

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

G322e GEMAQUE CAVALCANTE, MANOELLA.
ESTUDOS SOBRE A DINÂMICA ORGANIZACIONAL DE
DNAS REPETITIVOS EM QUELÔNIOS / MANOELLA
GEMAQUE CAVALCANTE. — 2021.
82 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Renata Coelho Rodrigues Noronha
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de
Ecologia Aquática e Pesca da Amazônia, Programa de Pós-
Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Belém, 2021.

1. CITOGENÉTICA, DNAs REPETITIVOS. I. Título.

CDD 571.6



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

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDOS SOBRE A DINÂMICA ORGANIZACIONAL DE
DNAS REPETITIVOS EM QUELÔNIOS**

MANOELLA GEMAQUE CAVALCANTE

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Renata Coelho Rodrigues Noronha

Belém – PA

2021

MANOELLA GEMAQUE CAVALCANTE

**ESTUDOS SOBRE A DINÂMICA ORGANIZACIONAL DE
DNAS REPETITIVOS EM QUELÔNIOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, da Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha

Belém – PA

2021

MANOELLA GEMAQUE CAVALCANTE

**ESTUDOS SOBRE A DINÂMICA ORGANIZACIONAL DE
DNAS REPETITIVOS EM QUELÔNIOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, da Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas.

Data: 07 de Dezembro de 2021

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha (Presidente)

Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka (Titular)

Prof. Dr. Rommel Thiago Jucá Ramos (Titular)

Prof. Dra. Viviane Nogaroto Vicari (Titular)

Prof. Dra. Maria Iracilda da Cunha Sampaio (Titular)

Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena (Suplente)

Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales (Suplente)

Belém – PA

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida e da minha família!

Agradeço a minha família, que sempre esteve ao meu lado, me incentivando com muito amor e comemorando cada conquista.

Faço um agradecimento muito especial a minha orientadora, Profa. Dra. Renata Noronha. Começamos a trabalhar juntas em 2015, quando ingressei no mestrado. Sempre aberta aos alunos, ela move mundos para conseguir dar todo o suporte que precisamos para desenvolver estudos de excelência! Tenho muito orgulho de ter realizado essa jornada tão importante e significativa da minha carreira em parceria com a Profa. Renata. Obrigada por tudo!

Agradeço aos Professores Dra. Cleusa Nagamashi e Dr. Julio Pieckzarca, que também contribuíram muito para a minha formação profissional, e por terem me recebido tão bem junto a equipe do CEABIO. Trabalhar em parceria com vocês foi um grande privilégio!

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Vicari por todo apoio intelectual nos estudos sobre sequências repetitivas. O admiro muito como professor e profissional. Sempre disposto a ajudar e ensinar, de forma leve e muito didática. Obrigada por tudo!

Agradeço ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Cesar Martins, pela parceria com os estudos do CEABIO, em especial ao Dr. Adauto Cardoso que sempre foi muito solícito em nos ajudar nos avanços das análises moleculares das sequências. Muito obrigada!

Agradeço a toda a equipe do CEABIO, em especial ao Mestre Jorge Rissino, por todo apoio, desde as coletas biológicas até as culturas celulares! Sua ajuda foi fundamental para a minha formação! Agradeço a Shirley que também sempre me ensinou com muita prática e conhecimento sobre diversas metodologias que foram importantíssimas para o desenvolvimento da minha pesquisa! E um agradecimento carinhoso a Dona Conci, não só pelo suporte essencial que ela dá ao laboratório, mas também pela companhia nos cafézinhos de manhã cedo no laboratório.

Agradeço ao Dr. Bruno Almeida, a Dra. Stella Malcher e ao Dr. Carlos Eduardo Bastos,

que estiveram ao meu lado me ensinando a genética molecular prática e eficiente! Muito do que sei de bancada, eles me ensinaram. Quando entrei no laboratório, eu não sabia nem pingar uma lâmina, e hoje saio com três artigos publicados porque tive o suporte essencial de vocês! Muito obrigada!

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca por todo suporte e oportunidades que dão aos alunos!

Agradeço a Capes pela concessão da minha bolsa de estudos!

Nenhuma conquista é isolada. Todos que descrevo formalmente aqui fizeram parte da minha formação acadêmica. Gratidão!

DEDICATÓRIA

Dedico a conclusão deste estudo em memória de meu amado avô e padrinho, **VICENTE ARNALDO GAMA GEMAQUE**.
Vô, o senhor sempre vai ser meu maior exemplo de fé, amor e honestidade! Te amo pra sempre, além dessa vida, meu vô Ió!

RESUMO

Estudos citogenéticos revelam uma ampla variação cariotípica entre quelônios (ordem Testudines) ($2n=26-68$), atribuída principalmente ao número de microcromossomos. Estudos sobre DNAs repetitivos têm o potencial de fornecer dados importantes sobre a dinâmica dessas sequências e como elas podem caracterizar e influenciar na organização do genoma. Os genomas eucarióticos exibem um acúmulo substancial dessas sequências repetitivas, as quais podem participar de eventos de reorganização cromossômica, sofrer cooptação molecular, e interferir na função e evolução dos genomas. Em quelônios, as sequências repetitivas de DNA parecem se acumular em prováveis pontos de quebra e participar de eventos como recombinação não homóloga e rearranjos cromossômicos. Nesse sentido, na presente tese investigamos a dinâmica organizacional de diferentes sequências de DNAs repetitivos (rDNA 45S, 5S, snRNA U2, genes de Histonas, telômeros, e transposon Tc1 / Mariner) nos genomas de três espécies de quelônios (*Rhinoclemmys punctularia*, *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis*). Nossos resultados trazem dados inéditos sobre a localização *in situ* dessas sequências nos genomas das espécies investigadas, além de levantar importantes questionamentos e inferências sobre rearranjos genômicos e inserções de elementos transponíveis em outros genes.

