



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA

MANOELLA GEMAQUE CAVALCANTE

**MAPEAMENTO CITOGENÉTICO DE DNAs REPETITIVOS EM  
QUELÔNIOS: *PODOCNEMIS EXPANSA* E *PODOCNEMIS  
UNIFILIS* (TESTUDINES, PODOCNEMIDAE)**

Belém – PA  
2017

MANOELLA GEMAQUE CAVALCANTE

**MAPEAMENTO CITOGENÉTICO DE DNAs REPETITIVOS EM  
QUELÔNIOS: *PODOCNEMIS EXPANSA* E *PODOCNEMIS  
UNIFILIS* (TESTUDINES, PODOCNEMIDAE)**

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Curso de Pós Graduação em Ecologia  
Aquática e Pesca, da Universidade Federal do  
Pará, Instituto de Ciências Biológicas.

**Orientadora:** Prof<sup>ta</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Coelho  
Rodrigues Noronha

Belém – PA  
2017

MANOELLA GEMAQUE CAVALCANTE

**MAPEAMENTO CITOGENÉTICO DE DNAs REPETITIVOS EM  
QUELÔNIOS: *PODOCNEMIS EXPANSA* E *PODOCNEMIS  
UNIFILIS* (TESTUDINES, PODOCNEMIDAE)**

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Curso de Pós Graduação em Ecologia  
Aquática e Pesca, da Universidade Federal do  
Pará, Instituto de Ciências Biológicas.

Data: 31 de agosto de 2017

**Banca Examinadora:**

---

Profª Drª Renata Coelho Rodrigues Noronha (Presidente)

---

Profº Dr Julio Cesar Pieczarka (Membro)

---

Profº Dr Leonardo dos Santos Sena (Membro)

---

Profº Dr Marcelo Ricardo Vicari (Membro)

---

Profº Carlos Eduardo Matos Carvalho Bastos (Suplente)

---

Profª Drª Cleusa Yoshiko Nagamachi (Suplente)

Belém – PA  
2017

Dedico este trabalho a minha filha,  
Carolina.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais, Rose e Marcos, por todo amor, amizade, dedicação, apoio, cuidado, ajuda e incentivo. À minha filha, Carolina, por me mostrar todos os dias, nas coisas mais simples, o verdadeiro sentido da vida, e me fazer querer ser sempre um ser humano melhor. Ao meu esposo, Neto, por não medir esforços para me apoiar e ajudar durante essa caminhada.

À minha orientadora, Renata Noronha, por todo conhecimento compartilhado, pela amizade, pela confiança no meu trabalho, por me proporcionar novas “portas”, novas perspectivas profissionais, e, principalmente, por sempre me incentivar a ser uma profissional independente.

Aos professores Cleusa Nagamachi e Julio Pieckzarca, pela parceria e toda infraestrutura oferecida.

Ao Dr Carlos Eduardo Matos Carvalho Bastos, pela amizade e parceria no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Msc Bruno Rafael de Almeida, pela amizade e ajuda com artigos e FISHs.

Ao Dr Adauto Lima Cardoso, por gentilmente ajudar a sequenciar as sondas produzidas nesta pesquisa.

Ao Dr Marcelo Ricardo Vicari, por ceder gentilmente *primers* utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr Cesar Martins, por compartilhar informações valiosas para as interpretações de parte da discussão dos resultados obtidos nesta pesquisa.

À toda equipe do Laboratório Genômica Integrativa (UNESP-Botucatu), coordenada pelo Dr. Cesar Martins, por disponibilizar *primers* utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Citogenética da UFPA, pela parceria, ajuda e amizade.

Ao ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) pela concessão da licença para coleta das amostras biológicas.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca (PPGEAP) por orientações burocráticas em todos os momentos do desenvolvimento do trabalho.

Aos órgãos de fomento, CNPQ (edital Universal) e CAPES (edital Pró-Amazônia) por concederem verba para o desenvolvimento do trabalho.

Sou extremamente grata a todos!

## LISTA DE FIGURAS E TABELA

**Figura 1:** Hipóteses alternativas para colocação dos Testudines dentro de Amniotas: 1) Amniotas basais, 2) Sauropsídeos basais, 3) grupo irmão de Lepidosauria, 4) grupo irmão de Archosauria, e 5) grupo irmão de Crocodilia. (Fonte: adaptado de FONG *et al.*, 2012).

**Figura 2:** Classificação das subordens em Testudines de acordo com a retração do pescoço em A) Pleurodira e B) Cryptodira (Fonte: IBAMA/Divulgação)

**Figura 3:** Espécime de *Podocnemis expansa* (Fonte: IBAMA/Divulgação)

**Figura 4:** Esquema de identificação de *Podocnemis expansa* (Fonte: adaptado de CITES, 1999)

**Figura 5:** Distribuição de *Podocnemis expansa* (Fonte: adaptado de NGeo - RAN/ICMBIO, 2016).

**Figura 6:** Espécime de *Podocnemis unifilis* (Fonte: RAN/ICMBio/Divulgação)

**Figura 7:** Esquema de identificação para *Podocnemis unifilis* (Fonte: adaptado de CITES, 1999)

**Figura 8:** Distribuição de *Podocnemis unifilis* (Fonte: adaptado de NGeo - RAN/ICMBIO, 2016).

**Figura 9:** Organização de diferentes classes de DNAs repetitivos em eucariotos (Fonte: adaptado de MARTINS *et al.*, 2011).

**Figura 10:** Karyotype of *P. expansa* and b) *P. unifilis*.

**Figura 11:** Karyotype of *P. unifilis*.

**Figura 12:** Physical mapping of 5S rDNA in *P. expansa* and *P. unifilis* genomes using different probes: with purified probe of approximately 120bp in a) *P. expansa*, b) *P. unifilis*; With probe produced including all bands amplified in: c) *P. expansa*, d) *P. unifilis*.

**Figura 13:** Physical mapping of snDNA U2 located in the pericentromeric region of par 6 in the genome of the two species analyzed: a) in *P. expansa* (red); b) in *P. unifilis* (green).

**Figura 14:** Physical mapping of histone H1 and H3 genes in the *P. expansa* and *P. unifilis* genomes. H1 gene tags located in the interstitial region of the first submetacentric long pair in: a) *P. expansa* (red); b) *P. unifilis* (red). H3 gene markers located in centromeric and pericentromeric regions in seven chromosome pairs in c) *P. expansa* (green) and in six chromosome pairs in d) *P. unifilis* (red).

**Figura 15:** Physical mapping of the *Tc1-Mariner* transposable element showing scattered signals along the genome, with some organizations in heterochromatic regions in: a) *P. expansa* and b) *P. unifilis*.

**Figura 16:** Physical mapping of *Rex1* and *Rex3* retroelements showing scattered markers along the genome, with some accumulations in heterochromatic regions: a) *Rex1* in *P. expansa*; b) *Rex1* in *P. unifilis*; c) *Rex3* in *P. expansa*; d) *Rex3* in *P. unifilis*.

**Tabela 1:** Lista das espécies de quelônios com ocorrência na Amazônia Brasileira (Fonte: Adaptado de van DIJK et al., 2014).

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ORDEM TESTUDINES .....	10
1.2 FAMÍLIA PODOCNEMIDAE .....	14
1.2.1 <i>Podocnemis expansa</i> (Schweigger, 1812).....	15
1.2.2 <i>Podocnemis unifilis</i> (Troschel, 1848).....	17
1.3 DNAS REPETITIVOS.....	19
1.4 ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM QUELÔNIOS.....	24
2. OBJETIVOS .....	25
2.1 OBJETIVO GERAL .....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
5. CAPÍTULO 1 .....	31
6. CONCLUSÃO .....	55
Referências .....	57



## RESUMO

A ordem Testudines é tida como uma das mais antigas entre os répteis existentes. Atualmente, são classificados em 13 famílias viventes com aproximadamente 300 espécies, que podem ser encontradas em todos os continentes, com exceção da Antártida. Existem 36 espécies de Testudines com ocorrência conhecida para o território brasileiro, dentre essas, 16 espécies ocorrem na região Amazônica. A família Podocnemidae é representada por 3 gêneros: *Erymnochelys*, *Peltocephalus* e *Podocnemis*. O gênero *Podocnemis* atualmente inclui seis espécies, todas sul-americanas: *P. lewyana*, *P. vogli*, *P. sextuberculata*, *P. unifilis*, *P. erythrocephala* e *P. expansa*. Na presente pesquisa, estudos citogenéticos moleculares foram realizados para comparar as espécies *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* através da análise de sequências de DNAs repetitivos, a partir do isolamento e caracterização de famílias multigênicas e elementos de transposição por Hibridização *in situ* Fluorescente (*FISH*); essas sequências são ferramentas úteis para definir a estrutura, organização e evolução genômica em diversos organismos. Os resultados apresentam  $2n=28$  para as duas espécies; os cromossomos de *P. expansa* são constituídos por 20 pares metacêntricos e submetacêntricos : quatro subtelocêntricos : quatro acrocêntricos, e de *P. unifilis* com 22 pares metacêntricos e submetacêntricos : dois subtelocêntricos : quatro acrocêntricos. As análises das *FISHs* evidenciaram marcações utilizando sondas com genes de rDNA 5S, snDNA U2, Histonas H1 e H3, e elementos transponíveis (*TEs*), transposon *Tc1-Mariner* e retrotransposons *Rex1* e *Rex3*. Sinais para rDNA 5S foram visualizados organizados em *clusters* em região intersticial nos pares 1 e 11 em *P. expansa* e *P. unifilis*. Marcações com snDNA U2 mostraram sinais semelhantes para as duas espécies, localizados na região pericentromérica do par 6 em ambas. Gene de histona H1 foi detectado em região intersticial do primeiro par cromossômico em *P. expansa* e *P. unifilis*; para gene de histona H3, foram detectados *clusters* localizados em regiões centroméricas e pericentroméricas em seis pares cromossômicos em *P. unifilis*; além dessas marcações, sinais adicionais no par cromossômico 13 foram encontrados em *P. expansa*. O padrão da distribuição encontrado para os elementos transponíveis *Tc1-Mariner*, *Rex1* e *Rex3* se apresentou disperso ao longo de todos os cromossomos nas duas espécies, no entanto, com acumulações desses repetitivos tendendo a colonizar regiões heterocromáticas, semelhante para as duas espécies analisadas. Os resultados nos permitiram inferir uma provável associação de DNAr 5S e genes de H1 e H3 com diferentes classes de *TEs*, atuando na dispersão de multigenes a partir de eventos de transposição. Descrevemos também a organização genômica do snDNA U2 conservada entre as espécies analisadas. Esses dados são inéditos para a ordem Testudines, permitindo compreender a dinâmica organizacional de DNAs repetitivos, além de contribuir com a carioevolução do grupo.

**Palavras-chaves:** Podocnemidae, citogenética molecular, FISH, DNAs repetitivos.

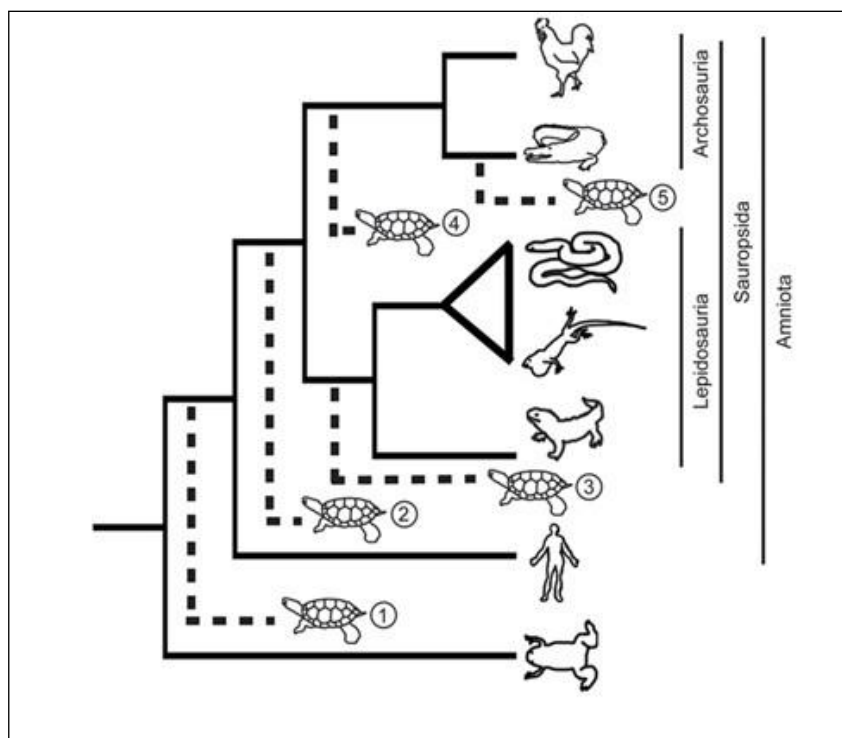
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ORDEM TESTUDINES

A origem dos répteis é datada em registros fósseis da Era Paleozóica. Esses animais dominaram a Terra durante o período Jurássico até o Cretáceo, há cerca de 125 milhões de anos, e a maioria das espécies foram extintas há aproximadamente 60 milhões de anos (GOULART, 2004). A ordem Testudines é tida como uma das mais antigas entre os répteis existentes. A evidência fóssil mais antiga da ordem data do período Permiano, aproximadamente 280 milhões de anos atrás (FERRI, 2002).

As relações evolutivas dos Testudines são contenciosas. Debates abordando a posição filogenética da ordem ocorrem por mais de 150 anos, resultando em pelo menos cinco hipóteses diferentes (MEYER & ZARDOYA, 2003). Estudos utilizando o número de aberturas temporais no crânio classificaram quelônios como condição anapsida (sem aberturas) (GAFFNEY, 1980). Adicionalmente, dados morfológicos e moleculares sugeriram quatro hipóteses para o grupo: como Sauropsídeos basais (répteis e aves), como grupo irmão de Lepidosauria (lagartos, cobras, anfisbena, e tuataras), como grupo irmão de Archosauria (aves e crocodilianos), e como grupo irmão de Crocodilia (**Figura 1**). Embora estudos recentes tivessem fortes resultados de apoio a hipóteses específicas, não há consenso mediante a um conjunto de dados diferentes, suportando diferentes hipóteses (MEYER & ZARDOYA, 2003; LYSON, *et al.*, 2012; CHIARI *et al.*, 2012).

Até recentemente, a posição da ordem Testudines dentro dos Amniotas era incerta (HEDGES & POLING, 1999). Análises genômicas confirmaram sua posição filogenética como grupo irmão de Archosauria (CRAWFORD *et al.*, 2012; FIELD *et al.*, 2014; FONG *et al.*, 2012; SHAFFER *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013), rejeitando uma suposta relação entre Testudines e Lepidossauros (LYSON *et al.*, 2012). No entanto, as relações entre os Testudines não foram estudadas utilizando técnicas filogenéticas. Semelhante o posicionamento dos Testudines em relação aos seus antepassados amniotas, estudos moleculares (SHAFFER *et al.*, 1997; FUJITA *et al.*, 2004; KRENZ *et al.*, 2005; PARHAM *et al.*, 2006; BARLEY *et al.*, 2010) têm desafiado hipóteses filogenéticas com base em análises cladísticas de dados morfológicos (GAFFNEY & MEYLAN, 1988; GAFFNEY *et al.*, 1991).



**Fig. 1:** Hipóteses alternativas para colocação dos Testudines dentro de Amniotas: 1) Amniotas basais, 2) Sauropsídeos basais, 3) grupo irmão de Lepidosauria, 4) grupo irmão de Archosauria, e 5) grupo irmão de Crocodylia. (Fonte: adaptado de FONG *et al.*, 2012).

Aspectos primitivos e características altamente especializadas diferenciam os Testudines dos demais grupos de vertebrados; são caracterizados pela posse de casco ósseo - característica mais distintiva da ordem - formado por uma carapaça dorsal e um plastrão ventral unidos lateralmente e recobertos por escudos epidérmicos poligonais ou por uma pele coriácea, com vértebras torácicas e costelas usualmente fundidas com a carapaça. Possuem diferentes habitats, com espécies exclusivamente terrestres (jabutis), espécies que vivem em ambientes fluviais e lacustres (cágados), espécies exclusivamente marinhas (tartarugas), e ainda, aquelas que vivem em ambientes terrestres e de água doce. A morfologia do casco reflete a ecologia da espécie; espécies terrestres possuem cascos em forma de cúpula, já cascos mais achatados e pés com membranas interdigitais, ou mesmo ausência de dedos, indicam hábitos aquáticos ou semi-aquáticos (ZUG, 1993; GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994; GOULART, 2004).

A ordem Testudines se dividiu em dois grupos diferenciados por características anatômicas, como articulação das vértebras cervicais e capacidade de flexão do pescoço, que formam as duas subordens existentes: Subordem Cryptodira (cripto:

escondido; dire: pescoço), abrangendo a maioria das espécies, representada por 10 famílias (Testudinidae, Bataguridae, Emydidae, Trionychidae, Carrettochelyidae, Dermatemyidae, Kinosternidae, Cheloniidae, Dermochelyidae e Chelydridae) que incluem tartarugas, cágados e jabutis encontrados, em sua maioria, no hemisfério sul; apresentam como característica particular a retração da cabeça por meio de flexão vertical das vértebras do pescoço. Subordem Pleurodira (pleuro: lado; dire: pescoço) é representada pela família Chelidae e pela superfamília Pelomedusoidea que abrange duas famílias (Pelomedusidae e Podocnemidae), encontradas apenas no hemisfério sul; apresentam retração lateral do pescoço para dentro do casco (**Figura 2**) (AUFFENBERG, 1974; BICKHAM & CARR, 1983; ZUG, 1993; GOULART, 2004; POUGH *et al.*, 2008; SHAFTER, 2009).

Atualmente, os quelônios são classificados em 13 famílias viventes, com aproximadamente 300 espécies, encontradas em todos os continentes, com exceção da Antártida (POUGH *et al.*, 2008). Existem 36 espécies da ordem Testudines com ocorrência conhecida para o território brasileiro, distribuídas nas famílias Cheloniidae, Dermochelyidae, Emydidae, Geomydidae, Kinosternidae, Testudinidae, Podocnemidae e Chelidae (BÉRNILS & COSTA, 2012). Dentre essas espécies, 17 apresentam ocorrência na região Amazônica (**Tabela 1**) (van DIJK *et al.*, 2014).



