **2014**, *142*, 190–196.

2148 Potter, S.; Bragg, J.G.; Blom, M.P.K.; Deakin, J.E.; Kirkpatrick, M.; Eldridge, M.D.B.; Moritz, C.  
2149 Chromosomal speciation in the genomics era: Disentangling phylogenetic evolution of rock-wallabies.  
2150 *Front. Genet.* **2017**, *8*, 10.

2151 Porter, C.A.; Haiduk, M.W.; de Queiroz, K. Evolution and phylogenetic significance of ribosomal gene  
2152 location in chromosomes of squamate reptiles. *Copeia* **1994**, *1994*, 302–313.

2153 Pough, F.H. Biodiversity of Reptiles. In: *Encyclopedia of Biodiversity*, 3rd ed. Elsevier Inc, Dutch, 2022, pp-  
2154 1–22.

2155 Putnam, N.H.; O’Connell, B.L.; Stites, J.C.; Rice, B.J.; Blanchette, M.; Calef, R.; Troll, C.; Fields, A.; Hartley,  
2156 P.D.; Sugnet, C.W.; Haussler, D.; Rokshar, D.S.; Green, R.E. Chromosome-scale shotgun assembly  
2157 using an in vitro method for long-range linkage. *Genome Res.* **2016**, *26*, 342–350.

2158 Pyron, R.A.; Burbrink, F.T.; Wiens, J.J. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161  
2159 species of lizards and snakes. *BMC Evol. Biol.* **2013**, *13*, 93.

2160 Qualls, C.P.; Shine, R.; Donnellan, S.; Hutchinson, M. The Evolution of Viviparity within the Australian  
2161 Scincid Lizard *Lerista bougainvillii*. *J. Zool.* **1995**, *237*, 13–26.

2162 Ramsay, L.; Macaulay, M.; Cardle, L.; Morgante, M.; Ivanissevich, S.d.; Maestri, E.; Powell, W.; Waugh, R.  
2163 Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive  
2164 elements in barley. *Plant. J.* **1999**, *17*, 415–425.

2165 Ray, D.A.; Dever, J.A.; Platt, S.G.; Rainwater, T.R.; Finger, A.G.; McMurry, S.T.; Batzer, M.A.; Barr, B.;  
2166 Stafford, P.J.; McKnight, J.; Densmore, L.D. Low levels of nucleotide diversity in *Crocodylus*  
2167 *moreletii* and evidence of hybridization with *C. acutus*. *Conserv. Genet.* **2004**, *5*, 449-462.

2168 Recknagel, H.; Carruthers, M.; Yurchenko, A.A.; Nokhbatolfoghahai, M.; Kamenos, N.A.; Bain, M.M.;  
2169 Elmer, K.R. The Functional Genetic Architecture of Egg-Laying and Live-Bearing Reproduction in  
2170 Common Lizards. *Nat. Ecol. Evol.* **2021**, *5*, 1546–1556.

2171 Rodionov, A.; Chelysheva, L.A.; Solovei, I.V.; Miakoshina, IuA. Chiasma distribution in the lampbrush  
2172 chromosomes of the chicken *Gallus gallus domesticus*: Hot spots of recombination and their possible role  
2173 in proper disjunction of homologous chromosomes at the first meiotic division. *Genetika* **1992**, *28*, 151–  
2174 160.

2175 Rodionov, A.V. Micro vs macro: structural-functional organization of avian micro- and macrochromosomes.  
2176 *Genetika* **1996**, *32*, 597–608.

2177 Rodriguez, M.A.M. Crocodilos (Archosauria: Crocodylia) de la Región Neotropical. *Biota Colombiana* **2000**,  
2178 *1*, 135-140.

2179 Romanenko, S.A.; Perelman, P.L.; Trifonov, V.A.; Graphodatsky, A.S. Chromosomal evolution in Rodentia.  
2180 *Heredity* **2012**, *108*, 4–16.

2181 Rosenblatt, A.E.; Heithaus, M.R. Does variation in movement tactics and trophic interactions among American  
2182 alligators create habitat linkages? *J. Anim. Ecol.* **2011**, *80*, 786-798.