Palavras-chave: Citogenética Molecular, DNAs Repetitivos, Testudines, Elementos Transponíveis

ABSTRACT

Cytogenetic studies reveal a wide karyotypic variation among turtles (order Testudines) ($2n=26-68$), mainly attributed to the number of microchromosomes. Studies on repetitive DNAs have the potential to provide important data about the dynamics of these sequences and how they can characterize and influence the organization of the genome. Eukaryotic genomes exhibit a substantial accumulation of repetitive DNA sequences, which can participate in chromosomal reorganization events, undergo molecular cooption, and interfere with the function and evolution of genomes. In turtles, repetitive DNA sequences seem to accumulate at likely breakpoints and participate in events such as non-homologous recombination and chromosomal rearrangements. Accordingly, in this thesis we investigate the organizational dynamics of different repetitive DNA sequences (45S and 5S rDNA, snRNA U2, Histone genes, telomeres, and Tc1/Mariner transposon) in the genomes of three species of turtles (*Rhinoclemmys punctulata*, *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis*). Our results bring unprecedented data about the *in situ* location of these sequences in the genomes of the investigated species, in addition to raising important questions and inferences about genomic rearrangements and insertions of transposable elements in other genes.

Keywords: Molecular Cytogenetics, Repetitive DNAs, Testudines, Transposable Elements

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 Considerações sobre a ordem Testudines, com ênfase na diversidade cariotípica.....	11
1.2 Mapeamento Citogenético Molecular como ferramenta para estudos de evolução cariotípica em Testudines.....	12
1.2.1 DNAs Repetitivos	12
1.3 Espécies Estudadas e suas Informações Biológicas	14
1.3.1 <i>Rhinoclemmys punctularia</i> (Cryptodira, Geoemydidae).....	14
1.3.2 <i>Podocnemis expansa</i> (Pleurodira, Podocnemididae)	15
1.3.3 <i>Podocnemis unifilis</i> (Pleurodira, Podocnemididae)	16
2. OBJETIVO GERAL	18
2.1 Objetivos Específicos.....	18
3. ORGANIZAÇÃO DA TESE	18
4. METODOLOGIA	18
4.1 Amostras.....	19
4.2 Preparação Cromossômica, Extração de DNA e Produção das Sondas	20
4.3 Sequenciamento e análise de DNAs Repetitivos	21
4.4 Técnica de Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH) para Mapeamento Físico de DNAs Repetitivo.....	22
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
6. RESULTADOS	30
Capítulo 1: MOLECULAR CYTOGENETICS CHARACTERIZATION OF <i>RHINOCLEMMYS PUNCTULARIA</i> (TESTUDINES, GEOEMYDIDAE) AND DESCRIPTION OF A GYPSY-H3 ASSOCIATION IN ITS GENOME	30
RESUMO	31
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS	34
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO.....	39
CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

Capítulo 2: EVOLUTIONARY INSIGHTS IN AMAZONIAN TURTLES (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE): CO-LOCATION OF 5S RDNA AND U2 SNRNA AND WIDE DISTRIBUTION OF TC1/MARINER.....	52
RESUMO	53
INTRODUÇÃO	53
MATERIAL E MÉTODOS	55
RESULTADOS	57
DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
7. CONCLUSÕES FINAIS.....	70

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Considerações sobre a ordem Testudines, com ênfase na diversidade cariotípica

A ordem Testudines é tida como uma das linhagens mais antigas de vertebrados existentes (Ferri, 2002). Os quelônios se dividiram em dois grupos diferenciados por características anatômicas, como articulação das vértebras cervicais e capacidade de flexão do pescoço, formando as duas subordens existentes: Subordem Cryptodira, abrangendo a maioria das espécies, representada por 10 famílias (Carettochelyidae, Cheloniidae, Chelydridae, Dermatemydidae, Dermochelyidae, Emydidae, Geoemydidae, Kinosternidae, Testudinidae, Trionychidae), e a Subordem Pleurodira, representada pela família Chelidae e pela superfamília Pelomedusoidea, que inclui duas famílias (Pelomedusidae e Podocnemididae) (Bickham e Carr, 1983; Goulart, 2004; Shafter, 2009; Gunski et al. 2013).

Estudos citogenéticos revelam uma grande variação cariotípica da ordem Testudines, de $2n=26$ na Tartaruga-de-cabeça-grande-do-Amazonas (*Peltocephalus dumerilianus*: Pleurodira, Podocnemididae) (Ventura et al. 2014) a $2n=68$ na Tartaruga-nariz-de-porco (*Carettochelys insculpta*: Cryptodira, Carettochelyidae) (Bickham & Carr, 1983; Montiel et al. 2016a). Essa ampla diversidade cariotípica entre quelônios é atribuída, principalmente, à presença/ausência de microcromossomos: a subordem Cryptodira varia o $2n$ entre 48-68, com muitos microcromossomos (Bickham e Carr, 1983; Montiel et al. 2016a; Cavalcante et al. 2020a), enquanto que na subordem Pleurodira, a família Chelidae apresenta alto número diploide e presença de muitos microcromossomos, variando $2n=50-58$ (Bull e Legler, 1980; Montiel et al. 2016a), semelhante aos cryptodiras; no entanto, a superfamília Pelomedusoidae abrange os menores números diploides da ordem Testudines, variando de $2n=34-36$ em Pelomedusidae, com poucos microcromossomos (Bull e Legler, 1980), e de $2n=26-28$ em Podocnemididae, sem microcromossomos (Ayres et al. 1969; Gunski et al. 2013; Ventura et al. 2014; Noronha et al. 2016; Montiel et al. 2016a; Cavalcante et al. 2018).