**Fig. 2:** Classificação das subordens em Testudines, de acordo com a retração do pescoço em: A) Pleurodira e B) Cryptodira (Fonte: IBAMA/Divulgação)

Grupo taxonômico	Nome popular
<b>Cryptodira</b>	
Geoemydidae	
<i>Rhinoclemmys punctularia</i> (Daudin 1801)	perema
Kinosternidae	
<i>Kinosternon scorpioides</i> (Linnaeus 1766)	cabeçudinho, peito-de-mola, muçã
Testudinidae	
<i>Chelonoidis carbonarius</i> (Spix 1824)	jabuti-vermelho, jabuti-piranga
<i>Chelonoidis denticulatus</i> (Linnaeus 1766)	jabuti-amarelo, jabuti-tinga
<b>Pleurodira</b>	
Chelidae	
<i>Chelus fimbriata</i> (Schneider 1783)	mata-mata
<i>Mesoclemmys gibba</i> (Schweigger 1812)	cágado-de-poças-da-floresta
<i>Mesoclemmys nasuta</i> (Schweigger 1812)	cágado-da-cabeça-de-sapo-comum
<i>Mesoclemmys raniceps</i> (Gray 1856)	lalá
<i>Phrynops geoffroanus</i> (Schweigger 1812)	cangapara, cágado-de-barbicha
<i>Phrynops tuberosus</i> (Peters 1870)	cágado-de-barbicha, cágado-rajado
<i>Platemys platycephala</i> (Schneider 1792)	jabuti-machado
<i>Rhinemys rufipes</i> (Spix 1824)	cágado-vermelho
Podocnemididae	
<i>Peltocephalus dumerilianus</i> (Schweigger 1812)	cabeçudo
<i>Podocnemis erythrocephala</i> (Spix 1824)	irapuca, calalumã
<i>Podocnemis expansa</i> (Schweigger 1812)	tartaruga-da-amazônia, capitari, viração
<i>Podocnemis sextuberculata</i> Cornalia 1849	iaçá, pitiú, cambéua
<i>Podocnemis unifilis</i> Troschel 1848	tracajá, zé-prego

**Tabela 1:** Lista das espécies de quelônios com ocorrência na Amazônia Brasileira (Fonte: Adaptado de van DIJK et al., 2014).

Historicamente, muitas espécies de quelônios apresentam grande importância alimentar, econômica e cultural, tendo seus ovos, carne, vísceras, gordura e casco sido utilizados intensamente pelo homem (van DIJK et al., 2014). A capacidade relativamente pequena para crescimento populacional (baixo índice reprodutivo), requerendo longos períodos para atingir a maturidade sexual, predispõe os quelônios ao risco de extinção quando condições variáveis aumentam a mortalidade de adultos e/ou reduzem a entrada de jovens na população (POUGH *et al.*, 2008).

CONWAY-GOMÉZ (2007) mostrou que a pressão de caça executada em proximidades de locais com ocupação humana diminuiu drasticamente a abundância de *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis*; a partir da retirada e/ou diminuição da pressão de caça, foi constatado que essas espécies voltaram a povoar áreas anteriormente ocupadas, contribuindo assim para a recuperação destas.

Segundo o Turtle Taxonomy Working Group (2014), se considerarmos as espécies recentemente extintas, e a limitação de informações sobre o grupo, aproximadamente 60% de todos os quelônios atuais estão em risco de extinção, e essa porcentagem tem aumentado significativamente nos últimos anos, apontando os quelônios como o grupo de vertebrado mais ameaçado do planeta, superando aves, mamíferos, peixes cartilagosos, ósseos e anfíbios.

Como resposta aos dados sobre risco de extinção de quelônios, o Programa Quelônios da Amazônia (PQA) e o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios (RAN) são alguns exemplos de projetos que promovem pesquisas e ações voltadas à conservação dessas espécies, em especial aquelas ameaçadas de extinção, sobre-exploradas ou dependentes de programas de conservação, além de subsidiar alternativas de manejo em bases sustentáveis (ICMBIO, 2015).

## **1.2 FAMÍLIA PODOCNEMIDAE**

A família Podocnemidae compreende um grupo monofilético representado por oito espécies, reunidas em três gêneros: *Erymnochelys madagascariensis* (Grandidier, 1867), *Peltocephalus dumerilianus* (Schweigger, 1812), *Podocnemis erythrocephala* (Spix, 1824), *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812), *Podocnemis lewyana* (Duméril, 1852), *Podocnemis sextuberculata* (Cornalia, 1849), *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) *Podocnemis vogli* (Müller, 1935) (BOUR 2008; RAMÍREZ *et al.*, 2008); apresentam distribuição através de Madagascar e da América do Sul (NOONAN, 2000).

As espécies são adaptadas para a vida aquática; apresentam cascos relativamente achatados e hidrodinâmicos, olhos e narinas dispostos dorsalmente no crânio, patas com membranas interdigitais bem desenvolvidas, com cinco garras nas mãos e quatro nos pés (RUEDA-ALMONACID *et al.*, 2007).

Na Amazônia, as espécies existentes da família Podocnemidae constituem uma importante fonte alimentar para a população local e possui um longo histórico de sobre-exploração (BATES, 1863; MITTERMEIER, 1978; JOHNS, 1987). Essa exploração excessiva é a maior causa do declínio na abundância de quelônios na região (KEMENES & PEZZUTI, 2007; SCHNEIDER *et al.*, 2011).

Nesta dissertação, serão abordadas duas espécies da família Podocnemidae, com ocorrência na região Amazônia, e frequentemente sobre-exploradas para consumo e comercialização:

### 1.2.1 *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812)

A Tartaruga-da-Amazônia (*P. expansa*) (**Figura 3**) é a maior espécie do gênero *Podocnemis*, chegando a medir 90cm de comprimento e pesar até 65kg (PRITCHARD & TREBBAU, 1984; VOGT, 2008).

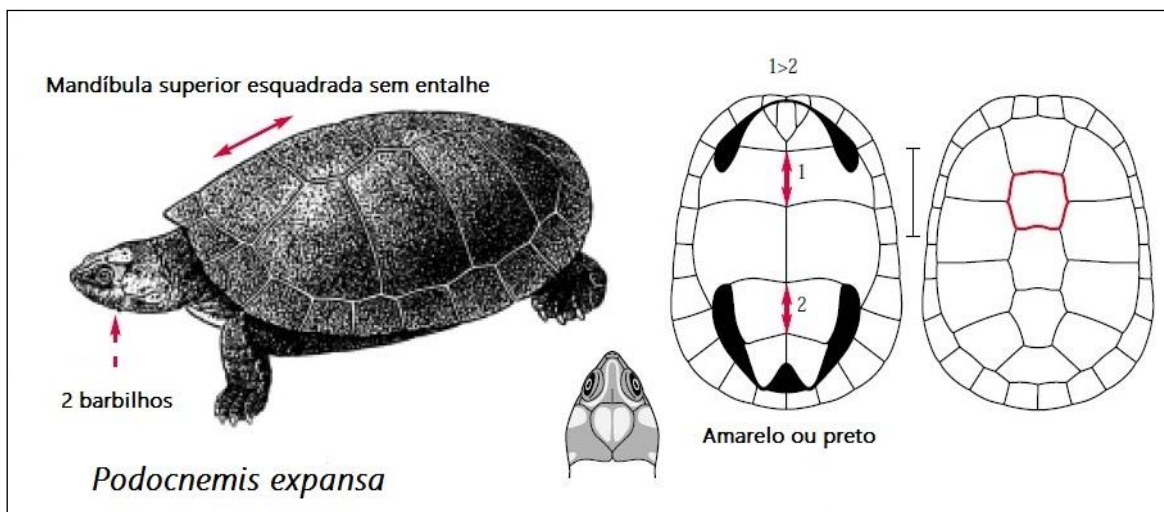
Geralmente, possuem coloração marrom ou verde oliva, com carapaça achatada e mais larga na região posterior (**Figura 4**). Filhotes e juvenis dessa espécie apresentam manchas amarelas na cabeça; fêmeas adultas sofrem variação ontogenética nesse colorido amarelo, tornando-se marrom-escuro com o avançar da idade. Apresentam dimorfismo sexual: os machos são menores que as fêmeas, possuem a carapaça mais estreita e cauda maior. Os indivíduos adultos são predominantemente herbívoros (OJASTI, 1996; VOGT, 2008).



**Fig. 3:** Espécime de *Podocnemis expansa* (Fonte: IBAMA/Divulgação)

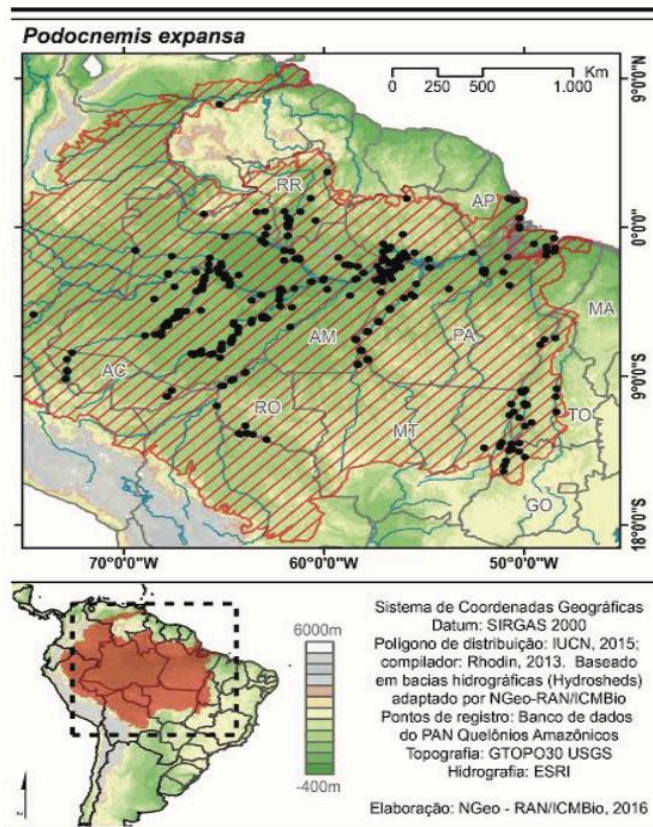
*P. expansa* apresenta distribuição em toda Bacia Amazônica (**Figura 5**), ocorrendo em sistemas de água branca e escura, e lagos nas florestas (ERNST & BARBOUR, 1989); adentram nas florestas alagadas, durante estações chuvosas, e vão para rios em busca de praias arenosas para reprodução, durante estações secas (RUEDA-ALMONACID *et al.*, 2007; VOGT, 2008), apresentando um único período reprodutivo anual, quando ocorre nidificação agregada; o período da desova varia de acordo com a localidade e o ciclo de cheia e seca dos rios (ALHO *et al.*, 1985; FERREIRA JÚNIOR & CASTRO, 2003).

*P. expansa* é uma das espécies mais abundantes e também mais consumidas na região Amazônica (PEZZUTI *et al.*, 2010), o que resultou em uma exploração indiscriminada e, conseqüentemente, na declividade de populações dessa espécie na região, provocando a vulnerabilidade ou perigo de extinção local (MOLL & MOLL, 2004; PEARSE *et al.*, 2006; VOGT, 2008). Seu estado de conservação no território brasileiro é de quase ameaçada de extinção (NT) (ICMBio, 2014).



**Fig. 4:** Esquema de identificação para *Podocnemis expansa* (Fonte: adaptado de CITES, 1999)





**Fig. 5:** Distribuição de *Podocnemis expansa* (Fonte: adaptado de NGeo - RAN/ICMBIO, 2016).

### 1.2.2 *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848)

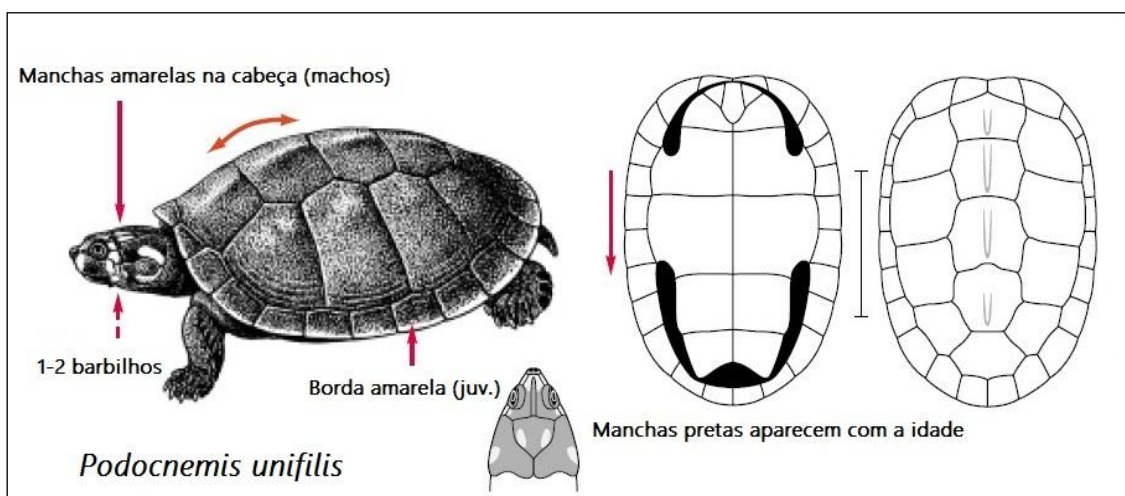
O Tracajá (*Podocnemis unifilis*) (**Figura 6**) é a segunda espécie em proporções de tamanho, sendo menor somente que a Tartaruga-da-Amazônia (*P. expansa*), chegando a medir um pouco menos de 50cm de comprimento e pesando até 12,5kg (VOGT, 2008; IBAMA, 2016).

Os filhotes e machos adultos apresentam manchas amarelas na cabeça e bordas amarelas na carapaça; nas fêmeas, esse colorido amarelo torna-se marrom-escuro com o avançar da idade. Quando adultos, são reconhecido pela carapaça oval e presença de uma quilha mediana (**Figura 7**) (PRITCHARD & TREBBAU, 1984; CITES, 1999; VOGT, 2008). O dimorfismo sexual é evidente em adultos, sendo os machos de menor tamanho, carapaça mais estreita e cauda mais longa (SALERA-JUNIOR & MALVASIO, 2005). Quando adultos, são predominantemente herbívoros (VOGT, 2008).

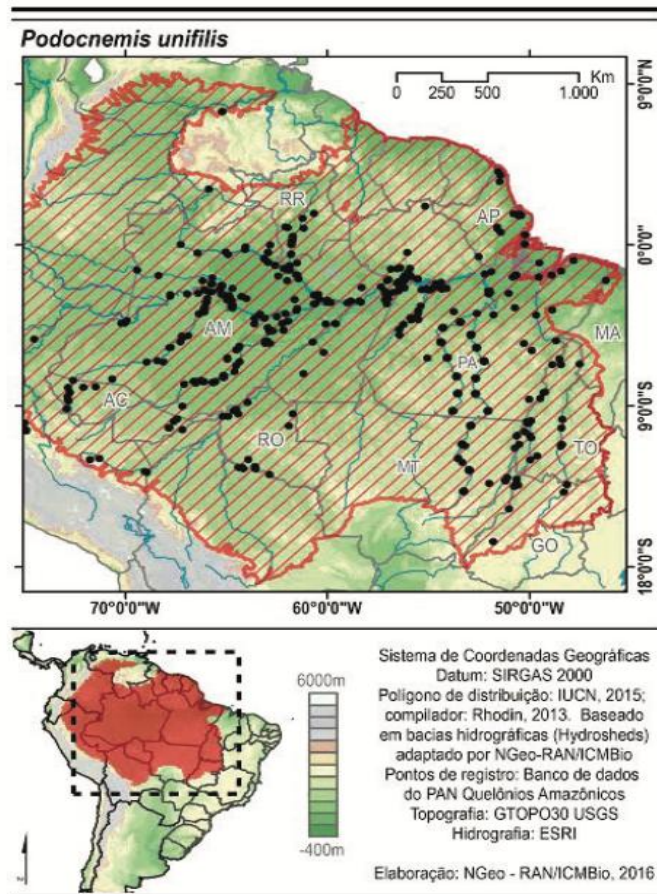


**Fig. 6:** Espécime de *Podocnemis unifilis* (Fonte: RAN/ICMBio/Divulgação)

A distribuição de *P. unifilis* na Bacia Amazônica é ampla (**Figura 8**), ocorrendo em uma variedade de habitats, tais como: áreas de florestas inundadas, lagoas marginais, pântanos, rios, igarapés, lagos e em proximidades de praias arenosas (FACHIN-TERÁN & VOGT, 2004). Geralmente, a desova ocorre individualmente, mas já foram relatados pequenos grupos de fêmeas nidificando ao mesmo tempo. Até duas desovas podem ser realizadas em uma mesma estação, que ocorre anualmente durante o período de seca dos rios (SOINI, 1994; VOGT, 2008).



**Fig. 7:** Esquema de identificação para *Podocnemis unifilis* (Fonte: adaptado de CITES, 1999)



**Fig. 8:** Distribuição de *Podocnemis unifilis* (Fonte: adaptado de NGeo - RAN/ICMBIO, 2016).

Assim como a Tartaruga-da-Amazônia, o Tracajá é amplamente consumido na região Amazônica, sendo uma das principais fontes de proteínas para populações indígenas e ribeirinhas (PEZZUTI, 2010; FACHIN-TERÁN & VOGT, 2004). Seu estado de conservação no território brasileiro é de quase ameaçado de extinção (NT) (ICMBio, 2014).

### 1.3 DNAs REPETITIVOS

Além das cópias simples de sequências únicas de DNA que compõem os genes, uma grande quantidade de DNA sequenciado nos cromossomos eucarióticos é de natureza repetitiva, ocorrendo em vários níveis de repetição nos genomas dos organismos (KLUG *et al.*, 2009). Também referidos como “DNAs repetitivos”, estes correspondem a um importante componente – podendo representar mais de 80% – dos genomas eucarióticos (CHARLESWORTH *et al.*, 1994; PLOHL *et al.*, 2008). A grande

variação encontrada no tamanho e organização do genoma entre os eucariotos é atribuída, principalmente, ao acúmulo dessas sequências repetitivas (PETROV, 2001; KIDWELL, 2002; DEININGER *et al.*, 2003; KAZAZIAN, 2004; FESCHOTTE & PRITAM, 2007; BOHNE *et al.*, 2008; KORDIS, 2009).