2183 Rosenblatt, A.E.; Nifong, J.C.; Heithaus, M.R.; Mazzotti, F.J.; Cherkiss, M.S.; Jeffery, B.M.; Elsey, R.M.;  
2184 Decker, R.A.; Silliman, B.R.; Guillette Jr., L.J.; Lowers, R.H.; Larson, J.C. Factors affecting individual

2185 foraging specialization and temporal diet stability across the range of a large “generalist” apex predator.  
2186 *Oecologia* **2015**, *178*, 5-16.

2187 Ross, J.P. Crocodyles: status, survey and conservation action plan. **The World Conservation Union**, 2<sup>a</sup> ed.,  
2188 1989; 96p.

2189 Ross, J.P. Crocodyles: status survey and conservation action plan. Crocodile Specialist Group, IUCN – Species  
2190 Survival Commission. IUCN/SSC, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 2<sup>a</sup> ed., 1998; 96p.

2191 Rovatsos, M.; Johnson Pokorná, M.; Altmanová, M.; Kratochvíl, L. Mixed up sex chromosomes: identification  
2192 of sex chromosomes in the X1X1X2X2/X1X2Y system of the legless lizards of the genus *Lialis*  
2193 (Squamata: Gekkota: Pygopodidae). *Cytogenet Genome Res.* **2016**, *149*, 282–289.

2194 Rovatsos, M.; Vukić, J.; Altmanová, M.; Pokorná, M.J.; Moravec, J.; Kratochvíl, L. Conservation of sex  
2195 chromosomes in lacertid lizards. *Mol. Ecol.* **2016**, *25*, 3120–3126.

2196 Rovatsos, M.; Altmanová, M.; Johnson Pokorná, M.; Velenský, P.; Baca, A.S.; Kratochvíl, L. Evolution of  
2197 karyotypes in chameleons. *Genes* **2017**, *8*, 382.

2198 Rovatsos, M.; Altmanová, M.; Augstenová, B.; Mazzoleni, S.; Velenský, P.; Kratochvíl, L. ZZ/ZW sex  
2199 determination with multiple neo-sex chromosomes is common in Madagascan chameleons of the genus  
2200 *Furcifer* (Reptilia: Chamaeleonidae). *Genes* **2019**, *10*, 1020.

2201 Rovatsos, M.; Farkačová, K.; Altmanová, M.; Johnson Pokorná, M.; Kratochvíl, L. The rise and fall of  
2202 differentiated sex chromosomes in geckos. *Mol. Ecol.* **2019**, *28*, 3042–3052.

2203 Rueda-Almonacid, J.V.; Carr, J.L.; Mittermeier, R.A.; Rodríguez-Mahecha, J.V.; Mast, R.B.; Vogt, R.C.;  
2204 Rhodin, A.G.J.; OssaVelásquez, J.O.; Rueda, J.N.; Mittermeier, C.G. Orden Crocodylia. In *Conservación*  
2205 *Internacional. Serie de Guías Tropicales de Campo N° 6. Las Tortugas y los Crocodilianos de los Países*  
2206 *Andinos del Trópico*, 1st ed.; Mittermeier, R.A., Rylands, A., Eds.; Editorial Panamericana, Formas e  
2207 Impresos: Bogotá, Colombia, 2007; Volume 1, pp. 387–432.

2208 Ruiz-Ruano, F.J.; López-León, M.D.; Cabrero, J.; Camacho, J.P.M. High-throughput analysis of the  
2209 satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28333.

2210 Sales-Oliveira, V.; Altmanová, M.; Gvoždík, V.; Kretschmer, R.; Ezaz, T.; Liehr, T.; Padutsch, N.; Badjedjea,  
2211 G.; Utsonomia, R.; Tanomtong, A.; Cioffi, M. Cross-species chromosome painting and repetitive DNA  
2212 mapping illuminate the karyotype evolution in true crocodiles (Crocodylidae). *Chromosoma* **2023**, *132*,  
2213 289-303.

2214 Samad, M.S.; Biswas, A.; Bakken, L.R.; Clough, T.J.; de Klein, C.A.M.; Richards, K.G.; Lanigan, G.J.;  
2215 Morales, S.E. Phylogenetic and functional potential links pH and N2O emission in pasture soils. *Sci. Rep.*  
2216 **2016**, *6*, 35990.