Foi proposta uma condição cariotípica derivada para Pelomedusoidea (Bull e Legler, 1980; Montiel et al. 2016a), onde múltiplos rearranjos cromossômicos parecem ser responsáveis pela redução nos números diploides, como sugerido por Fantin e Monjeló (2011)

e Gunski et al. (2013). O avanço dos estudos citogenéticos moleculares fortaleceu a hipótese de que, em Pelomedusoidea, a redução do $2n$, provavelmente, foi causada por múltiplas fusões de microcromossomos, e que este talvez seja o principal mecanismo de redução cromossômica em Testudines (Montiel et al 2016a; Cavalcante et al. 2018, 2020b). Vale ressaltar que é pressuposto que um grande número de microcromossomos foi reduzido por tais fusões em alguns répteis (Srikulnath et al. 2009, 2013; Matsubara et al. 2012). Nesse contexto, o avanço dos dados citogenômicos auxiliam na compreensão dos mecanismos evolutivos e rearranjos cromossômicos envolvidos na diversidade cariotípica em quelônios.

1.2 Mapeamento Citogenético Molecular como ferramenta para estudos de evolução cariotípica em Testudines

O mapeamento citogenético molecular fornece importantes informações sobre a estrutura, organização e funcionalidade do genoma em diversos organismos, permitindo compreender os mecanismos evolutivos cromossômicos e a dinâmica organizacional do genoma (Cabral-De-Mello et al. 2010; Primo et al. 2017), além de possibilitar uma melhor caracterização da biodiversidade e da carioevolução (Vicari et al. 2010). No entanto, esses estudos ainda são escassos e limitados apenas a uma pequena fração de espécies de quelônios existentes. Nesse sentido, a presente tese buscou a produção de dados que contribuam para o conhecimento evolutivo dos carióticos de testudinatas, a partir do mapeamento *in situ* de DNAs Repetitivos.

1.2.1 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. A grande variação encontrada no tamanho e organização do genoma entre os eucariotos é atribuída, principalmente, ao acúmulo dessas sequências repetidas (Feschotte e Pritham, 2007; Kordis, 2009), as quais incluem famílias multigênicas, DNAs satélites, e ainda sequências dispersas, capazes de se mover ao longo do genoma de acordo com o seu intermediário de transposição, DNA ou RNA (transposons ou retrotransposons, respectivamente) (Martins et al.

2011). Muitas vezes, essas sequências repetidas parecem representar papel importante na reorganização cromossômica durante a evolução cariotípica (Barros et al. 2017; Primo et al. 2017).

O mapeamento *in situ* de sequências repetitivas em estudos de organização cromossômica e/ou em regiões de quebras sintênicas sugerem que sítios ricos em DNA repetitivo, por conter muitas cópias de genes parálogos, são pontos críticos para quebras de dupla fita, recombinação não homóloga e reorganização cromossômica em diversos organismos (Cazaux et al. 2011; Farré et al. 2011; Barros et al. 2017; Cavalcante et al. 2018). Além disso, Elementos Transponíveis (*Transposable Elements – TEs*), por apresentarem capacidade de mobilidade entre diferentes locais cromossômicos, podem impulsionar a evolução genômica e até mesmo influenciar os sistemas reguladores de genes eucarióticos (Feschotte, 2007). Nesse contexto, o aprofundamento dos estudos citogenéticos moleculares em Testudines, utilizando sequências de DNAs de múltiplas cópias, fornecem dados que contribuem para estudos acerca dos mecanismos evolutivos e rearranjos cromossômicos envolvidos na grande diversidade cariotípica da ordem, além de sinalizar de que maneira essas sequências podem interferir na organização genômica do grupo.

O avanço do mapeamento *in situ* em cariótipos de Testudines, utilizando sondas de DNA ribossomal (rDNA) e sequências teloméricas, em sua maioria, tem revelado um padrão organizacional o qual pode indicar redução de $2n$ por eventos de fusões cromossômicas envolvendo microcromossomos: o rDNA 45S está localizado em um único par de microcromossomos em espécies de quelônios com alto $2n$ (Noletto et al. 2006; Fantin e Giuliano-Caetano, 2014; Montiel et al. 2016a; Cavalcante et al. 2020a), enquanto que em espécies que apresentam os menores números diploides da ordem ($2n=26-28$), o rDNA 45S foi detectado na região pericentromérica do primeiro par de macrocromossomos (Ventura et al. 2014; Montiel et al. 2016a; Noronha et al. 2016; Cavalcante et al. 2018). Além disso, espécies com baixo $2n$ e sem microcromossomos foram reportadas apresentando sequências teloméricas intersticiais em alguns pares cromossômicos, que podem representar remanescentes de fusões cromossômicas (Noronha et al. 2016; Montiel et al. 2016a; Cavalcante et al. 2018), ou uma

tendência de acumulação nessas regiões heterocromáticas (Noronha et al. 2016; Cavalcante et al. 2020a).