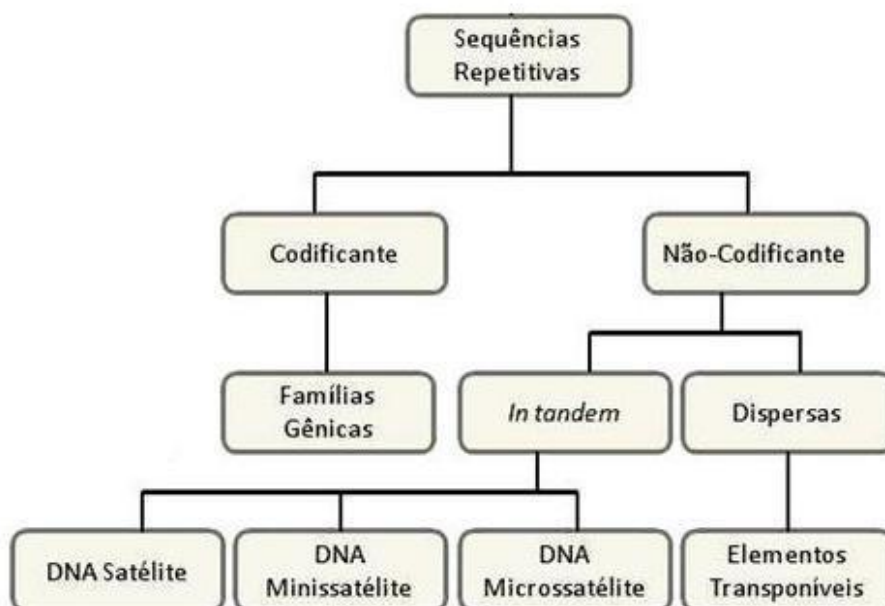
Embora atualmente sabe-se que estas sequências podem ser transcritas, por um longo período elas foram consideradas por consenso como não-codificantes (*junk DNA*), devido à limitada densidade gênica e baixo índice de recombinação. No entanto, estas representam um tesouro extraordinário de informações sobre processos biológicos, guardando pistas cruciais sobre eventos evolutivos (SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1998; JONG *et al.*, 1999; LANDER *et al.*, 2001).

Muitos trabalhos têm por objetivo o isolamento e a caracterização dessas sequências repetitivas nos mais diversos grupos de organismos. Como marcadores passivos, fornecem ensaios para estudar processos de mutação e seleção. É possível reconhecer arranjos de sequências repetitivas, originadas ao mesmo tempo, e seguindo os seus destinos em diferentes regiões do genoma ou em espécies diferentes. Como agentes ativos, reformulam o genoma, causando rearranjos ectópicos, criando genes inteiramente novos e/ou modificando genes já existentes. Essas sequências permitem lançar luz sobre a estrutura e dinâmica no cariótipo, fornecendo ferramentas para estudos genéticos e populacionais (LANDER *et al.*, 2001).

Sequências repetitivas são relativamente homogêneas dentro de uma mesma espécie, apresentando, contudo, diferenças significativas quando tratamos de espécies distintas, mesmo considerando um único gênero (SMITH, 1976). Estudos sugerem o envolvimento de DNAs repetitivos na organização estrutural e funcional do genoma, como replicação do DNA (LI *et al.*, 2002), recombinação (BIET *et al.*, 1999), expressão gênica (LIU *et al.*, 2001), rearranjos cromossômicos (KIDWELL, 2002), e ainda, na regulação de genes específicos (BOURQUE *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2007).

DNAs repetitivos constituem sequências, idênticas ou semelhantes, classificadas nos genomas eucarióticos em codificantes, representadas pelas famílias multigênicas, compondo DNA ribossomal (rDNA), proteínas histônicas e pequenos RNAs nucleares, e não codificantes, podendo se organizar em blocos (*in tandem*) lado a lado, que incluem DNAs satélites, DNAs minissatélites e DNAs microssatélites, ou dispersos ao longo do genoma, remetendo aos Elementos Transponíveis (*Transposable Elements - TEs*) – embora algumas vezes estes *TEs* sejam encontrados em *clusters* nos

cromossomos – (SUMNER, 2003; CHARLESWORTH *et al.*, 1994; NAGODA, *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2011) (**Figura 9**).



**Fig. 9:** Organização de diferentes classes de DNAs repetitivos em eucariotos (Fonte: adaptado de MARTINS *et al.*, 2011).

As famílias multigênicas são organizadas em relação aos genes ribossomais (DNAr) em duas famílias: DNAr 45S (incluindo 18S, 5.8S e 28S), responsável pela organização do nucléolo, e o rDNA 5S, sequência de codificação altamente conservada de 120 pares de bases (pb) e uma sequência variável espaçadora não transcrita (NTS) (LONG & DAWID, 1980). Estudos sobre organização do DNAr 5S podem fornecer dados úteis para compreensão da organização do genoma e da dinâmica das sequências repetitivas, além de atuarem como marcadores genéticos para a identificação de espécies, subespécies, populações, ou híbridos (MARTINS & WASKO, 2004).

Também são representantes das famílias multigênicas os genes de histonas e *small nuclear RNAs* (snRNA). DNA-histônicos contêm sequências gênicas responsáveis por codificar cinco tipos de proteínas: H1, H2A, H2B, H3 e H4 (NAGODA *et al.*, 2005), que estão entre as mais conservadas formas de proteínas presentes em todos os eucariotos, possuindo importante papel em processos celulares, como na regulação da transcrição, na formação da heterocromatina e no reparo do DNA

(LAW & CHEUNG, 2012); snRNA U2 participam da formação do spliceossomo, atuando ativamente no processo de maturação do RNAm (COLGAN *et al.*, 1998).

RNAs não-codificantes (ncRNAs) apresentam papéis em uma variedade de processos, incluindo a regulação da transcrição, replicação dos cromossomos, modificação e processamento do RNA, estabilidade do RNA mensageiro e tradução, regulação da expressão gênica, e até mesmo na translocação e degradação de proteínas (EDDY, 2001; AMBROS, 2001; STORZ, 2002).

Os DNAs satélites podem ser classificados de acordo com o tamanho do fragmento em: satélites (20 a 1000 pb), localizados basicamente em regiões heterocromáticas, como nos centrômeros; minissatélites ou VNTR (número variável de repetições em tandem) (10 a 100 pb), encontrados no interior dos genes e entre eles, dispersos ao longo do genoma; e microssatélites ou STR (repetições curtas em tandem) (até 6 pb) (CHISTIAKOV *et al.*, 2006; KLUG *et al.*, 2009).

Estudos apontam DNAs satélites contribuindo para a organização da cromatina, estrutura do DNA, regulação da recombinação do DNA, processos de transcrição e tradução, expressão gênica, e dinâmica do ciclo celular (CHISTIAKOV *et al.*, 2006).

*TEs* são agrupados em duas categorias (Retrotransposons e Transposons), com base na molécula intermediária de transposição (RNA ou DNA, respectivamente) (CHARLESWORTH *et al.*, 1994; KAZAZIAN, 2004; WICKER *et al.*, 2007). Ambas as classes existem como elementos autônomos, que codificam todas as enzimas necessárias para a transposição, e não autônomos, que não possuem capacidade de codificação e dependem de enzimas produzidas por elementos autônomos (WICKER *et al.*, 2007; SCHEMBERGER *et al.*, 2016).

Os Retrotransposons (elementos de classe I) realizam o mecanismo de transposição por inserção de cópias de um elemento sintetizado a partir do RNA deste, que é transcrito em DNA pela enzima transcriptase reversa própria. Esses elementos são separados usando o critério de presença/ausência de longas repetições terminais (LTR, *Long Terminal Repeat*), sendo retrotransposons LTR ou retrotransposons não-LTR. Elementos pertencentes a família *Rex* são exemplos de representantes desta classe de *TE* (VOLFF *et al.*, 2001; SNUSTAD & SIMMONS, 2013).

Os Transposons (elementos de classe II) mobilizam-se usando cópias de seu DNA sintetizadas por uma enzima transposase. Estes elementos podem realizar a transposição mantendo-se no sítio original e inserindo cópias em outros locais do genoma, através da replicação do DNA do elemento transponível, aumentando assim o

número de cópias (transposição replicativa; apenas em procariotos). Outra forma de transposição ocorre por excisão de um elemento e sua inserção em outro sítio (transposição não-replicativa ou transposição de “*cortar e colar*”; ocorre em procariotos e eucariotos) (CAPY *et al.*, 1998; SNUSTAD & SIMMONS, 2013). Um exemplo é o transposon *Mariner* (HAREN *et al.*, 1999).

*TEs* compreendem uma grande fração dos genomas dos organismos, acumulando várias características que, presumivelmente, aumentam sua capacidade para multiplicar o número de cópias, apresentando uma grande variação de uma espécie para outra, seja em número de cópias e/ou tipo de distribuição. Tem sido proposto que *TEs* desempenham um papel importante no aumento do potencial evolutivo dos organismos, devido ao amplo espectro de mutações produzidas pela sua atividade, sendo também fonte de diversidade genética, permitindo uma resposta a alterações ambientais (KIDWELL & LISCH, 1997, 2000).

Chalopin *et al.* (2015) apresentaram uma visão geral do conteúdo, diversidade, atividade e evolução dos *TEs* em linhagens de vertebrados. Os resultados obtidos mostraram padrões comuns desses repetitivos em vertebrados, mas também grandes diferenças na atividade e evolução dessas sequências, o que, muito provavelmente, contribuiu para divergência no genoma em vertebrados.

Considerados fortes agentes mutagênicos, os *TEs* apresentam potencial para produzir uma ampla gama de variações nos genomas dos organismos (VORECHOVSKY, 2010; HANCKS & KAZAZIAN, 2012). As mutações induzidas por suas atividades estendem-se desde modificações no tamanho e arranjo de genomas inteiros, até substituições, deleções e inserções de um único nucleotídeo. Além da sua capacidade de aumentar o tamanho do genoma, após a transposição, podem induzir rearranjos cromossômicos, tal como deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas (KIDWELL, 2002; BURNS & BOEKE, 2012).

Os rearranjos desencadeados a partir das atividades de *TEs* podem ser prejudiciais para os organismos, através de alteração na regulação da codificação gênica, ou através da modificação de outras sequências genômicas importantes (KAZAZIAN, 2004); por outro lado, são importantes para a evolução gênica (BOHNE *et al.*, 2008; FESCHOTTE, 2008; ELLISON & BACHTROG, 2013; XIE *et al.*, 2013). Em particular, muitos *éxons* e sequências reguladoras de genes nos organismos são derivados de *TEs*-codificantes de proteínas (VOLFF, 2006; REBOLLO *et al.*, 2012; JACQUES *et al.*, 2013; KAPUSTA *et al.*, 2013).

Britten (1997) descreveu os efeitos evolutivos da inserção de sequências repetitivas em uma ampla variedade de organismos e concluiu que os *TEs* fornecem uma fonte significativa de variação na regulamentação da evolução desses organismos.

A natureza repetitiva dessas sequências os torna marcadores úteis para o mapeamento cromossômico, pois fornecem informações sobre a estrutura e organização do genoma e facilitam a detecção de rearranjos de cariótipos (KAVALCO *et al.*, 2013; GURSEL *et al.*, 2003; CABRAL-DE-MELLO, 2010), além de permitir uma melhor caracterização da biodiversidade e da carioevolução (VICARI *et al.*, 2010).

#### **1.4 ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM QUELÔNIOS**

Estudos citogenéticos em espécies pertencentes à ordem Testudines são escassos e baseados, principalmente, em métodos de coloração convencional, permitindo a descrição da macro-estrutura cariotípica, como o número diplóide, tamanho e forma cromossômica, sendo poucos os trabalhos com o grupo utilizando técnicas de citogenética molecular: um com representante da família Chelidae e dois com representantes da família Podocnemidae.

Noletto *et al.* (2006) realizaram a caracterização cariotípica de *Hydromedusa tectifera*, cágado popularmente conhecido como “pescoço-de-cobra”, pertencente a família Chelidae. As análises incluíram bandeamentos C e G, apresentando número diplóide igual a 58, composta por 22 macro e 36 microcromossomos, Ag-NOR, indicando apenas uma marcação localizada no telômero do braço longo de um microcromossomo acrocêntrico, e técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (*FISH*) com sonda de rDNA 18S, marcando em um par de microcromossomos.

Ventura *et al.* (2014), caracterizaram o cariótipo de *Peltocephalus dumerillianus*, tartaruga popularmente conhecida como “cabeçudo”, pertencente a família Podocnemidae. Foram desenvolvidos bandeamento C, G, Ag-NOR e ferramentas moleculares que empregaram *FISH* com sondas de sequências teloméricas e rDNA 45S. Os bandeamentos C mostraram-se tênues na região pericentromérica da maioria dos pares, com exceção do par 1, que exibiu um grande bloco de heterocromatina constitutiva na região de constrição secundária. Marcações com Ag-NOR também foram observadas na mesma região do par 1. As análises da *FISH* mostraram sinais teloméricos restritos para as extremidades dos cromossomos, e



marcações de rDNA 45S localizadas exclusivamente na região de constrição secundária do par 1.

Noronha *et al.*, (2016) fizeram uma análise comparativa dos cariótipos de *P. expansa* e *P. unifilis* utilizando sonda de rDNA 18S, sequências teloméricas e retrotransposon *Rex 6*. Os autores sugeriram que rearranjos cromossômicos, do tipo inversões pericêntricas, são responsáveis pelas diferenças na fórmula cariotípica entre as espécies, conservando o mesmo número diplóide destas ( $2n=28$ ). Estabeleceram ainda uma nova organização cromossômica para as espécies. Propuseram que, o retroelemento *Rex 6* pode ter um papel fundamental na estrutura genômica das espécies estudadas, devido à sua distribuição em regiões eucromáticas, com possibilidade de interferir na regulação de genes.

Em Podocnemidae, os gêneros *Podocnemis* e *Erymnochelys* (*P. erythrocephala*, *P. expansa*, *P. lewyana*, *P. sextuberculata*, *P. unifilis*, *P. vogli* e *E. madagascariensis*) apresentam número diplóide igual a 28 (AYRES *et al.*, 1969; HUANG & FRED CLARK, 1969; RHODIN *et al.*, 1978; BULL & LEGLER, 1980; ORTIZ *et al.*, 2005; FANTIN & MONJELÓ, 2011; GUNSKI *et al.*, 2013; NORONHA *et al.*, 2016). Dentro da família, a exceção é a espécie *Peltocephalus dumerilianus*, única representante do gênero *Peltocephalus*, apresentando número diplóide igual a 26, o menor número diplóide em Testudines (variando de  $2n = 26$  a  $2n = 96$ ) (AYRES *et al.*, 1969; BULL & LEGLER, 1980; VENTURA *et al.*, 2014).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Estudar a dinâmica organizacional de DNAs repetitivos em cariótipos de *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* (Podocnemidae, Testudines), para inferir no processo evolutivo dessas sequências no genoma de quelônios.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Isolar e amplificar sequências repetitivas de DNAs ribossomais, Histonas, snDNAs, e Elementos Transponíveis, a fim de fornecer marcadores moleculares para *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis*;

- b) Mapear fisicamente diferentes classes de DNAs repetitivos por Hibridização *in situ* Fluorescente as espécies *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* para avaliar sua dinâmica genômica;
- c) Verificar os padrões de organização cromossômica dos DNAs repetitivos em *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* e comparar entre as espécies e com outros quelônios.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 AMOSTRAS**

As coletas do material biológico dos exemplares de *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* foram realizadas em parceria com Museu Emílio Goeldi e Bosque Rodrigues Alves. Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações da justificativa ética editorial para o uso e tratamento de quelônios na pesquisa. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (Número de Licença: 68-2015).

#### **3.2 OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS**

##### **3.2.1 Cultura Temporária de Linfócitos**

A cultura temporária de linfócitos foi desenvolvida segundo Moorhead *et al.* (1960), com adaptações. Utilizou-se seringa previamente heparinizada para coleta de sangue total pela veia caudal dorsal dos espécimes. Em capela de fluxo laminar, as agulhas foram trocadas para evitar contaminação e então inoculados 0,5 mL de sangue total para cada 5 mL de meio RPMI – 1640 (SIGMA), meio de suporte celular basal, garantindo condições adequadas para cultura e induzindo o crescimento de linfócitos; posteriormente, as amostras foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 72 horas para o crescimento celular.

Durante o período de incubação, as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas pelo menos uma vez ao dia. Uma hora antes do término das 72 horas, foi adicionado aos meios 0,1 mL de colchicina (Colchemid; concentração 1:40) a fim de impedir a formação do fuso acromático, por dissolução da tubulina, e conseqüentemente

a parada do ciclo celular na fase de metáfase; esses voltaram então à estufa para completar o tempo de cultivo.

Encerrado o tempo de cultivo, o material foi transferido para tubos de centrifuga e submetidos à centrifugação à 1000 RPM por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, acrescentou-se 5 mL de solução hipotônica (KCl) a 0,075M previamente aquecida a 37°C, para o intumescimento dos núcleos, permitindo um maior espalhamento dos cromossomos, ressuspensão do material com o auxílio de pipeta pasteur e incubando novamente em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 20 minutos. Após esse período, adicionou-se imediatamente 1 mL de Fixador Carnoy 4:1 (3 mL de metanol + 1 mL de ácido acético) para cessar a ação da solução hipotônica. O material foi ressuspensionado e centrifugado à 1000 RPM por 5 minutos, descartando o sobrenadante e acrescentando 5 mL de Fixador Carnoy 4:1. O material foi armazenado a -20°C por 3 dias.

Após esse período, foi feita a lavagem do material: o mesmo foi centrifugado à 1000 RPM por 5 minutos, descartando o sobrenadante e acrescentando 5 mL de Fixador Carnoy 3:1 (2 mL de metanol + 1 mL ácido acético). O processo foi repetido por mais 3 vezes e, por fim, o material foi armazenado a -20°C para posterior preparação citológica das lâminas.

### **3.3 PREPARAÇÃO CITOLÓGICA DAS LÂMINAS**

Para a preparação citológica das lâminas, essas foram previamente lavadas com sabão neutro, água destilada e álcool 70%, e secas a temperatura ambiente. O material foi então ressuspensionado e, posteriormente, pingou-se 8 µL do mesmo sobre a lâmina, a qual continha uma película de água para proporcionar uma diferença de temperatura entre ambos, possibilitando um melhor espalhamento dos cromossomos metafásicos.