2217 Sambrook, J.; Russell, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed.; Cold Spring Harbor  
2218 Laboratory Press: New York, NY, USA, 2001; pp. 58–63.

2219 Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC and AT-rich regions in Anura.  
2220 *Chromosoma* **1980**, *77*, 83–103.

2221 Sember, A.; Bertollo, L.A.C.; Ráb, P.; Yano, C.F.; Hatanaka, T.; de Oliveira, E.A.; Cioffi, M.B. Sex  
2222 chromosome evolution and genomic divergence in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes  
2223 Erythrinidae). *Front. Genet.* **2018**, *9*, 71.

2224 Sessions, S.K.; Kezer, J. Evolutionary cytogenetics of Bolitoglossine salamanders (Family Plethodontidae). In  
2225 *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, 1st ed.; Green, D.M., Sessions, S.K., Eds.; San Diego Academic  
2226 Press: San Diego, CA, USA, 1991; pp. 89–130.

2227 Shedlock, A.M.; Botka, C.W.; Zhao, S.; Shetty, J.; Zhang, T.; Liu, J.S.; Deschavanne, P.J.; Edwards, S.V.  
2228 Phylogenomics of nonavian reptiles and the structure of the ancestral amniote genome. *Proc. Natl. Acad.*  
2229 *Sci. USA* **2007**, *104*, 2767–2772.

2230 Shedlock, A.M.; Edwards, S.V. Amniotes (Amniota). In *The Timetree of Life*; Hedges, S.B., Kumar, S., Eds.;  
2231 Oxford University Press: New York, NY, USA, 2009; pp. 375–379.

2232 Shirley, M.H.; Vliet, K.A.; Carr, A.N.; Austin, J.D. Rigorous approaches to species delimitation have  
2233 significant implications for African crocodylian systematics and conservation. *Proc. R. Soc. B* **2014**, *281*,  
2234 20132483.

2235 Shirley, M.H.; Carr, A.N.; Nestler, J.H.; Vliet, K.A.; Brochu, C.A. Systematic revision of the living African  
2236 slender-snouted crocodiles (*Mecistops* Gray, 1844). *Zootaxa* **2018**, *4504*, 151–193.

2237 Simões, T.R.; Kinney-Broderick, G.; Pierce, S.E. An exceptionally preserved *Sphenodon*-like sphenodontian  
2238 reveals deep time conservation of the tuatara skeleton and ontogeny. *Commun. Biol.* **2022**, *5*, 195.

2239 Sites, J.W.; Reeder, T.W.; Wiens, J.J. Phylogenetic Insights on Evolutionary Novelty in Lizards and Snakes:  
2240 Sex, Birth, Bodies, Niches, and Venom. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2011**, *42*, 227–244.

2241 Skinner, B.; Griffin, D. Intrachromosomal rearrangements in avian genome evolution: evidence for regions  
2242 prone to breakpoints. *Heredity* **2012**, *108*, 37–41.

2243 Slijepcevic, P. Telomere length and telomere-centromere relationships? *Mutat. Res.* **1998**, *404*, 215–220.

2244 Smith, J.; Bruley, C.K.; Paton, I.R.; Dunn, I.; Jones, C.T.; Windsor, D.; Morrice, D.R.; Law, A.S.; Masabanda,  
2245 J.; Sazanov, A.; Waddington, D.; Fries, R.; Burt, D.W. Differences in gene density on chicken  
2246 macrochromosomes and microchromosomes. *Anim. Genet.* **2000**, *31*, 96–103.

2247 Smith, S.A.; Shine, R. Intraspecific Variation in Reproductive Mode within the Scincid Lizard *Saiphos equalis*.  
2248 *Aust. J. Zool.* **1997**, *45*, 435–445.

2249 Sochorová, J.; Garcia, S.; Gálvez, F.; Symonová, R.; Kovačřík, A. Evolutionary trends in animal ribosomal  
2250 DNA loci: Introduction to a new online database. *Chromosoma* **2018**, *127*, 141–150.