Genes de Histona H1 e H3 foram mapeados por hibridização *in situ* em cariótipos de apenas duas espécies de quelônios, pertencentes ao gênero *Podocnemis* (*P. expansa* e *P. unifilis*), revelando genes H1 em sintenia conservada com o rDNA 45S, além de múltiplos blocos de genes H3 concentrados em regiões pericentroméricas de vários pares cromossômicos naquelas espécies, que é sugestivo de recombinações não homólogas (Cavalcante et al. 2018).

Apesar dos poucos dados disponíveis sobre o mapeamento *in situ* de sequências repetitivas, estes já mostram interessantes discussões sobre sua organização no genoma de diferentes espécies de quelônios. O aprofundamento dessas análises possibilita inferir de que maneira essas sequências podem estar atuando na (re)organização cariotípica em Testudines, além de dar um importante suporte para estudos evolutivos cariotípicos dessas espécies.

1.3 Espécies Estudadas e suas Informações Biológicas

Consideramos a escolha das espécies estudadas na presente tese de acordo com sua classificação em subordens: selecionamos uma espécie da subordem Cryptodira (*Rhinoclemmys punctularia*), com alto número diploide ($2n=56$) e filogeneticamente mais basal em relação as outras duas espécies selecionadas para este estudo; e duas espécies da subordem Pleurodira, as quais representam o segundo menor número diploide da ordem (*Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis*) ($2n=28$).

1.3.1 *Rhinoclemmys punctularia* (Cryptodira, Geoemydidae)

Popularmente conhecida como Aperema (Figura 1A), a distribuição dessa espécie ocorre na Venezuela, Guianas, Trinidad e Tobago e no Brasil (Figura 1B); no Brasil, ocorre nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão, Roraima e Amapá (Schneider et al. 2009). Habita diferentes ambientes lênticos e lóticos, e pode ser encontrada inclusive em áreas urbanas poluídas (Vogt, 2008). No Pará, *R. punctularia* está amplamente distribuída em diversos sistemas aquáticos, sendo observada na região costeira no município de Curuçá e ilhas

adjacentes (Pezzuti et al. 2008a), na região do Rio Xingu, no Reservatório da Hidrelétrica de Tucuruí (Félix-Silva et al. 2008, Pezzuti et al. 2008b) e em campos inundados na Ilha de Marajó (ICMBio). Essa espécie apresenta determinação sexual por temperatura de incubação dos ovos (Vogt 2008).

O gênero *Rhinoclemmys* é composto por nove espécies, dentre as quais oito foram analisadas por métodos de citogenética clássica. Essas espécies apresentaram alto número diploide ($2n=52$) e muitos microcromossomos (Killebrew, 1977; Bickham e Carr, 1986), exceto a espécie *R. punctularia*, que mostrou número diplóide maior, igual 56 (Barros et al. 1975; Viana et al. 2016).

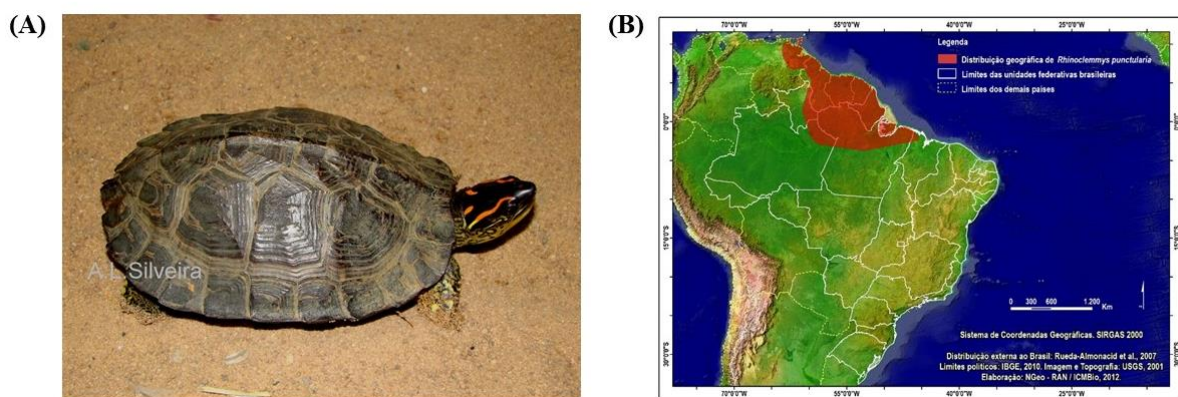


Figura 1: Exemplar da espécie *Rhinoclemmys punctularia* (A) e representação de sua distribuição geográfica (B) (Fonte: adaptado do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio).

1.3.2 *Podocnemis expansa* (Pleurodira, Podocnemididae)

Uma das espécies de quelônios mais representativas da região amazônica, a Tartaruga-da-Amazônia (Figura 2A); no Brasil, apresenta distribuição em todos estados da Região Norte e nos estados de Goiás e Mato Grosso, na Região Centro-Oeste. Também apresenta ocorrência na Colômbia, Venezuela, Guianas, Peru, Equador e Bolívia (Vogt, 2008) (Figura 2B). É uma tartaruga essencialmente aquática, que vive tanto em sistemas de água branca como em águas

escuras, e que habita também lagos na floresta (Ernst e Barbour, 1989). Apresenta determinação sexual por temperatura de incubação dos ovos (Vogt, 2008), e possui um único período reprodutivo anual, onde as fêmeas depositam uma única ninhada por temporada reprodutiva (Rueda-Almonacid et al. 2007).