### **3.4 CITOGENÉTICA MOLECULAR**

#### **3.4.1 Extração de DNA**

A técnica de extração de DNA seguiu o método de proteinase K e fenol/clorofórmio descrito por Sambrook *et al.*, (1989), com modificações, utilizando tecido muscular das espécies *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis*: Colocar 20 mg de tecido muscular em tubo de eppendorf de 1,5mL. Adicionar 300 µL de tampão de

homogeneização, 300 µL de tampão de lise e 20 µL de proteinase K (10mg/mL). Misturar bem e encubar em banho-maria por 30 minutos a 55°C, agitando cuidadosamente a cada 10 minutos. Deixar esfriar em temperatura ambiente. Adicionar 700 µL de fenol tamponado. Centrifugar a 14000 RPM por 15 minutos. Transferir cuidadosamente o sobrenadante para outro tubo. Adicionar 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Misturar por 10 minutos e centrifugar a 14000 RPM por 10 minutos. Retirar a camada superior e transferir para outro eppendorf de 1,5 mL. Adicionar 100 µL de acetato de sódio (3M; pH 4,8) e misturar bem. Adicionar 700 µL de isopropanol para precipitar o DNA, misturando cuidadosamente. Centrifugar por 10 minutos a 14000 RPM e descartar o sobrenadante. Adicionar 300 µL de etanol 70% gelado. Centrifugar por 5 minutos a 14000 RPM e descartar o sobrenadante. Secar o DNA a 37°C de 15 a 25 minutos. Eluir a amostra com 30 µL de água ultrapura.

Ao final do processo, as amostras foram quantificadas utilizando equipamento Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments) com software Gen5 2.03.1 e diluídas para uma concentração aproximada de 100 ng/µL.

#### 3.4.2 Amplificação, quantificação e purificação de DNAs Repetitivos

As amplificações dos DNAs Repetitivos foram realizadas pelo procedimento de Reação em Cadeia Polimerase (PCR), para genes de rDNA 5S, snDNA U2, Histonas H1 e H3, transposon *Tc1-Mariner*, e retrotransposons *Rex1* e *Rex3*, utilizando *primers* descritos em anexo neste trabalho. A eficiência de cada amplificação foi examinada por eletroforese em gel de agarose 1%, e os resultados visualizados sob luz ultravioleta. A purificação dos fragmentos de DNA foi realizada utilizando GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich), conforme recomendações do fabricante. Os produtos obtidos foram sequenciados para comprovação de similaridade com sua sequência alvo amplificada e serão depositados no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

#### 3.4.3 Marcação das Sondas

Os produtos das PCRs foram quantificados utilizando equipamento Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments) com software Gen5 2.03.1 e marcados por *Nick Translation*: BioNick Labeling System (Invitrogen), para marcações

com biotina, e DIG-Nick Translation Mix (Roche), para as marcações com digoxigenina.

#### 3.4.4 Técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) com Sondas de DNAs Repetitivos

As FISHs seguiram o protocolo estabelecido por Pinkel *et al.*, (1986) com adaptações:

##### 3.4.4.1 Preparação das lâminas

Inicialmente, as lâminas citologicamente preparadas foram tratadas com uma solução de RNase (0.5µL de RNase + 100µL de 2XSSC), cobertas com lamínula plástica, e mantidas à temperatura de 37°C em câmara escura por 30 minutos. Após isso, as lâminas foram lavadas em solução salina 1xPBS (36 mL de água destilada + 4 mL de 10xPBS) por 5 minutos agitando cuidadosamente, em temperatura ambiente. As lâminas foram então mergulhadas em solução de pepsina 1% (50 mL de HCl 4,8 N + 0,5 mL de pepsina) a 37°C por 20 minutos, para remover o excesso de citoplasma. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em solução 1xPBS por mais 5 minutos, agitando cuidadosamente, em temperatura ambiente.

A desidratação das lâminas foi realizada através de uma bateria de álcool (2x álcool 70% por 2 minutos cada, 2x álcool 90% por 2 minutos cada e 2x 100% por 10 minutos cada). As lâminas foram então deixadas em estufa a 65°C por 1 hora para envelhecimento.

##### 3.4.4.2 Hibridização

Para a desnaturação dos cromossomos, as lâminas foram mergulhadas em solução de Formamida 70% (70 mL de formamida + 30 mL de 2xSSC) à 62°C por 40 segundos e, em seguida, rapidamente imergidas em álcool 70% gelado durante 4 minutos. Após, foram submetidas novamente à desidratação em bateria de álcool, como descrito anteriormente, porém, excluindo-se o primeiro álcool 70%.

Para a preparação da solução contendo a sonda, primeiramente diluiu-se a mesma em tampão de hibridização de 77% (3µL de sonda + 10 µL de tampão de hibridização). Essa solução foi desnaturada a temperatura de 70°C por 15 minutos e

acondicionada imediatamente em gelo até pingar sobre a lâmina. As lâminas foram cobertas com lamínula de vidro, seladas e incubadas em câmara úmida a 37°C durante 48 horas para hibridização.

#### 3.4.4.3 Lavagem de estrigência e detecção da sonda

Para a remoção de possíveis marcações inespecíficas, as lâminas foram lavadas uma vez em solução de Formamida 50% (50 mL de formamida + 50 mL de 2xSSC) por 2 minutos, duas vezes em solução 2xSSC por 2 minutos em cada, e, por fim, uma vez em solução 4xTween (200 mL de 4xSSC + 100 µL de Tween) por 2 minutos, todos à temperatura de 40°C. Posteriormente, foram colocadas sobre as lâminas uma solução de detecção contendo fluorocromo: 0,2 µL de avidina CY3 para 100 µL de 4xTween, para marcações com biotina, ou 0,4 µL de antidigoxigenina FITC para 100 µL de 4xTween, para marcações com digoxigenina. As lâminas contendo solução de detecção foram cobertas com lamínula plástica e incubadas em câmara úmida a 37°C por 40 minutos.

Para a remoção do excesso de fluorocromo, as lâminas foram lavadas em solução 4xTween por 3 vezes, 3 minutos cada, a temperatura de 37°C. Os cromossomos foram contracorados com 7µL de DAPI com Antifade Vectashield H-1000 (Vector) e cobertos com lamínula de vidro para visualização em microscopia de epifluorescência.

#### 3.4.4.4 Captura de Imagens

As metáfases foram visualizadas em microscópio de epifluorescência, com filtros apropriados para cada fluorocromo, e capturadas através do software Nis-Elements no microscópio Nikon H550S. A edição das imagens foi feita com auxílio do programa Adobe Photoshop CS6.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico intitulado: **Karyoevolution of repetitive DNA in *Podocnemis* (Testudines, Podocnemidae).**

## 5. CAPÍTULO 1

### **Karyoevolution of repetitive DNA in *Podocnemis* (Testudines, Podocnemidae)**

Manoella Gemaque Cavalcante<sup>1</sup>, Carlos Eduardo Bastos<sup>1</sup>, Cleusa Yoshiko Nagamachi<sup>1,3</sup>, Julio Cesar Pieczarka<sup>1,3</sup>, Renata Coelho Rodrigues Noronha<sup>1</sup>

**Title:** Karyoevolution of repetitive DNA in *Podocnemis* (Testudines, Podocnemidae)

**Authors:** Manoella Gemaque Cavalcante<sup>1</sup>, Carlos Eduardo Bastos<sup>1</sup>, Cleusa Yoshiko Nagamachi<sup>1,2</sup>, Julio Cesar Pieczarka<sup>1,2</sup>, Renata Coelho Rodrigues Noronha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos Avançados em Biodiversidade (CEABIO), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

<sup>2</sup>CNPq Researcher

**E-mails:** MGC: [manugemaque01@gmail.com](mailto:manugemaque01@gmail.com), CEB: [carlostedu.bastos@gmail.com](mailto:carlostedu.bastos@gmail.com), CYN: [cleusanagamachi@gmail.com](mailto:cleusanagamachi@gmail.com); JCP: [juliopieczarka@gmail.com](mailto:juliopieczarka@gmail.com), RCRN: [renatarcrn@gmail.com](mailto:renatarcrn@gmail.com)

**\*Correspondence address:** Renata Coelho Rodrigues Noronha

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Campus do Guamá  
Av. Perimetral, s/n. Guamá

66075-900 Belém – Pará, Brazil

**E-mail:** [renatarcrn@gmail.com](mailto:renatarcrn@gmail.com)



## Abstract

The Podocnemidae family (order Testudines) is represented by 3 gener: *Erymnochelys*, *Peltocephalus* and *Podocnemis*. The genus *Podocnemis* currently includes six species, all South American. In the present research, molecular cytogenetic studies were performed to compare the species *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* through the analysis of repetitive DNA sequences, from the isolation and characterization of multigenic families and transposition elements by Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH); these sequences are useful tools for defining genomic structure, organization and evolution in various organisms. The results show  $2n = 28$  for both species; *The P. expansa* chromosomes are composed of 20 metacentric and submetacentric pairs, four subtelocentric and four acrocentric, and *P. unifilis* with 22 metacentric and submetacentric pairs, two subtelocentric and four acrocentric. FISH analysis revealed markings using probes with 5S rDNA, U2 snDNA, Histone H1 and H3 genes, and transposable elements (TEs), *Tc1-Mariner* transposon, and *Rex1* and *Rex3* retrotransposons. Signals for 5S rDNA were visualized organized in clusters in interstitial region in pairs 1 and 11 in *P. expansa* and *P. unifilis*. Markings with snDNA U2 showed similar signals for the two species, located in the pericentromeric region of par 6 in both. Histone H1 gene was detected in the interstitial region of the first chromosomal pair in *P. expansa* and *P. unifilis*; for histone H3 gene, clusters located in centromeric and pericentromeric regions were detected in six chromosome pairs in *P. unifilis*. Besides these markings, additional signals in chromosomal pair 13 were found in *P. expansa*. The distribution pattern found for the transposable elements *Tc1-Mariner*, *Rex1* and *Rex3* was dispersed throughout all chromosomes in the two species, nonetheless, with accumulations of these repetitive tending to colonize heterochromatic regions, similar to the two species analyzed. The results allowed us to infer a probable association of 5S rDNA and H1 and H3 genes with different classes of TEs, acting in the dispersion of multigenes from transposition events. We also describe the genomic organization of U2 snDNA conserved among the species analyzed. These data are unprecedented for the order Testudines, allowing to understand the organizational dynamics of repetitive DNAs, besides contributing to the karyoevolution of the group.

**Keywords:** Podocnemidae, molecular cytogenetics, repetitive DNA, multigenes, transposable elements.

## Introduction

The Podocnemidae family (Testudines order) comprises a monophyletic group represented by eight species, distributed in three genera: *Erymnochelys*, *Peltocephalus* and *Podocnemis*. These species have a low diploid number, varying from 26 to 28 chromosomes (AYES *et al.*, 1969; BARKER *et al.*, 1976; BICKHAM & ROGERS, 1985; BULL & LEGLER, 1980; VENTURA *et al.*, 2014; NORONHA *et al.*, 2016). Studies concern the organization and evolutionary dynamics of repetitive DNAs are scarce for the family, with only the conservatism of 18S rDNA in three species (*Podocnemis expansa*, *Podocnemis unifilis* and *Peltocephalus dumerilianos*), presence of interstitial telomeric regions (ITS) in *P. unifilis* and markings of the *Rex 6* retroelement in eucromatic regions of *P. expansa* and *P. unifilis* (AYRES *et al.*, 1969; HUANG & FRED CLARK, 1969; RHODIN *et al.*, 1978; BULL & LEGLER, 1980; ORTIZ *et al.*, 2005; FANTIN & MONJELÓ, 2011; GUNSKI *et al.*, 2013, VENTURA *et al.*, 2014; NORONHA *et al.*, 2016).

A large part of the eukaryotic genome is composed of DNAs of a repetitive nature (CHARLESWORTH *et al.*, 1994), which include multigenic families encoding ribosomal DNAs, histone genes and small nuclear DNAs, repeated sequences arranged in clusters as satellite DNAs, furthermore, dispersed sequences capable of moving along the genome according to its intermediate transposition, DNA or RNA (transposons or retrotransposons, respectively) (MARTINS *et al.*, 2011). The repetitive nature of these sequences makes them useful markers for chromosome mapping because they provide information about the structure and organization of the genome and facilitate the detection of karyotype rearrangements (KAVALCO *et al.*, 2013; GURSEL *et al.*, 2003; CABRAL-DE-MELLO, 2010), besides allow better characterization of biodiversity and karyoevolution (VICARI *et al.*, 2010).

Studies suggest the involvement of repetitive DNAs in the structural and functional organization of the genome, such as DNA replication (LI *et al.*, 2002), gene recombination (BIET *et al.*, 1999), gene expression (LIU *et al.*, 2001), chromosomal rearrangements (KIDWELL, 2002), regulation of specific genes (WANG *et al.*, 2007; BOURQUE *et al.*, 2008), and post-transcription and translation regulation, at the origin of new genes and non-coding RNA (LONG *et al.*, 2003; MARINO-RAMIREZ *et al.*, 2005; FESCHOTTE, 2008; HERPIN *et al.*, 2010; KAPUSTA *et al.*, 2013; SCHEMBERGER *et al.*, 2016).

Multigenic families are groups of descended genes from a common ancestral gene, presenting similarities in structure and function (NEI & ROONEY, 2005). They include ribosomal DNA (rDNA), which transcribe ribosomal RNA (rRNA), the main component of ribosomes, which actively participate in protein synthesis in organisms (SMIT *et al.*, 2007), histone genes, which are among the most conserved forms of proteins present in all eukaryotes, having an important role in cellular processes, such as regulation of transcription, heterochromatin formation and DNA repair (LAW & CHEUNG, 2012), and snRNAs, which participate in spliceosome formation, actively acting in the process of maturation of mRNA (COLGAN *et al.*, 1998). These sequences are widely conserved among organisms and are important tools for evolutionary studies (BARBORA *et al.*, 2017).

In eukaryotic genomes, rRNA genes can be organized into the genome in separate clusters, or linked to the same chromosome, and in some cases co-located to distinct sequences (CABRAL-DE-MELO *et al.*, 2011). The 5S rDNA comprises a coding region contained of 120 bp and a non-transcribed spacer (NTS) variable in length and sequences between different species. The U2 snDNA gene comprises a coding region of 188 bp and a spacer between species. Histone genes constitute a complex family, including a variable number of copies, some of which are grouped into one or more chromosomal regions, including genes that were the histone octamer (H2A, H2B, H3 and H4) and depending on the species, the histone of the linker (H1), while others are solitarily scattered over the genome as pseudogenes (CABRERO *et al.*, 2009).

Data report the conserved character of the DNAr 5S gene, usually found in interstitial regions in one or a few chromosome pairs, common for different groups, pointing to an organizational pattern that does not seem to be accidental (LUCCHINI *et al.*, 1993; MAKINEM *et al.*, 1997; MARTINS & WASKO, 2004; HASHIMOTO *et al.*, 2011). Histone genes were described in multiple chromosomal pairs for several groups, including invertebrates (CIOFF & BERTOLLO, 2012; PALACIOS-GIMENEZ *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2017). Data on U2 snDNA are scarce in the literature, and demonstrate a conservatism of the sequence with generally marking on a chromosomal pair (ARAYA-JAIME *et al.*, 2017).

Transposable elements (TEs) are DNA sequences capable of increasing their number of copies and moving from one genomic site to another, according to their

transposition molecule: RNA intermediary (Retrotransposons) or DNA (Transposons) (KIDWELL, 2002; WICKER *et al.*, 2007). The introduction of a TE into a new genome generally results in a sudden increase in the number of copies, proliferation, accumulation of mutations, and diversification within the genome and / or persistence in the genome until the cycle resumes. This activity may be responsible for increasing genetic variability for the evolution of the species, providing new structural conformations in the genome, or being inserted into genes or essential regulatory regions (CARARETO *et al.*, 2015).

Studies have reported the use of TEs in post-transcription regulation and translation, in the origin of new genes and non-coding RNAs (LONG *et al.*, 2003; MARINO-RAMIREZ *et al.*, 2005; FESCHOTTE, 2008; HERPIN *et al.*, 2010; KAPUSTA *et al.*, 2013; SCHEMBERGER *et al.*, 2016). In spite of the high mutagenic potential, in the genome these elements develop epigenetic mechanisms that control their activity by repression or inactivation (SLOTKIN & MARTIENSSEN, 2007; de BOER *et al.*, 2007; SCHEMBERGER *et al.*, 2016).

In the present study, we physically map 5S rDNA, U2 snDNA, Histone H1 and H3, transposon *Tc1-Mariner* and *Rex1* and *Rex3* retrotransposons into karyotypes of the species *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* by Fluorescent *in situ* Hybridization. These data are totally new for Testudines and are valuable information for the karyoevolutionary study of order.

## **Material and Methods**

### *Species analyzed, chromosome preparation and DNA extraction*

Two species of the genus *Podocnemis* were used for the analysis of the repetitive sequences, originating from the Museu Paraense Emílio Goeldi and Bosque Rodrigues Alves: *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis*. Chromosomal preparations were obtained from the temporary culture of lymphocytes, according to Moorhead *et al.*, (1960), with adaptations. Genomic DNA was extracted from the muscle tissues of the *P. expansa* and *P. unifilis* species using the proteinase K and phenol-chloroform method described by Sambrook *et al.*, (1989) with adaptations. This study was carried out in strict accordance with the recommendations of the ethical editorial justification for the use and treatment of chelonians in the research. The protocol was approved by the

Research Ethics Committee with Experimental Animals (License Number: CEPAE 68-2015).

#### *Production of the probes*

The amplification of the elements rDNA 5S, snDNA U2, Histones H1 and H3, transposon *Tc1-Mariner* and retrotransposons *Rex1* and *Rex3* was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers detailed in annex I. The DNA fragments obtained were purified using GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's recommendations, and sequenced. The probes were labeled with Nick-Translation: BioNick (Invitrogen) for labeling with biotin, and DIG-Nick (Roche), for labeling with digoxigenin.

#### *Fluorescence in situ hybridization (FISH)*

The FISH procedure followed the protocol described by Pinkel *et al.*, (1986), with some adaptations. Signal detection was performed using fluorochrome containing solution: 0.2 µl of avidin CY3 to 100 µl of 4xTween, for biotiny labeling, or 0.4 µL of anti-digoxigenin FITC to 100 µL of 4xTween, for digoxigenin labeling. The chromosomes were counterstained with 7µL of DAPI with Antifade Vectashield H-1000 (Vector), visualized by epifluorescence microscopy, with appropriate filters for each fluorochrome, and captured using the Nis-Elements software on the Nikon H550S microscope.

## **Results**

#### *Karyotype of species*

*P. expansa* and *P. unifilis* presented the same diploid number ( $2n = 28$ ), with small differentiations in the karyotype formula: in *P. expansa* (NF=54), it consists of 24 metacentric and submetacentric chromosomes, two subtelocentric chromosomes and two acrocentric chromosomes (**Figure 10**). In *P. unifilis* (NF=52), 22 metacentric and submetacentric chromosomes, two subtelocentric chromosomes and four acrocentric chromosomes (**Figure 11**).

#### *Amplification for 5S rDNA*

PCR for the DNAr 5S gene resulted in the amplification of multiple bands (in annex II), allowing the production of two probes: one using purified band corresponding

to approximately 120 base pairs (bp), which we refer to as the "120pb probe", and another containing all bands amplified by PCR, titled "total probe".