2251 Srikulnath, K.; Thapana, W.; Muangmai, N. Role of chromosome changes in *Crocodylus* evolution and  
2252 diversity. *Genom. Inform.* **2015**, *13*, 102–111.

2253 Srikulnath, K.; Ahmad, S.F.; Singchat, W.; Panthum, T. Why do some vertebrates have microchromosomes?  
2254 *Cells* **2021**, *10*, 2182.

2255 Steel, R. *Crocodyles*. Christopher Helm Publishers: London, 1989; 207 pg.

2256 Stockdale, M.T.; Benton, M.J. Environmental drivers of body size evolution in crocodile-line archosaurs.  
2257 *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 38.

2258 Straková, B.; Rovatsos, M.; Kubička, L.; Kratochvíl, L. Evolution of sex determination in amniotes: Did stress  
2259 and sequential hermaphroditism produce environmental determination? *BioEssays* **2020**, *42*, e2000050.

2260 Stubbs, T.L.; Pierce, S.E.; Elslser, A.; Anderson, P.S.L.; Rayfield, E.J.; Benton, M.J. Ecological opportunity  
2261 and the rise and fall of crocodylomorph evolutionary innovation. *Proc. R. Soc. B* **2021**, *288*, 20210069.

2262 Sues, H.-D. *The Rise of Reptiles: 320 Million Years of Evolution*, Illustrated ed.; Johns Hopkins University  
2263 Press: Baltimore, MA, USA, 2019; ISBN 978-1-4214-2867-3.

2264 Sumner, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* **1972**, *75*,  
2265 304–306.

2266 Symonová, R.; Sember, A.; Majtánová, Z.; Ráb, P. Characterization of fish genomes by GISH and CGH. In  
2267 *Fish Cytogenetic Techniques Ray-Fin Fishes Chondrichthyans*, 1st ed.; Ozouf-Costaz, C., Pisano, E.,  
2268 Foresti, F., Toledo, L.F.A., Eds.; CCR Press: Boca Raton, FL, USA, 2015; pp. 118–131.

2269 Thorbjarnarson, J.B. Reproductive characteristics of the Order Crocodylia. *Herpetol.* **1996**, *52*, 8–24.

2270 Thorbjarnarson, J.; Wang, X.; Ming, S.; He, L.; Ding, Y.; Wu, Y.; McMurry, S.T. Wild populations of the  
2271 Chinese alligator approach extinction. *Biol. Conserv.* **2002**, *103*, 93–102.

2272 Trifonov, V.A.; Giovannotti, M.; O'Brien, P.C.; Wallduck, M.; Lovell, F.; Rens, W.; Parise-Maltempi, P.P.;  
2273 Caputo, V.; Ferguson-Smith, M. Chromosomal evolution in Gekkonidae. I. Chromosome painting

2274 between *Gekko* and *Hemidactylus* species reveals phylogenetic relationships within the group.  
2275 *Chromosome Res.* **2011**, *19*, 843–55.

2276 Trifonov, V.A.; Paoletti, A.; Barucchi, V.C.; Kalinina, T.; O'Brien, P.C.M.; Ferguson-Smith, M.A.;  
2277 Giovannotti, M. Comparative chromosome painting and NOR distribution suggest a complex hybrid  
2278 origin of triploid *Lepidodactylus lugubris* (Gekkonidae) *PLoS One* **2015**, *10*: e0132380.

2279 Uetz, P.; Freed, P.; Aguilar, R.; Hošek, J. (Eds.) The Reptile Database. Available online: [http://www.reptile-  
2280 database.org](http://www.reptile-<br/>
2280 database.org) (acessado em 31 de Agosto de 2020).

2281 Uetz, P.; Freed, P.; Aguilar, R.; Hošek, J. (Eds.) The Reptile Database Available online. [http://wwwreptile-  
2282 database.org](http://wwwreptile-<br/>
2282 database.org). (acessado em 3 de Abril de 2023).

2283 Uno, Y.; Nishida, C.; Tarui, H.; Ishishita, S.; Takagi, C.; Nishimura, O.; Ishijima, J.; Ota, H.; Kosaka, A.;  
2284 Matsubara, K.; et al. Inference of the protokaryotypes of amniotes and tetrapods and the evolutionary  
2285 processes of microchromosomes from comparative gene mapping. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e53027.