Espécies do gênero *Podocnemis* apresentam o segundo menor número diploide da ordem Testudines ($2n=28$); estudos citogenéticos indicam uma condição derivada para o gênero, onde múltiplas fusões cromossômicas parecem ser responsáveis pela redução do $2n$ nessas espécies (Montiel et al. 2016; Noronha et al. 2016; Cavalcante et al. 2018).

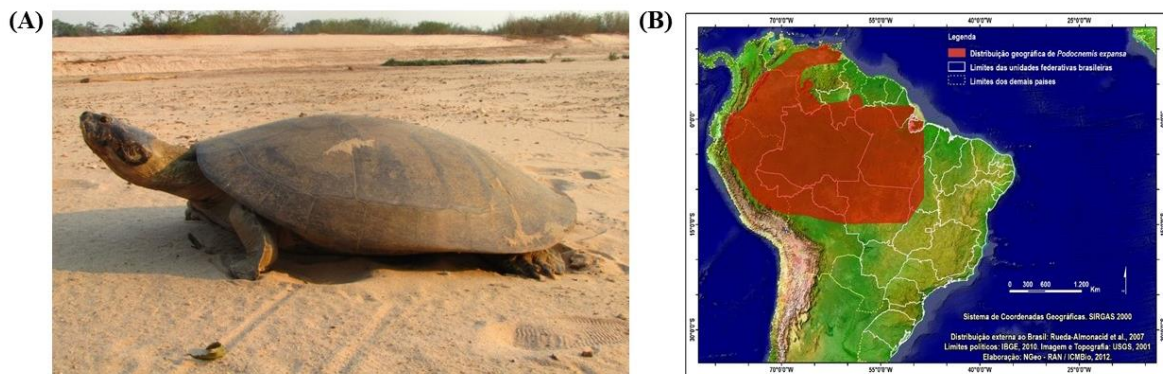


Figura 2: Exemplar da espécie *Podocnemis expansa* (A) e representação de sua distribuição geográfica (B) (Fonte: adaptado do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio).

1.3.3 *Podocnemis unifilis* (Pleurodira, Podocnemididae)

Amplamente conhecida na região amazônica como Tracajá (Figura 3A), apresenta distribuição no Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, Guiana, Guina Francesa e Suriname. No Brasil, ocorre em todos os estados da Região Norte e nos estados de Goiás e Mato Grosso, na região Centro-Oeste (Figura 3B).

Essa espécie vive em uma ampla variedade de habitats, tais como: grandes rios, lagos, lagos de meandros, pântanos, brejos e lagoas, e em rios de águas brancas, claras e pretas. Juvenis são achados com maior frequência em pequenas lagoas e enseadas, e os machos vivem

em grandes corpos d'água (Vogt 2008). Apresenta determinação sexual por temperatura de incubação dos ovos (Vogt, 2008), e possuem duas ou mais desovas em cada período reprodutivo (Ernst & Barbour, 1989)

Como descrito no tópico anterior, espécies do gênero *Podocnemis* apresentam o segundo menor número diploide da ordem Testudines ($2n=28$), e estudos indicam que o baixo número diploide dessas espécies podem representar uma condição cariotípica derivada.

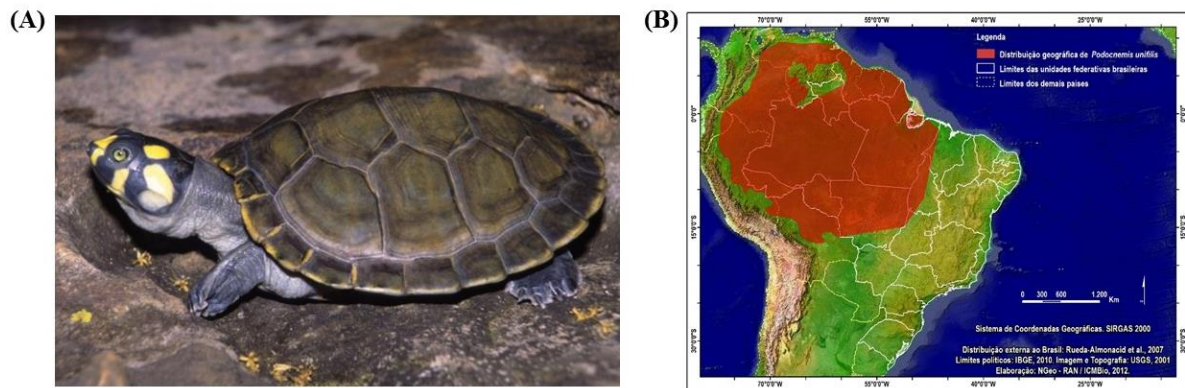


Figura 3: Exemplar da espécie *Podocnemis unifilis* (A) e representação de sua distribuição geográfica (B) (Fonte: adaptado do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio).

2. OBJETIVO GERAL

A presente tese teve como objetivo estudar a organização física de DNAs de múltiplas cópias em genomas de quelônios, e compreender como a ação amplamente dinâmica dessas sequências pode atuar no processo evolutivo cariotípico dessas espécies.

2.1 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar a organização física de DNAs repetitivos nos cariótipos das espécies *Podocnemis expansa*, *Podocnemis unifilis* e *Rhinoclemmys punctularia*;
- b) Estudar como a ampla dinâmica genômica de DNAs repetitivos pode atuar nos processos evolutivos envolvidos na grande diversidade cariotípica em quelônios;
- c) Investigar a ocorrência de associações de Elementos Transponíveis em multigenes nos genomas de quelônios.