#### *FISH with multigenic family probes*

The results obtained by the FISHs, with different probes for 5S rDNA, allowed to observe different organization patterns for the gene. Signals corresponding to "120pb probe" were observed in clusters in interstitial region in a long submetacentric chromosomal pair (pair 1) and in a short metacentric pair (pair 11) for the two species analyzed, *P. expansa* (**Figure 12a**) and *P. unifilis* (**Figure 12b**). For the "total probe", clusters were visualized in the same chromosomal pairs previously flagged (pairs 1 and 11), however, with additional signals scattered throughout the genome for the two species, *P. expansa* (**Figure 12c**) and *P. unifilis* (**Figure 12d**).

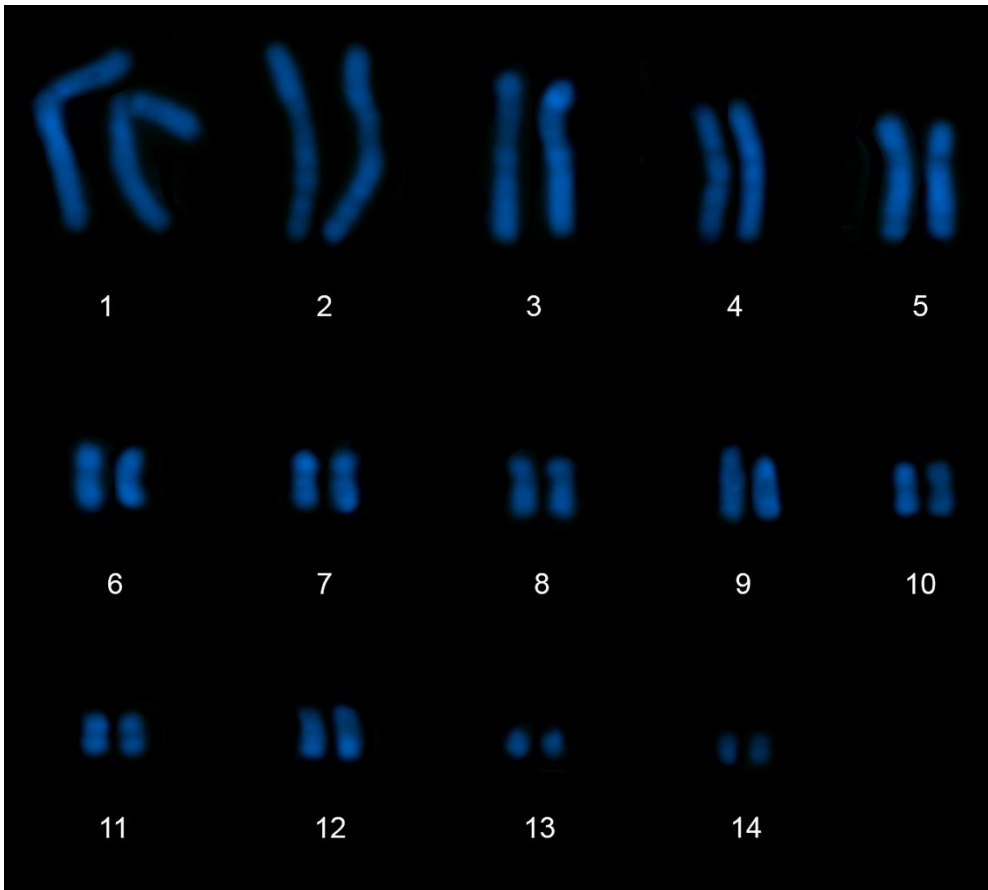
snDNA U2 markings showed similar signals in *P. expansa* (**Figure 13a**) and *P. unifilis* (**Figure 13b**), located in the pericentromeric region of a metacentric chromosomal pair (pair 6) for the two species analyzed.

Positive signals for histone H1 gene were detected in the interstitial region of the first chromosomal pair for the two species: *P. expansa* (**Figure 14a**) and *P. unifilis* (**Figure 14b**). For histone H3 gene, the hybridizations were observed distributed in clusters, located in centromeric and pericentromeric regions in six chromosome pairs for *P. unifilis* (**Figure 14d**); besides these markings, additional signals in chromosomal pair 13 were found in *P. expansa* (**Figure 14c**).

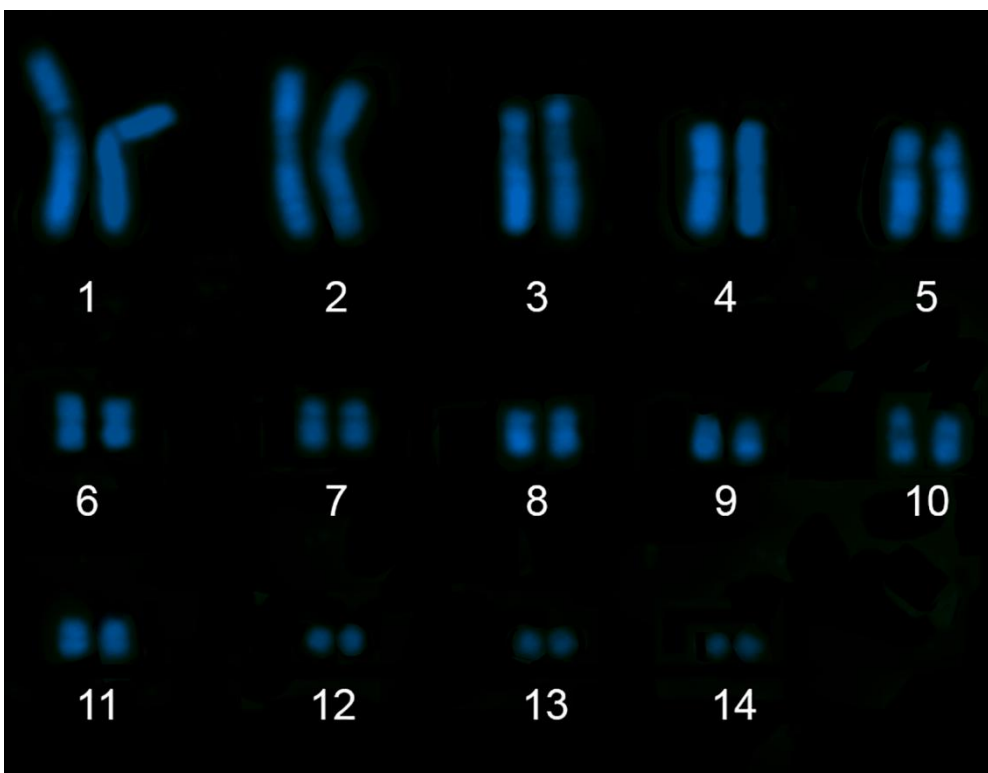
#### *FISH with Transposable Element probes*

Transposon *Tc1-Mariner* showed a dispersed distribution across all chromosomes in *P. expansa* (**Figure 15a**) and *P. unifilis* (**Figure 15b**). Parallel accumulations of this were observed in heterochromatic regions of some chromosome pairs, similar in the two species analyzed, most evidently in *P. expansa*.

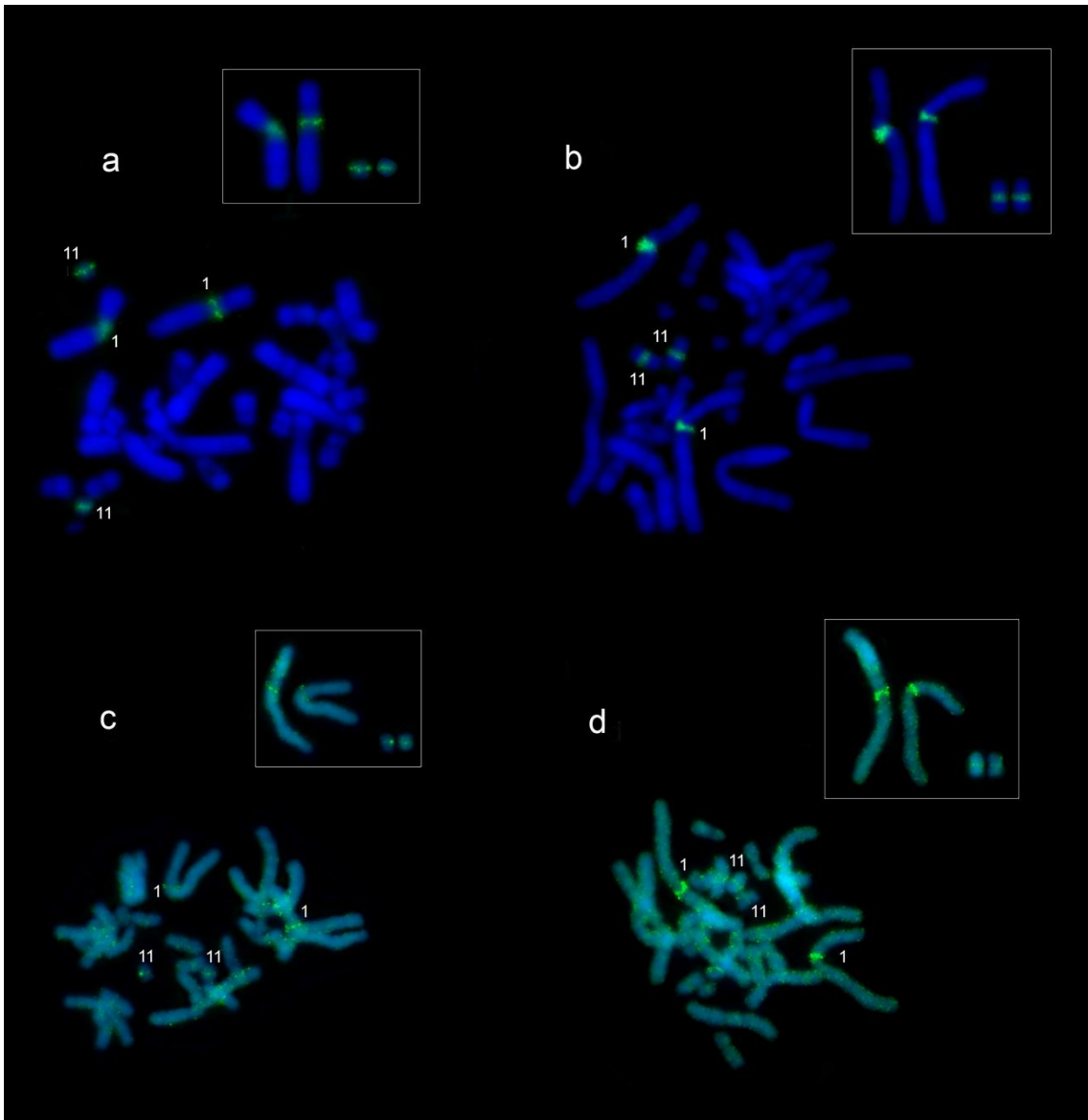
Similarly to *Tc1-Mariner*, *Rex1* and *Rex3* retrotransposons showed scattered signals along the genome of *P. expansa* (**Figure 16a, c**) and *P. unifilis* (**Figure 16b, d**), with some accumulations tending to colonize heterochromatic regions of some chromosome pairs, similar in the two species studied. *Rex3* showed a greater amount of signals compared to *Rex1* for both species.



**Fig. 10:** Karyotype of *P. expansa*

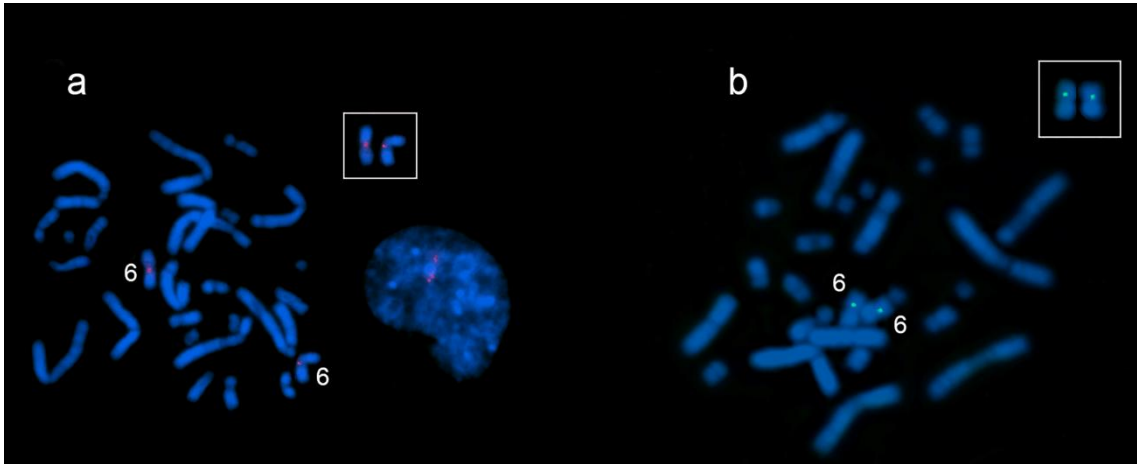


**Fig. 11:** Karyotype of *P. unifilis*.

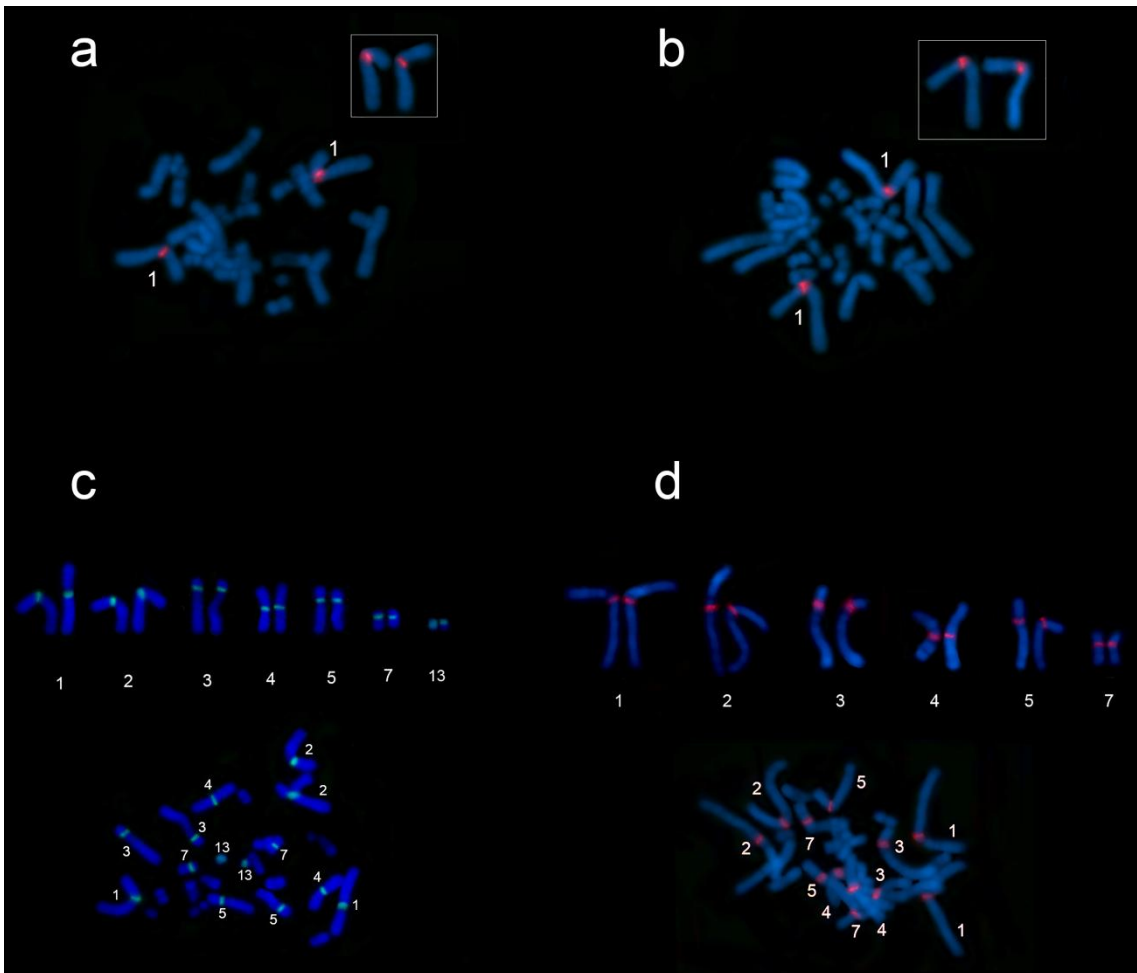


**Fig. 12:** Physical mapping of 5S rDNA in *P. expansa* and *P. unifilis* genomes using different probes: with purified probe of approximately 120bp in a) *P. expansa*, b) *P. unifilis*; With probe produced including all bands amplified in: c) *P. expansa*, d) *P. unifilis*.



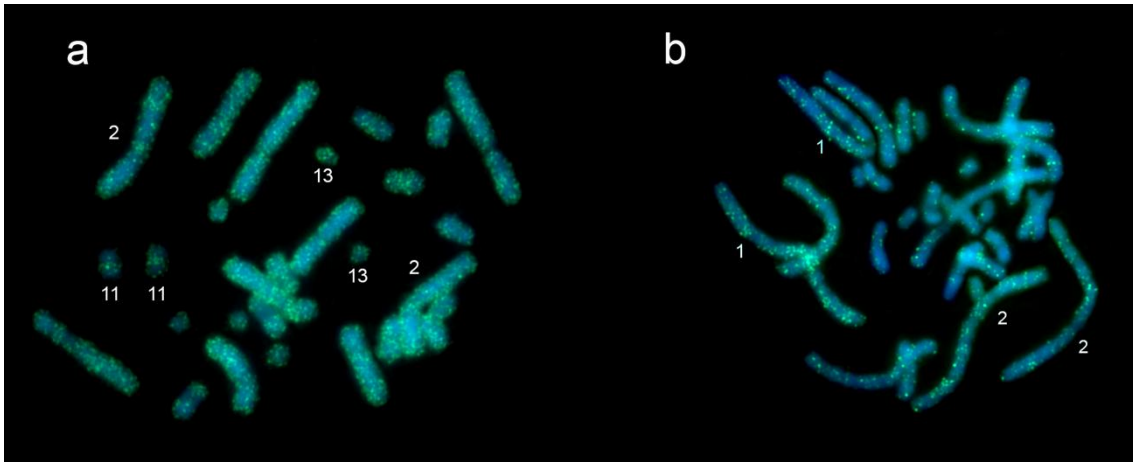


**Fig. 13:** Physical mapping of snDNA U2 located in the pericentromeric region of par 6 in the genome of the two species analyzed: a) in *P. expansa* (red); b) in *P. unifilis* (green).