2286 Valleley, E.M.A.; Harrison, C.J.; Cook, Y.; Ferguson, M.W.J.; Sharpe, P.T. The karyotype of *Alligator*  
2287 *mississippiensis*, and chromosomal mapping of the *ZFY/X* homologue, *Zfc*. *Chromosoma* **1994**, *103*,  
2288 502–507.

2289 Valenzuela, N. Temperature dependent sex determination in reptiles. In *Reptilian Incubation: Environment &  
2290 Behaviour*, 1st ed.; Deeming, D.C., Ed.; Nottingham University Press: Nottingham, UK, 2004; Volume 1,  
2291 pp. 65–80.

2292 Valenzuela, N.; Adams, D.C. Chromosome number and sex determination coevolve in turtles. *Evolution* **2011**,  
2293 *65*, 1808–1813.

2294 Valenzuela, N.; Lance, V.A. Temperature-dependent sex determination in vertebrates. Smithsonian Books,  
2295 Washington, DC, 2004.

2296 Vasconcelos, W.R.; Hrbek, T.; Da Silveira, R.; Thoisy, B.; Marioni, B.; Farias, I.P. Population genetic analysis  
2297 of *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758) from South America. *Genet. Mol. Biol.* **2006**, *29*, 220-230.

2298 Vasconcelos, W.R.; Hrbek, T.; Da Silveira, R.; Thoisy, B.; Ruffeil, L.A.A.S.; Farias, I.P. Phylogeographic and  
2299 Conservation Genetic Analysis of the Black Caiman (*Melanosuchus niger*). *J. Exp. Zool.* **2008**, *309*, 600-  
2300 613.

2301 Venegas-Anaya, M.; Crawford, A.J.; Escobedo Galván, A.H.; Sanjur, O.I.; Densmore III, L.D.; Bermingham,  
2302 E. Mitochondrial DNA phylogeography of *Caiman crocodilus* in Mesoamerica and South America. *J.*  
2303 *Exp. Zool.* **2008**, *309*, 614-627.

2304 Verdade, L.M.; Piña, C.I. O jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris* DAUDIN, 1802). *Herpetologia no*  
2305 *Brasil II*, 2016.

2306 Veyrunes, F.; Waters, P.D.; Miethke, P.; Rens, W.; McMillan, D.; Alsop, A.E.; Grützner, F.; Deakin, J.;  
2307 Whittington, C.M.; Schatzkamer, K.; Kremitzki, C.L.; Graves, T.; Ferguson-Smith, M.A.; Warren, W.;  
2308 Marshal Graves, J.A. Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex  
2309 chromosomes. *Genome Res.* **2008**, *18*, 965–973.

2310 Viana, P.F.; Ribeiro, L.B.; Lima, T.; de Carvalho, V.T.; Vogt, R.C.; Gross, M.C.; Feldberg, E. An optimized  
2311 protocol for obtaining mitotic chromosomes from cultured reptilian lymphocytes. *Nucleus* **2016**, *59*, 191–  
2312 195.

2313 Viana, P.F.; Ezaz, T.; Cioffi, M.B.; Almeida, B.J.; Feldberg, E. Evolutionary Insights of the ZW Sex  
2314 Chromosomes in Snakes: A New Chapter Added by the Amazonian Puffing Snakes of the Genus  
2315 *Spilotes*. *Genes* **2019**, *10*, 288.

2316 Viana, P.F.; Ezaz, T.; Cioffi, M.B.; Liehr, T.; Al-Rikabi, A.; Goll, L.G.; Rocha, A.M.; Feldberg, E. Landscape  
2317 of snake' sex chromosomes evolution spanning 85 MYR reveals ancestry of sequences despite distinct  
2318 evolutionary trajectories. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 12499.

2319 Villamarín, F.; Jardine, T.D.; Bunn, S.E.; Marioni, B.; Magnusson, W.E. Opportunistic top predators partition  
2320 food resources in a tropical freshwater ecosystem. *Freshw. Biol.* **2017**, 1-12.