3. ORGANIZAÇÃO DA TESE

A tese foi organizada em dois capítulos, com as respectivas publicações realizadas durante o desenvolvimento deste estudo:

- a) Capítulo 1: Molecular cytogenetics characterization of *Rhinoclemmys punctularia* (Testudines, Geoemydidae) and description of a Gypsy-H3 association in its genome.
- b) Capítulo 2: Evolutionary insights in Amazonian turtles (Testudines, Podocnemididae): co-location of 5S rDNA and U2 snRNA and wide distribution of Tc1/Mariner.

4. METODOLOGIA

A figura 4 representa de forma esquemática a metodologia utilizada para o desenvolvimento da presente tese. O detalhamento da metodologia é descrito nos tópicos a seguir.

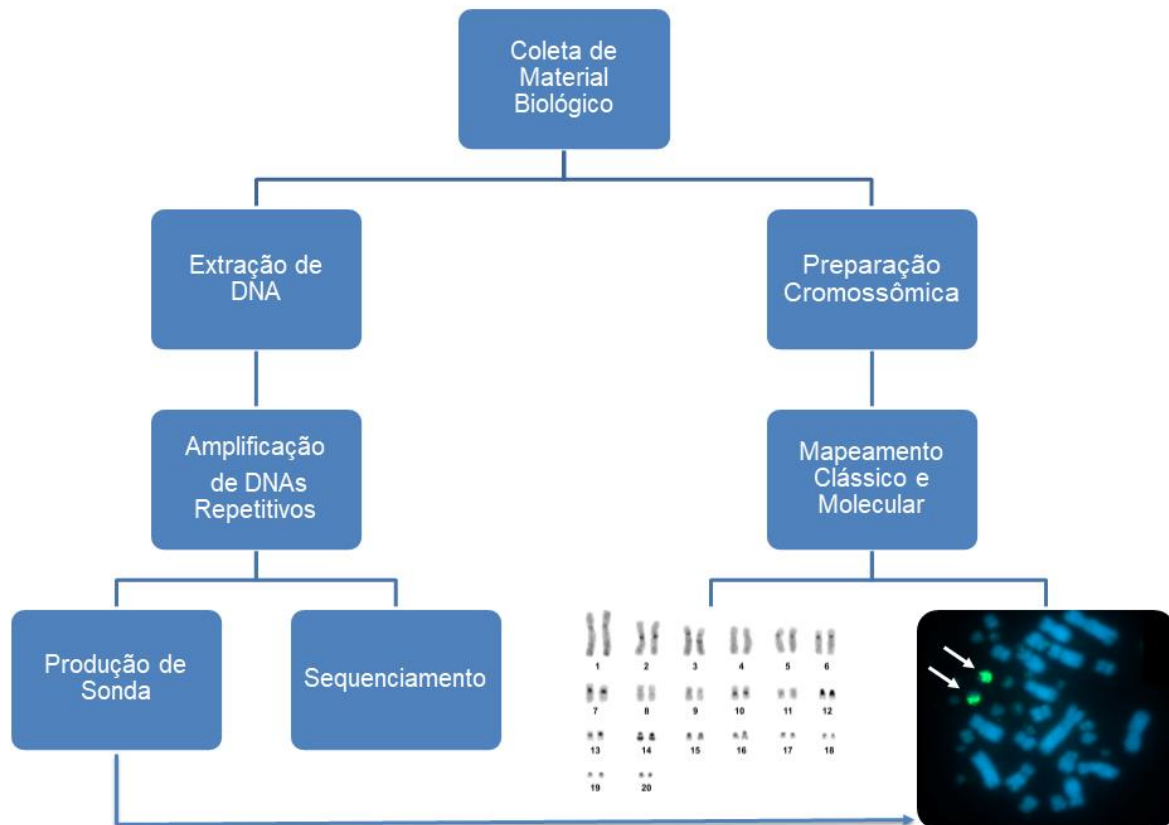


Figura 4: Representação esquemática da metodologia utilizada para realização dos estudos que compoem a presente tese de doutorado.

4.1 Amostras

Foram utilizadas três espécies de quelônios como modelo para o presente estudo: *Podocnemis expansa*, *Podocnemis unifilis*, *Rhinoclemmys punctularia*. As coletas dos materiais biológicos dos espécimes de *Rhinoclemmys punctularia* foram realizadas em parceria com o Parque Zoobotânico Adhemar Monteiro, no município de Capitão Poço, Pará, Brasil; enquanto que os materiais biológicos das espécies *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* foram obtidas em parceria com o Parque Naturalístico Mangal das Garças, município de Belém, Pará, Brasil.

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 se encontra aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (Número de Licença: 68-2015), e Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO (Número: 42642-5).

4.2 Preparação Cromossômica, Extração de DNA e Produção das Sondas

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir da cultura temporária de linfócitos, segundo protocolo descrito por Viana et al. (2016). O DNA genômico foi purificado utilizando GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). As amplificações das sequências de DNAs repetitivos foram realizadas pelo procedimento de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos para cada sequência alvo. As informações dos *primers* utilizados estão descritas na tabela abaixo (Tabela 1). Para a síntese da sonda de rDNA 45S, usamos o plasmídeo pTa71, que contém as sequências dos genes 5.8S, 18S e 28S e seus respectivos espaçadores intergênicos de *Triticum aestivum* (Gerlach e Bedbrook, 1979). Os produtos das PCRs foram marcados por *Nick Translation*: BioNick Labeling System (Invitrogen), para marcações com biotina, e DIG-Nick Translation Mix (Roche), para as marcações com digoxigenina, conforme recomendações dos fabricantes.