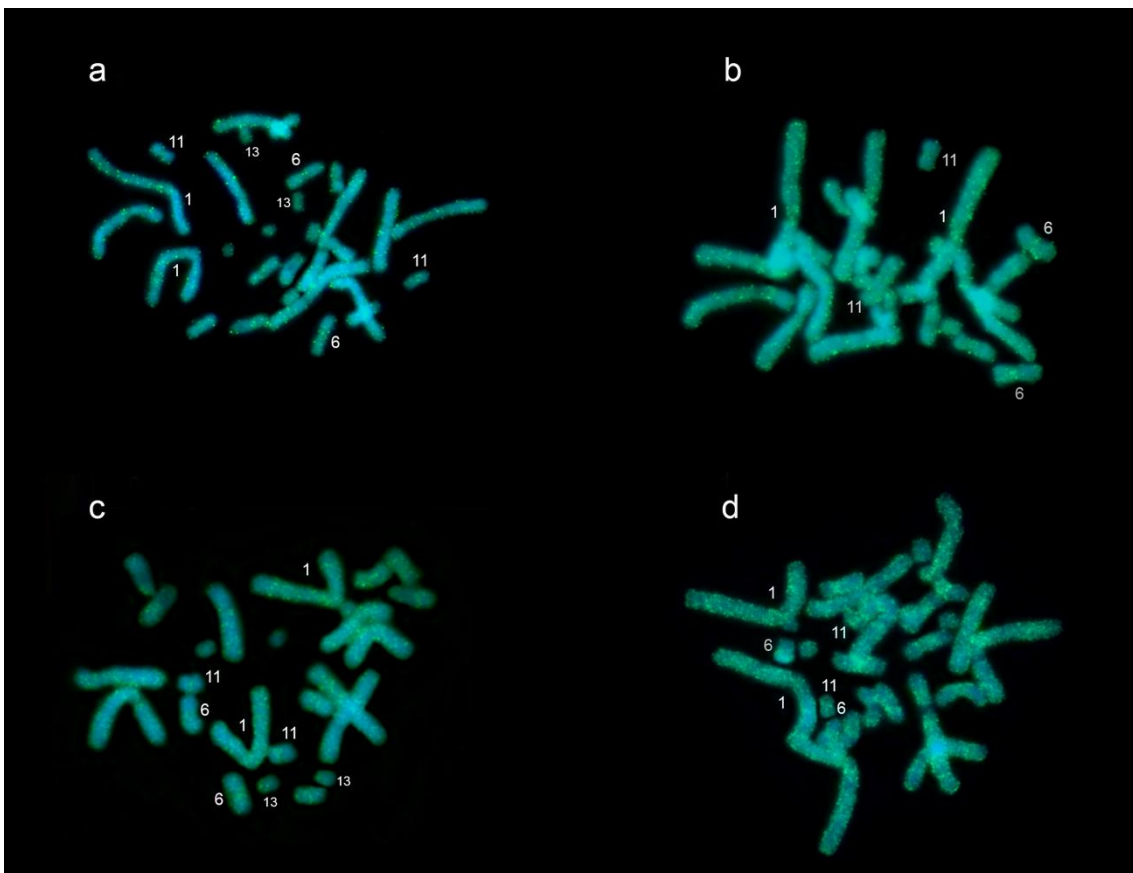


**Fig.14:** Physical mapping of histone H1 and H3 genes in the *P. expansa* and *P. unifilis* genomes. H1 gene tags located in the interstitial region of the first submetacentric long pair in: a) *P. expansa* (red); b) *P. unifilis* (red). H3 gene markers located in centromeric

and pericentromeric regions in seven chromosome pairs in c) *P. expansa* (green) and in six chromosome pairs in d) *P. unifilis* (red).



**Fig.15:** Physical mapping of the *Tc1-Mariner* transposable element showing scattered signals along the genome, with some organizations in heterochromatic regions in: a) *P. expansa* and b) *P. unifilis*.



**Fig. 16:** Physical mapping of *Rex1* and *Rex3* retroelements showing scattered markers

along the genome, with some accumulations in heterochromatic regions: a) *Rex1* in *P. expansa*; b) *Rex1* in *P. unifilis*; c) *Rex3* in *P. expansa*; d) *Rex3* in *P. unifilis*.

## Discussion

The analysis of the karyotype of *P. expansa* and *P. unifilis* shows a conservatism among these species, showing a diploid number equal to 28, corroborating data obtained for the genera *Erymnochelys* and *Podocnemis* (AYRES et al., 1969; HUANG & FRED CLARK, 1969; RHODIN et al., 1978; BULL & LEGLER, 1980; ORTIZ et al., 2005; FANTIN & MONJELÓ, 2011; GUNSKI et al., 2013; NORONHA et al., 2016). However, *P. expansa* and *P. unifilis* differ in the karyotype formula, with *P. unifilis* having a heteromorphic pair (par 10). Noronha et al., (2016) suggest that the observed variations between these species may have arisen through chromosomal rearrangements (inversions and doubling of pericentric heterochromatin), and may be the basis for their interspecific and intraspecific differences. Chromosome rearrangements are commonly associated with breaks in highly repetitive DNA sites that affect chromosomal plasticity (KIDWELL & LISCH, 1997; BADAIEVA et al., 2007; BRUSCHI et al., 2014; ZIEMNICZAK et al., 2014; SCHEMBERGER et al., 2016; SCHUBERT & VU, 2016; BARROS et al., 2017).

Signals obtained for rDNA 5S using "120pb probe", probably, comprise the coding region of the DNAr 5S gene, with interstitial signals on a submetacentric long chromosome (par 1) and a small metacentric pair (par 11), equivalent for *P. expansa* and *P. unifilis*. Similar patterns were found in previous fish studies, by Ferreira et al., (2007) in *Hoplias malabaricus*, and by Perazzo et al., (2011) in *Crenicichla lepidota*, describing the same pattern of gene organization for distinct groups. The distribution of 5S rDNA clusters appears to be fairly conserved among the species described herein; the localization of the DNAr 5S genes in an interstitial position appears to be a common feature for several groups, such as fishes (HASHIMOTO et al., 2011), mammals (MAKINEM et al., 1997) and amphibians (LUCCHINI et al., 2006) (1993), pointing out an organizational pattern that does not seem to be accidental, as postulated by Martins and Wasko (2004).

Nonetheless, markings observed for FISHs with probe produced from more than one band may represent another repeating DNA containing 5S rDNA sequences,

which are complementary to the primers used, or some repetitive sequence that originated from the 5S, allowing visualization, in addition to clusters in pairs 1 and 11, signals scattered along the genome of *P. expansa* and *P. unifilis*. Multigenic families represent a common structural element in eukaryotic genomes and are defined as a set of genes derived by the duplication of an ancestral gene, exhibiting more than 50% similarity (MARTINS & WASKO, 2004). Particularly, rDNA 5S is characterized by an evolution of all units uniformly, leading to a high degree of identity between copies (NEI & ROONEY, 2005). Due to the high similarity between these genes, the scattered marker sites observed for "total probe" 5S rDNA may signal, in addition to the coding region of the DNAr 5S gene, regions with similarity, variants of rDNA copies and / or pseudogenes. Martins *et al.*, (2006) described in the *Hoplias malabaricus* fish a class of repetitive DNAs called 5S*Hind*III-DNA, which shares similarities with "true" 5S rDNA repeats. The 5S*Hind*III-DNA variant demonstrated characteristics such as high abundance of copy number, tandem matrix and pericentromeric locations.

Another particular feature observed is the close loci location of 5S rDNA and H1 and H3 genes, with H1 and H3 markings in par 1 in *P. expansa* and *P. unifilis*. Similar pattern was reported in fish by Hashimoto *et al.*, (2011), suggesting that such a similar distribution between histones and 5S may reflect a common antecedence for the chromosomes of the investigated species, since at least three different markers demonstrated in this research (rDNA 5S, H1 and H3) may indicate a similar genetic constitution, deriving from the same chromosomes in an ancestral species, proposing that the maintenance of these genetic associations can offer some selective advantage. Noronha *et al.* (2016) reported similar markers on the same chromosomal pair (pair 1) in *P. expansa* and *P. unifilis*, using 18S rDNA probes. The chromosomal mapping of 5S rDNA and histone genes H1 and H3 had never previously been reported for the order Testudines. However, from the data presented, it is possible to infer that characteristics of multigenic families seem to be conserved for the genus *Podocnemis*.

The distribution pattern in clusters dispersed in multiple chromosomal pairs for the H3 gene described for *P. expansa* and *P. unifilis* corroborate those reported in fish by Costa *et al.*, (2014) in *Rachycentron canadum* and Cioff and Bertollo (2012) in *Hyphessobrycon vinaceus* and *Erythrinus erythrinus*, and in some invertebrates, by Almeida *et al.*, (2017) in the scorpion *Tityus obscurus*, and by Palacios-Gimenez *et al.* (2013) in the grasshopper *Dichromatos lilloanus*. Chromosome studies of reptiles have

revealed that turtles tend to accumulate and preserve repetitive DNAs (NORONHA *et al.*, 2016). The structural differences in histone H3 repeat units suggest that they may have evolved by the evolutionary amplification of a single grouping of ancestral histone gene, which after several rearrangements may have triggered sequence changes, leading to the structural diversity of clusters of histone genes found in the most different organisms (MAXSON *et al.*, 1983; SCHIENMAN *et al.*, 1998; CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2010).

Another hypothesis proposed for the dispersion of H3 gene clusters in *P. expansa* and *P. unifilis* refers to the ability to move multigenes along the genome, creating new spots, or establishing associations with TEs (MARTINS *et al.*, 2006); the heterochromatic region is represented mainly by a variety of repetitive sequences, predominantly organized as agglomerates of transposing elements (CHARLESWORTH *et al.*, 1994; DIMITRI *et al.*, 1999; GREWAL & JIA, 2007).

The presence of markings on an extra chromosomal pair (pair 13) in *P. expansa* may signal the dispersion of the H3 gene associated with transposition events, since pair 13 in these species seems to represent loci of associations with TEs. The chromosomal arrangements described in the present study for *Tc1-Mariner* transposon and *Rex1* and *Rex3* retrotransposons, demonstrate a tendency of accumulation of these sequences in heterochromatic region in the chromosomes, including pairs 1 and 13, for *P. expansa* and *P. unifilis*, apparently co-localizing to the DNAr 5S, H1 and H3 genes in these species. This pattern associates the repetitive nature of multigenic families, making it an ideal niche for transposition elements, allowing the expression of these elements through recombination events (ZHANG *et al.*, 2008; EAGLE & CREASE, 2012). In addition, the broad spectrum of mutations produced by TEs activity allows dispersion of these genes throughout the genome of the species. The accumulation of TEs near heterochromatic regions, similar to the chromosomal marking pattern obtained for 5S, H1 and H3 DNAr, presented here, strongly suggests an association of these transposing elements with multigene clusters, and their involvement in the dispersion of the copies thereof.

Chromosomal mapping of U2 snDNA is reported for the first time for Testudines order, and demonstrated sequence conservatism for the *P. expansa* and *P. unifilis* species, with pericentromeric markings on a metacentric chromosomal pair (pair

6) similar for both species. These data corroborate those obtained by Araya-Jaime *et al.*, (2017), for single chromosomal pairings in the genome of fish of the genus *Orestias*. The results obtained for *P. expansa* and *P. unifilis* suggest that the genomic organization of U2 snDNA is relatively simple in these species, presenting low levels of genomic sharing.

The marking pattern described for the transposon *Tc1-mariner*, predominantly dispersed throughout the genome of the *P. expansa* and *P. unifilis* species, is characteristic of this class of highly mobile elements (BISCOTTI *et al.*, 2015). However, the observed accumulations of these repeats in heterochromatic regions of some chromosomal pairs probably co-localize with rDNA and histone genes, as discussed earlier, enabling the displacement of more conserved sequences to other sites in the *Podocnemis* genome through events of transposition.

The largest group of class II eukaryotic transposons is composed of members related to *mariner* and *Tc1* families (BENJAMIN *et al.*, 2007). These sequences are generally considered to be inactivated in the genome (MUÑOZ-LÓPEZ & GARCÍA-PÉREZ, 2010; IZSVFIK *et al.*, 1995); however, studies have shown that there is transcriptional activity in the genes of these degenerate sequences, which may indicate the synthesis of truncated proteins without utility in genomes or even synthesis of new DNA binding proteins, which are involved in controlling the cycle of cell recombination and other functions related to chromatin modification (FESCHOTTE & PRITHAM, 2007; FESCHOTTE, 2008; SCHEMBERGER *et al.*, 2016).

Analogous to *Tc1-mariner*, *Rex1* and *Rex3* retrotransposons showed a pattern of dispersion along the genome similarly to *P. expansa* and *P. unifilis*, tending to colonize heterochromatic regions. This similarity suggests that these sequences may be evolving together or through the same mechanism (FERREIRA *et al.*, 2011). The scattered signals are explained by the broad spectrum of activity of transposition of these elements; nevertheless, the accumulations observed may indicate associations of these sequences with other TEs. Retroelements increase their copy number by retrotransposition and can be a substrate for homologous recombination, forming several categories of DNA rearrangements, including deletions, inversions, translocations, duplications and amplifications, and can integrate into new genomic sites

and mobilize sequences non-autonomous, displacing genes, regulatory regions and other genomic structures (OZOUF-COSTAZ *et al.*, 2004).

The characterization and localization of the repetitive DNAs allow new perspectives for a better understanding of the composition, organization, diversification and genomic evolution in chelonians due to their abundance and diversity. They also serve as important markers for the identification of evolutionary events, facilitating the detection of chromosomal rearrangements. In the present study, we infer the association of 5S rDNA and H1 and H3 histones with different classes of TEs, acting on the dispersion of multigenes from transposition events, in *P. expansa* and *P. unifilis*. We also describe the genomic organization of U2 snDNA conserved among the analyzed species. The data presented in this article are unpublished for Testudines and constitute valuable information for the karyoevolutionary study of order.

### **Acknowledgements**

This study is part of Master dissertation of M.G.C. who was a recipient of a CAPES Scholarship in Ecologia Aquática e Pesca (PPGEAP), UFPA. This research was supported: project coordinated by J.C.P. CNPq (Universal–Proc. 475013/2012-3) on a Project coordinated by C.Y.N (Pró-amazônia – 47/2012). The authors thank Cesar Martins (UNESP-Botucatu) and Marcelo Vicari (UEPG) for primers for cytogenetic probes, and ICMBio (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente) for the collection permit (ICMBio Registration: 42642).

## Referências

- ALMEIDA, B.R.R. , PAIXAO, S. S. R. M. , NORONHA, R. C. R. , NAGAMACHI, C. Y. , COSTA, M.R.J. , PARDAL, P. P. O. , COELHO, J. S. , PIECZARKA, J. C (2017). Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). BMC GENETICS, v. 18, p.
- ARAYA-JAIME C, LAM N, PINTO I.V, MÉNDEZ M.A, ITURRA P (2017) Chromosomal organization of four classes of repetitive DNA sequences in killifish *Orestias ascotanensis* Parenti, 1984 (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae) *CompCytogen* 11(3): 463–475. doi: 10.3897/CompCytogen.v11i3.11729
- BADAEVA, E.D, DEDKOVA, O.S, GAY, G, PUKHALSKYI, V.A, ZELENIN, A.V, BERNARD, S, BERNARD, M (2007) Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome* 50, 907–926.
- BARBOSA P, LEAL E.V, SILVA M, ALMEIDA M.C, MOREIRA-FILHO O, ARTONI R.F (2017) Variability and evolutionary implications of repetitive DNA dynamics in genome of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) comparative cytogenetics 11(1):143-162.
- BARROS A.V, WOLSKI M.A.V, NOGAROTO V, ALMEIDA M.C, MOREIRA-FILHO O, VICARI MR (2017) Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? *Gene* 608, 20–27
- BARROS R.M, SAMPAIO M.M, ASSIS M.F, AYRES M (1976) General considerations on the karyotypic evolution of *Chelonia* from the Amazon region of Brazil. *Cytologia*. 1976;41:559–565.
- BENJAMIN, B., YVES, B., CORINNE, A.G (2007) Assembly of the Tc1 and mariner transposition initiation complexes depends on the origins of their transposase DNA binding domains. *Genetica* 130 (2), 105–120.
- BICKHAM J.W, ROGERS D.S (1985) Structure and variation of the nucleolus organizer region in turtles. *Genetica*;67:171–184. doi: 10.1007/BF02424488.
- BIET E, SUN J, DUTREIX M (1999) Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*. v27, p596-600.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON JS (Pat). (2015). Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Res*. Doi: 10.1007/s10577-015-9499-z
- BOURQUE G, LEONG B, VEGA V.B, CHEN X, LEE Y.L, SRINIVASAN K.G, CHEW J.L, RUAN Y, WEI C.L, NG H.H, LIU E.T (2008) Evolution of the mammalian transcription factor binding repertoire via transposable elements. *Genome Res*. 18(11):1752-62. doi: 10.1101/gr.080663.108.
- BRUSCHI D.P, RIVERA, M, LIMA, A.P., ZÚÑIGA, A.B., RECCO-PIMENTEL, S.M (2014) Interstitial Telomeric Sequences (ITS) and major rDNA mapping reveal insights



into the karyotypical evolution of Neotropical leaf frogs species (Phyllomedusa, Hylidae, Anura). *Mol. Cytogenet.* 7, e22.

BULL J.J, LEGLER J.M (1980) Karyotypes of side necked turtles (Testudines, Pleurodira). *Can J Zool* 58:828-884. doi: 10.1139/z80-115.

CABRAL-DE-MELLO, D. C., MARTINS, C., SOUZA, M. J. AND MOURA, R. C. (2010). Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in four ancient Proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. *Cytogenet. Genome Res.*, in press.

CABRAL-DE-MELLO, DC, MOURA, RC, MARTINS, C (2010) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity*, 104, 393-400.

CABRAL-DE-MELLO D.C, CABRERO J, LÓPEZ-LEÓN M.D, CAMACHO J.P.M (2011) Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location *Genetica*, 139:921

CABRERO J, LÓPEZ-LEÓN MD, TERUEL M, CAMACHO JPM (2009) Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome Res* 17:397–404.

CARARETO CMA, MONTEIRO-VITORELLO CB, VAN SLUYS MA (2015) Elementos de Transposição: Diversidade, evolução, aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos. Sociedade Brasileira de Genética. Editora Fiocruz. 196p. CDD- 22ed-611.018166.

CHARLESWORTH B, SNLEGOWSKI P, STEPHAN W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371:215–220.