2321 Völker, M.; Backstrom, N.; Skinner, B.M.; Langley, E.J.; Bunzey, S.K.; Ellegren, H.; Griffin, D. Copy number  
2322 variation, chromosome rearrangement, and their association with recombination during avian evolution.  
2323 *Genome Res.* **2010**, *20*, 503–511.

2324 Wang, J.; Su, W.; Hu, Y.; Li, S.; O'Brien, P.C.M.; Ferguson-Smith, M.A.; Yang, F.; Nie, W. Comparative  
2325 chromosome maps between the stone curlew and three ciconiiform species (the grey heron little egret and  
2326 crested ibis). *BMC Ecol. Evol.* **2022**, *22*, 1–13.

2327 Wake, D.B.; Roth, G.; Wake, M.H. On the problem of stasis in organismal evolution. *J. Theor. Biol.* **1983**,  
2328 *101*, 211–224.

2329 Waltari, E.; Edwards, S.V. Evolutionary Dynamics of Intron Size, Genome Size, and Physiological Correlates  
2330 in Archosaurs. *Am. Nat.* **2002**, *160*, 539–552.

2331 Watts, P.C.; Buley, K.R.; Sanderson, S.; Boardman, W.; Ciofi, C.; Gibson, R. Parthenogenesis in Komodo  
2332 Dragons. *Nature* **2006**, *444*, 1021–1022.

2333 Weaver, J.P.; Rodriguez, D.; Venegas-Anaya, M.; Cedeño-Vázquez, J.R.; Forstner, M.R.J.; Densmore III, L.D.  
2334 Genetic characterization of captive Cuban crocodiles (*Crocodylus rhombifer*) and evidence of  
2335 hybridization with the American crocodile (*Crocodylus acutus*). *J. Exp. Zool.* **2008**, *309*, 649–660.

2336 White, M.J.D. *Animal Cytology and Evolution*, 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1973;  
2337 p. 468.

2338 White, M.J.D. *Modes of Speciation*, 1st ed.; W.R. Freeman and Company: San Francisco, CA, USA, 1978.

2339 Whittington, C.M.; Van Dyke, J.U.; Liang, S.Q.T.; Edwards, S.V.; Shine, R.; Thompson, M.B.; Grueber, C.E.  
2340 Understanding the Evolution of Viviparity Using Intraspecific Variation in Reproductive Mode and  
2341 Transitional Forms of Pregnancy. *Biol. Rev.* **2022**, *97*, 1179–1192.

2342 Willis, J.C. *Age and area: a study of geographical distribution and origin of species*. Cambridge University  
2343 Press, Cambridge, 1922.

2344 Wright, A.E.; Dean, R.; Zimmer, F.; Mank, J.E. How to make a sex chromosome. *Nat. Commun.* **2016**, *7*,  
2345 12087.

2346 Yano, C.F.; Bertollo, L.A.C.; Cioffi, M.B. Fish-FISH: Molecular Cytogenetics in Fish Species. In  
2347 *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)—Application Guide*, 2nd ed.; Liehr, T., Ed.; Springer: Berlin,  
2348 Germany, 2017; Volume 1, pp. 429–444.

2349 Yang, Z.; Rannala, B. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci.*  
2350 **2010**, *107*, 9264–9269.

2351 Yang, F.; Trifonov, V.; Ng, B.L.; Kosyakova, N.; Carter, N.P. Generation of paint probes by flow-sorted and  
2352 microdissected chromosomes. In: *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)—Application Guide*; Liehr,  
2353 T., Ed.; Springer Protocols Handbooks, Heidelberg, 2009; pp. 35–32.

2354 Zeng, C.J.; Ye, Q.; Fang, S.G. Establishment and cryopreservation of liver, heart and muscle cell lines derived  
2355 from the Chinese alligator (*Alligator sinensis*). *Chinese Sci. Bull.*, **2011**, *56*, 2576–2579.

2356 Zwick, M.S.; Hanson, R.E.; McKnight, T.D.; Islam-Faridi, M.N.; Stelly, D.M.; Wing, R.A.; Price, H.J. A rapid  
2357 procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants. *Genome* **1997**, *40*, 138–142.