Tabela 1: Informações sobre os *primers* utilizados para aplicações de DNAs repetitivos.

Sequência Alvo	Primers	Referências
Histona H3	(Forward) 5-ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC-3 and (Reverse) 5-ATA TCC TTV GGC ATV ATV GTG AC-3	Colgan et al. (1998)
Telômero	(TTAGGG) ₅ and (CCCTAA) ₅	Ijdo et al. (1991)
rDNA 5S	Forward (5'-GCC ACA CCA CCC TGA ACA C-3') and Reverse (5'-GCC TAC GAC ACC TGG TAT TC-3')	Suárez et al. (2017)
snRNA U2	5'-TCT CGG CCT (AT) (AT)T GGC TAA-3' and 5'-G(AC)G GTA (GC) TG CAA TAC CGG- 3'	Colgan et al. (1998)
Tc1/Mariner	MAR-188F5'- ATCTGRAGCTATAAATCACT and MAR-251R 5'- CAAAGATGTCCTTGGGTGTG	Lampe et al. (2003)

4.3 Sequenciamento e análise de DNAs Repetitivos

Os produtos de PCR foram purificados utilizando GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e sequenciados em Analisador Gênico ABI 3500 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). As sequências foram editadas e analisadas usando o software Geneious 7.1.3 (Kearse et al. 2012), e suas identidades confirmadas usando a ferramenta CENSOR para sequências repetidas (Girinst) (Kohany et al. 2006) e BLASTn (NCBI).

4.4 Técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) para Mapeamento Físico de DNAs Repetitivo

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

As lâminas foram lavadas em solução salina 1xPBS (36 mL de água destilada + 4 mL de 10xPBS) por cinco minutos, em temperatura ambiente. As lâminas foram tratadas 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 cinco minutos, em temperatura ambiente. A desidratação das lâminas foi realizada através de uma bateria de álcool (2x álcool 70% por dois minutos cada, 2x álcool 90% por dois minutos cada e 2x 100% por 10 minutos cada). Então, as lâminas foram envelhecidas em estufa a 65° C por uma hora. Os cromossomos foram desnaturados em solução de Formamida 70% (70 mL de formamida + 30 mL de 2xSSC) à 62°C por 40 segundos e, em seguida, rapidamente imergidos em álcool 70% gelado durante quatro minutos. Após, os cromossomos foram submetidos 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 a mesma foi diluída em tampão de hibridização de 77% (3 μ L de sonda + 10 μ L de tampão de hibridização 77%). Essa solução foi desnaturada a temperatura de 70°C por 15 minutos e pingada sobre a lâmina contendo os cromossomos. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 18-24 horas para hibridização. Para remoção de possíveis marcações inespecíficas, as lâminas foram lavadas em solução de Formamida 50% (50 mL de formamida + 50 mL de 2xSSC), solução 2xSSC, e solução 4xTween (200 mL de 4xSSC + 100 μ L de Tween), por três minutos em cada solução, todas à temperatura de 40°C. Posteriormente, foram adicionadas sobre as lâminas uma solução de detecção contendo fluorocromo: 0,2 μ L de avidina CY3 para 100 μ L de 4xTween, para

marcações com biotina, ou 0,4 μ L de antidigoxigenina FITC para 100 μ L de 4xTween, para marcações com digoxigenina. As lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida a 37°C, por 30 minutos. Para a remoção do excesso de fluorocromo, as lâminas foram lavadas em solução 4xTween por três vezes, dois minutos em cada, a temperatura ambiente. Os cromossomos foram contracolorados com 7 μ L de DAPI com Antifade Vectashield H-1000 (Vector).

As hibridizações foram visualizadas em microscopia de epifluorescência, com filtros apropriados para cada fluorocromo, e capturadas através do software Nis-Elements, no microscópio Nikon H550S.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ayres M, Sampaio MM, Barros RMS, Dias LB, Cunha OR. A karyological study of turtles from the Brazilian Amazon River. *Cytogenetics* 8:401-409. 1969.

Barros AV, Wolski MAV, Nogaroto V, Almeida MC, Moreira-Filho O, Vicari MR. Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? *Gene* 608, 20–27. 2017.

Bickham JW, Carr JL. Taxonomy and Phylogeny of the Higher Categories of Cryptodiran Turtles Based on a Cladistic Analysis of Chromosomal Data. *Copeia*, v. 1983, n. 4, p. 918-932. 1983.

Bull JJ, Legler JM. Karyotypes of side necked turtles (Testudines, Pleurodira). *Can J Zool* 58:828-884. 1980.

Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C. 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. 2010.

Cavalcante MG, Bastos CEMC, Nagamachi CY, Pieczarka JC, Vicari MR, Noronha RCR. Physical mapping of repetitive DNA suggests 2n reduction in Amazon turtles *Podocnemis* (Testudines: Podocnemididae). *PLoS ONE* 13(5): e0197536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197536>. 2018.

Cazaux B, Catalan J, Veyrunes F, Douzery EJP, Britton-Davidian J. Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol Biol*; 11:124. pmid:21569527. 2011.

Fantin C, Giuliano-Caetano L. Cytogenetic characterization of two turtle species: *Trachemys dorbigni* and *Trachemys scripta elegans*. *Caryologia*; 61:3, 253–257. 2014.