CIOFFI MB, BERTOLLO LAC (2012) Chromosomal Distribution and Evolution of Repetitive DNAs in Fish. Garrido-Ramos MA (ed): *Repetitive DNA. Genome Dyn.* Basel, Karger, vol 7, pp 197–221

COLGAN DJ, MCLAUCHLAN A, WILSON GDF, LIVINGSTON SP, EDGECOMBE GD, MACARANAS J, CASSIS G, GRAY MR (1998) Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Austral J Zool* 46: 419–437.

COSTA GWWF, CIOFFI MB, BERTOLLO LAC, MOLINA BWE (2014) Unusual dispersion of histone repeats on the whole chromosomal complement and their colocalization with ribosomal genes in *Rachycentron canadum* (Rachycentridae, Perciformes). *Cytogenet Genome Res* 144 (1): 62-67.

de BOER JG, YAZAWA R, DAVIDSON WS, KOOP BF (2007) Bursts and horizontal evolution of DNA transposon in the speciation of pseudotetraploid salmonids. *BMC Genomics*, 8(1), 422.

DIMITRI P, JUNAKOVIC N (1999) Revising the selfish DNA hypothesis: New evidence on accumulation of trans-posable elements in heterochromatin. *Trends Genet*;15:123–124.

EAGLE, CREASE TJ (2012) Copy number variation of ribosomal DNA and Pokey transposons in natural populations of *Daphnia* Shannon HC *Mobile DNA* 2012, 3:4

FANTIN C, MONJELÓ LAS (2011) Cytogenetic studies in *Podocnemis expansa* and *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemididae), turtles of the Brazilian Amazon. *Caryologia*2:154-157.

FERREIRA DC, OLIVEIRA C, FORESTI F (2011) Chromosome Mapping of Retrotransposable Elements Rex1 and Rex3 in Three Fish Species in the Subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet Genome Res* 132:64–70

FERREIRA I.A, BERTOLLO L.A.C, MARTINS, C (2007) Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S*Hind*III repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. *Cytogenet Genome Res* 118:78–83. DOI: 10.1159/000106445

FESCHOTTE C, PRITHAM EJ (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet.* 41:331–368.

FESCHOTTE, C., 2008. The contribution of transposable elements to the evolution of regulatory networks. *Nat. Rev. Genet.* 9 (5), 397–405.

GREWAL SI, JIA S (2007) Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*;8:35–46.

GUNSKI RJ, CUNHA IS, DEGRANDI TM, LEDESMA M, GARNERO AV (2013) Cytogenetic comparison of *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis*: A case of inversion and duplication involving constitutive heterochromatin. *Genet Mol Biol* 36:353-356.

GURSEL I, GURSEL M, YAMADA H, ISHII KJ, TAKESHITA F AND KLINMAN DM (2003) Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *J Immunol* 171:1393-1400.

HASHIMOTO DT, FERGUSON-SMITH MA, RENS W, FORESTI F AND PORTO-FORESTI F (2011) Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA genes clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogen Genome Res* 134:64-71.

HERPIN A, BRAASCH I, KRAEUSSLING M, SCHMIDT C, THOMA EC, NAKAMURA S, TANAKA M, SCHAT M (2010) Transcriptional rewiring of the sex determining *dmrt1* gene duplicate by transposable elements. *PLoS Genet.* 6, 2.

HUANG CC, FRED CLARK H (1969) Chromosome studies of the cultured cells of two species of Side-Necked Turtles (*Podocnemis unifilis* and *Podocnemis expansa*). *Chromosoma* 26:245-253.

IZSVFIK Z, IVICS Z, HACKETT PB (1995) Characterization of a Tc1-like transposable element in zebrafish (*Danio rerio*). *Mol. Gen. Genet.* 247, 312–322.

- KAPUSTA A, KRONENBERG Z, LYNCH VJ, ZHUO X, RAMSAY L, BOURQUE G, YANDELL M, FESCHOTTE C (2013) Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs. *PLoS Genet.* 9:e1003470.
- KAVALCO KF, PAZZA R, BRANDÃO KO, DE ALMEIDA-TOLEDO LF (2013) Biogeographic patterns in the chromosomal distribution of a satellite DNA in the banded tetra *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes). *Organisms Diversity & Evolution* 13: 67–76. <https://doi.org/10.1007/s13127-012-0100-8>
- KIDWELL, M.G., LISCH, D., (1997). Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 7704–7711.
- KIDWELL MG (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115: 49-63.
- LAW C, CHEUNG P (2012) Histone Variants and Transcription Regulation. *Subcell Biochem*, 61: 319-341.
- LI YC, KORD AB, FAHIMA T, BERLES A, NERO E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. v11, p2453-2465.
- LIU Z, LI P, KOCABAS A, KARSI A, JU Z (2001) Microsatellite-containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. v289, p317-324.
- LONG M, BETRÁN E, THORNTON K, WANG W (2003) The origin of new genes: glimpses from the young and old. *Nat. Rev. Genet.* 4 (11), 865–875.
- LUCCHINI S, NARDI I, BARSACCHI G, BATISTONI R, ANDRONICO F (1993) Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. *Genome* 36:762–773.
- MÄKINEM A, ZIJLSTRA C, DE HAAN NA, MELLINK CHM, BOSMA AA (1997) Localization of 18S plus 28S and 5S ribosomal RNA genes in the dog by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 78:231–235.
- MARINO-RAMIREZ L, LEWIS KC, LANDSMAN D, JORDAN I.K (2005) Transposable elements donate lineage-specific regulatory sequences to host genomes. *Cytogenet. Genome. Res.* 110, 333–334.
- MARTINS C, WASKO AP (2004) Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome; in Williams CR (ed): *Focus on Genome Research*. Hauppauge, Nova Science Publishers, 2004, pp 289– 318.
- MARTINS C, FERREIRA IA, OLIVEIRA C, FORESTI F, GALETTI PM JR (2006) A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica*;127:133–141.

MARTINS C, CABRAL-DE-MELLO DC, VALENTE GT, MAZZUCHELLI J, OLIVEIRA SG, PINHAL D (2011) Animal genomes under the focus of cytogenetics. New Hampshire: Nova Science Publisher.

MAXSON R, COHN R, KEDES L. (1983). Expression and organization of histone genes. *Ann Rev Genet*, 17, 239-277

MOORHEAD PS, NOWELL PC, MELLAM WJ, BATTIPS DM, HUNGERFORD DA (1960) Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Expi Cell Res* 20:613-616.

MUÑOZ-LÓPEZ M, GARCÍA-PÉREZ J.L (2010) DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr. Genomics* 11 (2), 115–128.

NEI M, ROONEY AP (2005): Concerted evolution and birth-and-death evolution of multigene families. *Ann Rev Genet* 39:121–152.

NORONHA RCR, BARROS LMR, ARAÚJO REF, MARQUES DF, NAGAMACHI CY, MARTINS C, PIECZARKA JC (2016) New insights of karyoevolution in the Amazonian turtles *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemidae). *Molecular Cytogenetics*. 9:73 DOI 10.1186/s13039-016-0281-5

ORTIZ ML, RODRÍGUEZ PA, BUENO ML (2005) Caracterización citogenética de la tortuga sabanera *Podocnemis vogli* (Reptilia, Testudinata, Podocnemididae). *Acta Biol Colomb* 1:19-33.

OZOUF-COSTAZ C., BRANDT J., KÖRTING C., PISAVO E., BONILLO C., COUTANCEAU J-P., VOLFF J-N. (2004) Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. *Antarctic Science* 16, 51–57.

PALACIOS-GIMENEZ OM, CASTILLO ER, MARTÍ DA, CABRAL-DE-MELLO DC (2013) Tracking the evolution of sex chromosome system in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. *BMC Evolutionary Biology* 13 (167): 1-12.

PERAZZO G, NOLETO R.B, VICARI MR, MACHADO P.C, GAVA A, CESTARI M.M (2011) Chromosomal studies in *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes) from extreme Southern Brazil. *Rev Fish Biol Fisheries* 21:509–515. DOI 10.1007/s11160-010-9170-x

RHODIN AGJ, MITTERMEIER RA, GARDNER AL, MEDEM F (1978) Karyotypic analysis of the *Podocnemis* turtles. *Copeia* 4:723-728.

SCHEMBERGER M.O., NOGAROTO V, ALMEIDA M.C., ARTONI R.F., VALENTE G.T., MARTINS C., VICARI M.R (2016) Sequence analyses and chromosomal distribution of the *Tc1/Mariner* element in Parodontidae fish (Teleostei: Characiformes). *Gene* 593, 308–314.

SCHIENMAN JE, LOZOVSKAYA ER, STRAUSBAUGH LD (1998) *Drosophila virilis* has atypical kinds and arrangements of histone repeats. *Chromosoma* 107:529–539.

SCHUBERT I, VU G.T (2016). Genome stability and evolution: attempting a holistic view. *Trends Plant Sci.* 21, 749–757.

SLOTKIN, R.K., MARTIENSSEN, R (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature* 8, 272–285

VENTURA K, MOREIRA CN, MORETTI R, YONENAG-YASSUDA Y, RODRIGUES MT (2014) The lowest diploid number in Testudines: Banding patterns, telomeric and 45S rDNA FISH in *Peltecephalus dumerilianus*,  $2n = 26$  and  $FN = 52$  (Pleurodira, Podocnemididae). *Genet. Mol. Biol.* vol.37 no.1 Ribeirão Preto. ISSN 1415-4757

VICARI MR, NOGAROTO V, NOLETO RB, CESTARI MM, CIOFFI MB, ALMEIDA MC, MOREIRA-FILHO O AND ARTONI RF (2010) Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *J Fish Biol* 76:1094-1116.

WANG T, ZENG J, LOWE CB, SELLERS RG, SALAMA SR, YANG M, BURGESS SM, BRACHMANN RK, HAUSSLER D (2007) Species-specific endogenous retroviruses shape the transcriptional network of the human tumor suppressor protein p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(47):18613-8.

WICKER T, SABOT F, HUA-VAN A, BENNETZEN JL, CAPY P, CHALHOUB B, FLAVELL A, LEROY P, MORGANTE M, PANAUD O, PAUX E, SANMIGUEL P, SCHULMAN AH (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet.* 8:973–982.

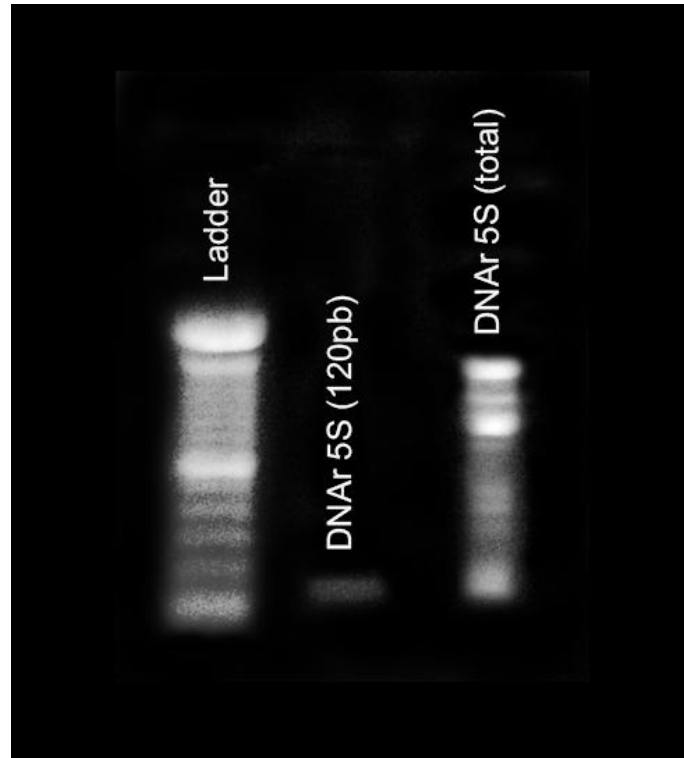
ZHANG X, EICKBUSH MT, EICKBUSH TH (2008) Role of recombination in the long-term retention of transposable elements in rRNA gene loci. *Genetics* 2008, 180:1617-1626.

ZIEMNICZAK K, TRALDI J.B, NOGAROTO V, ALMEIDA M.C, ARTONI R.F, MOREIRA-FILHO O, VICARI M.R (2014) In situ localization of (GATA) $n$  and (TTAGGG) $n$  repeated DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Cytogenet. Genome Res.* 144, 325–332.

**Attachment I** - Sequence of primers used for DNA probes production in the present work

<b>Repetitive DNA</b>	<b>Primers</b>	<b>References</b>
DNAr 5S	F 5'-GCCACACCACCCCTGAACAC-3' R 5'-GCCTACGACACCTGGTATTC-3'	Genbank (X58367.1, FJ572051.1, FJ572052.1, X58365.1)
snDNA U2	F5'-TCT CGG CCT (AT)(AT)T GGC TAA-3' R5'-G(AC)G GTA (GC)TG CAA TAC CGG-3'	Colgan <i>et al.</i> , (1998)
H1	Sca H1F 5'-GCN ATH AAR AAR TAY AT ScaH1R (5'GGY TTN GGN GCY TTN GG	Cabral-de-Mello <i>et al.</i> , (2010).
H3	ScaH3F 5'-GGC NMG NAC NAA RCA RAC ScaH3R 5'-TGD ATR TCY TTN GGC ATD AT	Cabral-de-Mello <i>et al.</i> , (2010).
<i>Tc1-Mariner</i>	Tc1 dr3-u 5' CAGGGGTGGACAATGAAACT3'	Designed from the sequence to the TIR of the element <i>Tc1-Mariner</i> Dr3 of the <i>Dario rerio</i>
<i>Rex1</i>	RTX1-F1 5'TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC RTX1-R3 5'TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC	Volff <i>et al.</i> , (2000)
<i>Rex3</i>	RTX3-F3 5'CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG RTX3-R3 5'TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT	Volff <i>et al.</i> ,(1999)

**Attachement II** - Agarose gel for PCR amplified bands for the production of 5S rDNA probe: a) Multiple band amplification (referring to "total probe"), b) Band purification with approximately 120pb (referring to "120pb probe").



## 6. CONCLUSÃO

A caracterização e localização dos DNAs repetitivos permitem novas perspectivas para uma melhor compreensão da composição, organização, diversificação e evolução genômica em quelônios, devido sua abundância e diversidade. Concluímos que, as associações de DNAr 5S e histonas com diferentes classes de *TEs*, atuam na dispersão de multigenes a partir de eventos de transposição, em *P. expansa* e *P. unifilis*. Descrevemos também a organização genômica do snRNA U2 conservada entre as espécies analisadas. Os dados produzidos nesta dissertação são inéditos para Testudines e constituem informações valiosas para o estudo carioevolutivo da ordem.



## Referências

- ALHO CJR, DANNI TMS, PÁDUA LFM (1985) Temperature-dependent sex determination in *Podocnemis expansa* (Testudinata: Pelomedusidae). *Biotropica*, 17: 75-78.
- AMBROS V (2001) microRNAs: Tiny Regulators with Great Potential. *Cell*, Vol. 107, 823–826.
- AUFFENBERG W (1974) Checklist of fossil land tortoises (Testudinidae). *Bulletin of the Florida State Museum, Biological Sciences* n.18, p.122-251.
- AYRES M, SAMPAIO MM, BARROS RMS, DIAS LB, CUNHA OR (1969) A karyological study of turtles from the Brazilian Amazon River. *Cytogenetics*8:401-409.
- BARLEY AJ, SPINKS PQ, THOMSON RC, SHAFFER HB (2010) Fourteen nuclear genes provide phylogenetic resolution for difficult nodes in the turtle tree of life. *Mol. Phylog. Evol.* 55, 1189–1194.
- BATES HW (1863) *The naturalist on the river Amazon*. John Murray, Londres. 63
- BICKHAM JW, CARR JL (1983) Taxonomy and Phylogeny of the higher categories of cryptodiran turtles based on a analysis of chromosomal data. *Copeia*. n. 4, p. 918-932.
- BIET E, SUN J, DUTREIX M (1999) Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*. v27, p596-600.
- BOHNE A, BRUNET F, GALIANA-ARNOUX D, SCHULTHEIS C, VOLFF JN (2008) Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Res.* 16:203–215.
- BOUR R (2008) Global diversity of turtles (Chelonii; Reptilia) is freshwater. *Hydrobiologia*, Heidelberg, v. 595, p. 593-598.
- BOURQUE G, LEONG B, VEGA VB, CHEN X, LEE YL, SRINIVASAN KG, CHEW JL, RUAN Y, WEI CL, NG HH, LIU ET (2008) Evolution of the mammalian transcription factor binding repertoire via transposable elements. *Genome Res.* 18(11):1752-62. doi: 10.1101/gr.080663.108.
- BRITTEN RJ (1997) Mobile elements inserted in the distant past have taken on important functions. *Gene* 205: 177-82.
- BULL JJ, LEGLER JM (1980) Karyotypes of side necked turtles (Testudines, Pleurodira). *Can J Zool* 58:828-884.
- BURNS KH, BOEKE JD (2012) Human transposon tectonics. *Cell* 149: 740–752.
- CABRAL-DE-MELO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS C. (2010). Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminates* provide the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity*. 104:393-400.

- CAPY P, BAZIN C, HIGUET D, LANGIN T (1998) Dynamics and evolution of transposable elements. Austin, Texas: Landes Bioscience. 197p.
- CHALOPIN D, NAVILLE M, PLARD F, GALIANA D, VOLFF JN (2015) Comparative Analysis of Transposable Elements Highlights Mobilome Diversity and Evolution in Vertebrates. *Genome Biol. Evol.* 7(2):567–580
- CHARLESWORTH B, SNLEGOWSHI P, STEPHAN W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220.
- CHIARI Y, CAHAIS V, GALTIER N, DELSUC F (2012) Phylogenomic analyses support the position of turtles as the sister group of birds and crocodiles (Archosauria). *BMC Biol* 10: 65. doi: 10.1186/1741-7007-10-65
- CHISTIYAKOV AD, HELLEMANS B, VOLCKAERT AMF (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. v255, p1-29.
- COLGAN DJ, MCLAUCHLAN A, WILSON GDF, LIVINGSTON SP, EDGECOMBE GD, MACARANAS J, CASSIS G, GRAY MR (1998) Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Austral J Zool* 46: 419–437
- CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA – CITES (1999) Identification Guide – Turtles and Tortoises: Guide to the Identification of Turtles and Tortoises Species Controlled under the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. CANADA, M. O. S. A. S. Ottawa, Ontario. 232pp.
- CRAWFORD NG, FAIRCLOTH BC, MCCORMACK JE, BRUMFIELD D, WINKER K, GLENN TC (2012) More than 1000 ultraconserved elements provide evidence that turtles are the sister group of archosaurs. *Biol. Lett.* 8, 783–786.
- DEININGER PL, MORAN JV, BATZER MA, KAZAZIAN HH JR (2003) Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr Opin Genet Dev.* 13: 651–658.
- EDDY SR (2001) Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nature Rev. Genet.* 2, 919-929.
- ELLISON CE, BACHTROG D (2013) Dosage compensation via transposable element mediated rewiring of a regulatory network. *Science* 342: 846–850.
- ERNST CH, BARBOUR RW (1989). *Turtles of the World*. Smithsonian Institution Press. 313p.
- FACHIN-TERÁN A, VOGT RC (2004) Estrutura populacional, tamanho e razão sexual de *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) no Rio Guaporé (RO), norte do Brasil. *Phyllomedusa*. 3(1): 29-42.
- FANTIN C, MONJELÓ LAS (2011) Cytogenetic studies in *Podocnemis expansa* and *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemididae), turtles of the Brazilian Amazon. *Caryologia*2:154-157.

FERREIRA JÚNIOR PD, CASTRO PTA (2003) Geological control of *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* nesting areas in Rio Javaés, Bananal Island, Brazil. *Acta Amazonica*, 33 (3): 445-468.

FERRI V (2002) *Turtles & Tortoises: A Firefly Guide*. Firefly Books. 256p.

FESCHOTTE C, PRITHAM EJ (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet*. 41:331–368.

FESCHOTTE C (2008) The contribution of transposable elements to the evolution of regulatory networks. *Nature Reviews Genetics* 9(5): 397-405 doi:10.1038/nrg2337.

FESCHOTTE C (2008) Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat Rev Genet*. 9:397–405.

FIELD DJ, GAUTHIER JA, KING BL, PISANI D, LYSON TR, PETERSON KJ (2014) Toward consilience in reptile phylogeny: miRNAs support an archosaur, not lepidosaur, affinity for turtles. *Evol.Dev.*. <http://dx.doi.org/10.1111/ede.12081>.

FONG JJ, BROWN JM, FUJITA MK, BOUSSAU B (2012) A phylogenomic approach to the vertebrate phylogeny supports a turtle-archosaur affinity and a possible paraphyletic Lissamphibia. *PLoS One* 7, e48990.

FUJITA MK, ENGSTROM TN, STARKEY DE, SHAFFER HB (2004) Turtle phylogeny: insights from a novel nuclear intron. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 1031–1040.

GAFFNEY ES (1980) Phylogenetic relationships of the major groups of amniotes. In: Panchen AL, editor. *The terrestrial environment and the origin of land vertebrates*. New York: Academic Press. 593–610.

GAFFNEY ES, MEYLAN PA (1988) A phylogeny of turtles. In the phylogeny and classification of the tetrapods. In: Benton, M.J. (Ed.), *Amphibians, Reptiles, Birds. Systematics Association Special Volume*, vol. 35. Clarendon Press, Oxford, pp. 157–219.

GAFFNEY ES, MEYLAN PA, WYSS A (1991) A computer assisted analysis of the relationships of the higher categories of turtles. *Cladistics* 7, 313–335.

GARCIA-NAVARRO CEK, PACHALY JR (1994) *Manual de Hematologia Veterinária*, 1. ed. São Paulo: Livraria Varela Ltda., p. 69-71, 123-132.

GOULART CES (2004) *Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis*. Ed. L.F. Livros de Veterinária LTDA, v.1, p.21-56, 99-108, 131-144.

GUNSKI RJ, CUNHA IS, DEGRANDI TM, LEDESMA M, GARNERO AV (2013) Cytogenetic comparison of *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis*: A case of inversion and duplication involving constitutive heterochromatin. *Genet Mol Biol* 36:353-356.

HANCKS DC, KAZAZIAN HH JR (2012) Active human retrotransposons: variation and disease. *Curr Opin Genet Dev.* 22:191–203.

HAREN L, TON-HOANG B, CHANDLER M (1999) Integrating DNA: transposases and retroviral integrases. *Ann. Rev. Microbiol.* 53: 245-281.

HUANG CC, FRED CLARK H (1969) Chromosome studies of the cultured cells of two species of Side-Necked Turtles (*Podocnemis unifilis* and *Podocnemis expansa*). *Chromosoma* 26:245-253.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA (2016) Programa Quelônios da Amazônia. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/fauna-silvestre/especies-manejadas->. Acesso: 04/12/2015.

JACQUES PÉ, JEYAKANI J, BOURQUE G (2013) The majority of primate-specific regulatory sequences are derived from transposable elements. *PLoS Genet.* 9:e1003504.

JOHNS AD (1987) Continuing problems for Amazon river turtles. *Oryx* 21:25-28.

JONG JH, FRANZ P, ZABEL P (1999) High resolution FISH in plants – techniques and applications. *Trends Plant Science* 4: 258-263.

KAPUSTA A, KRONENBERG Z, LYNCH VJ, ZHUO X, RAMSAY L, BOURQUE G, YANDELL M, FESCHOTTE C (2013) Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs. *PLoS Genet.* 9:e1003470.

KAZAZIAN HH JR (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303:1626–1632.

KEMENES A, PEZZUTI JCB (2007) Estimate of trade traffic of *Podocnemis* (Testudines, Podocnemididae) from the middle of Purus River, Amazonas, Brasil. *Chelonian Conservation e Biology* 6:259-262.

KIDWELL MG, LISCH DR (1997) Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7704-7711.

KIDWELL MG, LISCH DR (2000) Transposable elements and host genome evolution. *Trends Ecol Evol.* 15(3):95-99.

KIDWELL MG (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115: 49-63.

KLUG WS, CUMMING MR, SPENCER CA, PALLADINO MA (2009) *Conceitos de Genética*. 9 ed. Porto Alegre: Artmed. 896p.

KORDIS D (2009) Transposable elements in reptilian and avian (sauropsida) genomes. *Cytogenet Genome Res.* 127:94–111.

KRENZ JG, NAYLOR GJP, SHAFFER HB, JANZEN FJ (2005) Molecular phylogenetics and evolution of turtles. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 178–191.

LANDER ES, LINTON LM, BIRREN B, NUSBAUM C, ZODY MC, BALDWIN J, DEVON K, DEWAR K, DOYLE M, FITZHUGH W, FUNKE R, GAGE D, HARRIS K, HEAFORD A, HOWLAND J, KANN L, LEHOCZKY J, LEVINE R, MCEWAN P, MCKERNAN K, MELDRIM J, MESIROV JP, MIRANDA C, MORRIS W, NAYLOR J, RAYMOND C, ROSETTI M, SANTOS R, SHERIDAN A, SOUGNEZ C, STANGE-THOMANN N, STOJANOVIC N, SUBRAMANIAN A, WYMAN D (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921 doi:10.1038/35057062.

LAW C, CHEUNG P (2012) Histone Variants and Transcription Regulation. *Subcell Biochem*, 61: 319-341.

LI YC, KORD AB, FAHIMA T, BERLES A, NERO E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. v11, p2453-2465.

LIU Z, LI P, KOCABAS A, KARSI A, JU Z (2001) Microsatellite-containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. v289, p317-324.

LONG EO, DAVID JB (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Ver. Biochem.*, v.49, p.727-764.

LYSON TR, SPERLING EA, HEIMBERG AM, GAUTHIER JA, KING BL, PETERSON KJ (2012) MicroRNAs support a turtle + lizard clade. *Biol. Lett.* 8, 104–107.

MARTINS C, WASKO AP (2004) Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In Williams CR (Ed) *Focus on Genome Research*. Nova Science Publishers Hauppauge NY 335-363.

MARTINS C, CABRAL-DE-MELLO DC, VALENTE GT, MAZZUCHELLI J, OLIVEIRA SG, PINHAL D (2011) *Animal genomes under the focus of cytogenetics*. New Hampshire: Nova Science Publisher.

MEYER A, ZARDOYA R (2003) Recent advances in the (molecular) phylogeny of vertebrates. *Annu Rev Ecol Evol and Syst* 34: 311–338. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132351

MITTERMEIER RA (1978) South America's River Turtles: Saving them by use. *Oryx*14:222-230.

MOLL D, MOLL EO (2004) *The ecology, exploitation and conservation of river turtles*. New York: Oxford University Press. 420p.

MOORHEAD PS, NOWELL PC, MELLMAM WJ, BATTIPS DM, HUNGERFORD DA (1960) Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Expi Cell Res* 20:613-616.

NAGODA N, FUKUDA A, NAKASHIMA Y, MATSUO Y (2005) Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of quartet and quintet units in a genome. *Insect MolBiol* 14: 713-717.

NOLETO RB, KANTEK DLZ, SWARÇA AC, DIAS AL, FENOCCHIO AS, CESTARI MM (2006) Karyotypic characterization of *Hydromedusa tectifera* (Testudines, Pleurodira) from the upper Iguazu River in the Brazilian state of Paraná. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 2, 263-266.

NOONAN BP (2000) Does the phylogeny of the Pelomedusidae turtle reflect vicariance to continental drift. *J Biogeogr.* 27:1245–1249.

NORONHA RCR, BARROS LMR, ARAÚJO REF, MARQUES DF, NAGAMACHI CY, MARTINS C, PIECZARKA JC (2016) New insights of karyoevolution in the Amazonian turtles *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemidae). *Molecular Cytogenetics*. 9:73 DOI 10.1186/s13039-016-0281-5

OJASTI J (1996) Wild life utilization in Latin America: Current Situation and prospect for sustainable management. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

ORTIZ ML, RODRÍGUEZ PA, BUENO ML (2005) Caracterización citogenética de la tortuga sabanera *Podocnemis vogli* (Reptilia, Testudinata, Podocnemididae). *Acta Biol Colomb*1:19-33.

PARHAM JF, FELDMAN CR, BOORE JL (2006) The complete mitochondrial genome of the enigmatic bigheaded turtle (Platysternon): description of unusual genomic features and the reconciliation of phylogenetic hypotheses based on mitochondrial and nuclear DNA. *BMC Evol. Biol.* 6 (11), 1–11.

PEARSE DE, ARNDT AD, VALENZUELA N, MILLER BA, CANTARELLI V, SITES JW (2006) Estimating population structure under non-equilibrium conditions in a conservation context: continent- wide population genetics of the giant Amazon river turtle *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemidae). *Molecular Ecology* 15:985-1006.

PETROV DA (2001) Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Opinion Trends Genet* 17: 23-28.

PEZZUTI JPL, JUAREZ CB, SILVA DF, BEGOSSI A (2010) Uses and Taboos of Turtles and Tortoises along Rio Negro, Amazon Basin. *Journal of Ethnobiology*, 30(1): 153–168.

PINKEL D, STRAUME T, GRAY JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 83:2934-2938.

PLOHL M, LUCHETTI A, MESTROVIC N, MANTOVANI B (2008) Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. *Gene* 409: 72-82.

POUGH FH, JANIS CM, HEISER JB (2008) A Vida dos Vertebrados. 4ª edição. São Paulo: Atheneu Editora. 684p.

PRITCHARD PCH, TREBBAU P (1984) Turtles of Venezuela. Oxford, Ohio: Society of the study of amphibians and reptiles, 414 p.

RAMÍREZ MV, MORA OVC, FRITZ U (2008) Molecular phylogeny and divergence times of ancient South American and Malagasy river turtles (Testudines, Pleurodira, Podocnemididae) *Organisms Divers Evol.* 8:388–398.

REBOLLO R, ROMANISH MT, MAGER DL (2012) Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes. *Annu Rev Genet.* 46:21–42.

RHODIN AGJ, MITTERMEIER RA, GARDNER AL, MEDEM F (1978) Karyotypic analysis of the *Podocnemis* turtles. *Copeia* 4:723-728.

RUEDA-ALMONACID JV, CARR JL, MITTERMEIER RA, RODRÍGUEZ-MAHECHA JV, MAST RB, VOGT RC, RHODIN AGJ, OSSA-VELÁSQUEZ J, RUEDA JN, MITTERMEIER CG (2007) Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico. Bogotá: Editorial Panamericana, Formas e Impresos. 538 p.

SALERA-JUNIOR G, MALVASIO A (2005) *Biologia e Conservação dos Quelônios da Amazônia.* 172pp.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2 ed. Vol 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 253p.

SCHMIDT T, HESLOP-HARRISON JS (1998) Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends Plant Science* 3: 195-199.

SCHEMBERGER M.O., NOGAROTO V, ALMEIDA M.C., ARTONI R.F., VALENTE G.T., MARTINS C., VICARI M.R (2016) Sequence analyses and chromosomal distribution of the *Tc1/Mariner* element in Parodontidae fish (Teleostei: Characiformes). *Gene* 593, 308–314.

SCHNEIDER L, FERRARA CR, VOGT RC, BURGER EJ (2011) History of turtle exploitation e management techniques to conserve turtles in the Rio Negro basin of the

SHAFFER H.B, MINX P, WARREN DE, SHEDLOCK AM, THOMSON RC, VALENZUELA N, ABRAMYAN J, AMEMIYA CT, BADENHORST D, BIGGAR K, BORCHERT GM, BOTKA CW, BOWDEN RM, BRAUN EL, BRONIKOWSKI AM, BRUNEAU BG, BUCK LT, CAPEL B, CASTOE TA, CZERWINSKI M, DELEHAUNTY KD, EDWARDS SV, FRONICK CC, FUJITA MK, FULTON L, GRAVES TA, GREEN RE, HAERTY W, HARIHARAN R, HERNANDEZ O, HILLIER LW, HOLLOWAY AK, JANES D, JANZEN FJ, KANDOTH C, KONG L, KONING APJ, LI Y, LITERMAN R, MCGAUGH SE, MORK L, O'LAUGHLIN M, PAITZ RT, POLLOCK DD, PONTING CP, RADHAKRISHNAN S, RANEY BJ, RICHMAN JM, JOHN JS, SCHWARTZ T, SETHURAMAN A, SPINKS PQ, STOREY KB, THANE N, VINAR T, ZIMMERMAN LM, WARREN WC, MARDIS ER, WILSON RK (2013) The western painted turtle genome, a model for the evolution of extreme physiological adaptations in a slowly evolving lineage. *Genome Biology*, 14: R28 doi:10.1186/gb-2013-14-3-r28

SHAFFER HB, MEYLAN P, MCKNIGHT ML (1997) Tests of turtle phylogeny: molecular, morphological, and paleontological approaches. *Syst. Biol.* 46, 235–268.

SHAFTER HB (2009) Turtles (Testudines). In: HEDGES, S. B.; KUMAR, S. *The Timetree of Life*. 1.ed. New York, United States: Eds. Oxford University Press, v. 55, p. 398-401.

SMITH GP (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*. 191(4227):528-35.

SNUSTAD DP, SIMMONS MJ (2013) *Fundamentos de Genética*. Ed. 6ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

STORZ G (2002) An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* 296, 1260-1263.

SUMNER A (2003) *Chromosomes Organization and Functions*. Blackwell Science Ltd. Cap 7- pag.:84-96.

van DIJK PP, IVERSON BJ, RHODIN AGJ, SHAFFER HB, BOUR R (2014) *Turtles of the World, 7th Edition: Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution with Maps, and Conservation Status*. Chelonian Research Monographs, n. 5.

VENTURA K, MOREIRA CN, MORETTI R, YONENAG-YASSUDA Y, RODRIGUES MT (2014) The lowest diploid number in Testudines: Banding patterns, telomeric and 45S rDNA FISH in *Pelteocephalus dumerilianus*, 2n = 26 and FN = 52 (Pleurodira, Podocnemididae). *Genet. Mol. Biol.* vol.37 no.1 Ribeirão Preto. ISSN 1415-4757

VICARI MR, NOGAROTO V, NOLETO RB, CESTARI MM, CIOFFI MB, ALMEIDA MC, MOREIRA-FILHO O AND ARTONI RF (2010) Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *J Fish Biol* 76:1094-1116.

VOGT RC (2008) *Tartarugas da Amazônia*. INPA/Amazon Conservation Association. 104 p.

VOLFF JN (2006) Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *Bioessays* 28: 913–922.

VOLFF JN, KÖRTING C, FROSCHAUER A, SWEENEY K, SCHARTL M (2001) Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. *Journal of Molecular Evolution* 52: 351-360.

VOLFF, J. N.; KÖRTING, C.; SCHARTL, M. (2000). Multiple lineages of the non-LTR retrotransposons *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Molecular and Biology Evolution*. 17:1673-1684.

VOLFF, J. N.; KÖRTING, C.; SWEENEY, K.; SCHARTL, M. (1999). The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular and Biology Evolution*. 16: 1427–1438.



VORECHOVSKY I (2010) Transposable elements in disease-associated cryptic exons. *Hum Genet.* 127:135–154.

WANG T, ZENG J, LOWE CB, SELLERS RG, SALAMA SR, YANG M, BURGESS SM, BRACHMANN RK, HAUSSLER D (2007) Species-specific endogenous retroviruses shape the transcriptional network of the human tumor suppressor protein p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(47):18613-8.

WANG Z, PASCUAL-ANAYA J, ZADISSA A, LI W, NIIMURA Y, HUANG Z, LI C, WHITE S, XIONG Z, FANG D, WANG B, MING Y, CHEN Y, ZHENG Y, KURAKU S, PIGNATELLI M, HERRERO J, BEAL K, NOZAWA M, LI Q, WANG J, ZHANG H, YU L, SHIGENOBU S, WANG J, LIU J, FLICEK P, SEARLE S, WANG J, KURATANI S, YIN Y, AKEN B, ZHANG G, IRIE N (2013) The draft genomes of soft-shell turtle and green sea turtle yield insights into the development and evolution of the turtle-specific body plan. *Nature Genetics.* 45, 701–706.

WICKER T, SABOT F, HUA-VAN A, BENNETZEN JL, CAPY P, CHALHOUB B, FLAVELL A, LEROY P, MORGANTE M, PANAUD O, PAUX E, SANMIGUEL P, SCHULMAN AH (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet.* 8:973–982.

XIE M, HONG C, ZHANG B, LOWDON RF, XING X, LI D, ZHOU X, LEE HJ, MAIRE CL, LIGON KL, GASCARD P, SIGAROUDINIA M, TLSTY TD, KADLECEK T, WEISS A, O'GEEN H, FARNHAM PJ, MADDEN PAF, MUNGALL AJ, TAM A, KAMOH B, CHO S, MOORE R, HIRST M, MARRA MA, COSTELLO JF, WANG T (2013) DNA hypomethylation within specific transposable element families associates with tissue-specific enhancer landscape. *Nat Genet.* 45:836–841.

ZUG GR (1993) *An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles.* Herpetology. Academic Press, New York, NY.