Fantin C, Monjeló LAS. Cytogenetic studies in *Podocnemis expansa* and *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemididae), turtles of the Brazilian Amazon. *Caryologia*; 64(2):154–7. 2011.

Farré M, Bosch M, Lopez-Giraldez F, Ponsa M, Ruiz-Herrera A. Assessing the role of tandem repeats in shaping the genomic architecture of great apes. *PLoS One*; 6:e27239. pmid:22076140. 2011.

Ferri V. *Turtles & Tortoises: A Firefly Guide*. Firefly Books. 256p. 2002.

Feschotte C, Pritham EJ. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet*. 41:331–368. 2007.

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

Gunski RJ, Cunha IS, Degrandi TM, Ledesma M, Garnerio ADV. Cytogenetic comparison of *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis*: A case of inversion and duplication involving constitutive heterochromatin. *Genet Mol Biol. Sep*; 36(3): 353–356. 2013.

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647-1649.

2012.

Kohany O, Gentles AJ, Hankus L and Jurka J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: Repbase Submitter and Censor. *BMC Bioinformatics* 25:474. 2006.

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

Martins C, Cabral-De-Mello DC, Valente GT, Mazzuchelli J, Oliveira SG, Pinhal D. *Animal genomes under the focus of cytogenetics.* New Hampshire: Nova Science Publisher. 2011.

Matsubara K, Kuraku S, Tarui H, Nishimura O, Nishida C, Agata K, et al. Intra-genomic GC heterogeneity in sauropsids: evolutionary insights from cDNA mapping and GC3 profiling in snake. *BMC Genomics*;13: 604. 2012.

Montiel EE, Badenhorst D, Lee LS, Literman R, Trifonov V, Valenzuela N. Cytogenetic Insights into the Evolution of Chromosomes and Sex Determination Reveal Striking Homology of Turtle Sex Chromosomes to Amphibian Autosomes. *Cytogenet Genome Res* DOI: 10.1159/000447478. 2016a.

Montiel EE, Badenhorst D, Tamplin J, Burke R, Valenzuela N. Discovery of youngest sex chromosomes reveals first case of convergent co-option of ancestral autosomes in turtles. *Chromosoma* DOI: 10.1007/s00412–016– 0576–7. 2016b.

Noletto RB, Kantek DLZ, Swarça AC, Dias AL, Fenocchio AS, Cestari MM. 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. 2006.

Noronha RCR, Barros LMR, Araújo REF, Marques DF, Nagamachi CY, Martins C, Pieczarka

JC. 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. 2016.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 83:2934-2938. 1986.

Primo CC, Glugoski L, Almeida MC, Zawadzki CH, Moreira-Filho O, Vicari MR, Nogaroto V. Mechanisms of Chromosomal Diversification in Species of Rineloricaria (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). *ZEBRAFISH*, Volume 14, Number 2, Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/zeb.2016.1386. 2017.

Shafter HB. 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. 2009.

Srikulnath K, Nishida C, Matsubara K, Uno Y, Thongpan A, Suputtitada S, et al. Karyotypic evolution in squamate reptiles: comparative gene mapping revealed highly conserved linkage homology between the butterfly lizard (*Leiolepis reevesii rubritaeniata*, Agamidae, Lacertilia) and the Japanese four-striped rat snake (*Elaphe quadrivirgata*, Colubridae, Serpentes). *Chromosome Res*; 17: 975–986. 2009.

Srikulnath K, Uno Y, Nishida C, Matsuda Y. Karyotype evolution in monitor lizards: cross-species chromosome mapping of cDNA reveals highly conserved synteny and gene order in the Toxicofera clade. *Chromosome Res*; 21: 805–819. 2013.

Ventura K, Moreira CN, Moretti R, Yonenag-Yassuda Y, Rodrigues MT. The lowest diploid number in Testudines: Banding patterns, telomeric and 45S rDNA FISH in *Peltocephalus dumerilianus*, $2n = 26$ and $FN = 52$ (Pleurodira, Podocnemididae). *Genet. Mol. Biol.* vol.37

no.1 Ribeirão Preto. ISSN 1415-4757. 2014.

Viana PF, Ribeiro LB, Lima T, Carvalho VT, Vogt RC, Gross MC, Feldberg E. An optimized protocol for obtaining mitotic chromosomes from cultured reptilian lymphocytes. *Nucleus*. DOI 10.1007/s13237-016-0174-3. 2016.

Vicari MR, Nogaroto V, Noletto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho O, Artoni RF. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *J Fish Biol* 76:1094-1116. 2010.

Schneider, L.; Ferrara, C.; Vogt, R.C. & Santos-Júnior, L.B. 2009a. Geographic Distribution. *Rhinoclemmys punctularia*. *Herpetological Review*, 40(2): 236.

Vogt, R.C. 2008. *Tartarugas da Amazônia*. Lima. 104p.

Pezzuti, J.C.B.; Wariss, M. F.; Ramos, I. S.; Baeta, A.P.F. & Felix-Silva, D. 2008a. Estudo ambiental simplificado sobre os impactos da implantação da balsa de transbordo de minério de ferro sobre os quelônios na Ilha dos Guarás, Curuçá, Pará. 50p.

Pezzuti B, J. C. B; Wariss, M. F.; Ramos, I. S.; Baeta, A.P.F. & Felix-Silva, D. 2008b. Relatório de impacto ambiental do aproveitamento hidroenergético de Belo Monte sobre quelônios e jacarés.

Félix-Silva, D.; Rebêlo, G.H.; Oliveira, V.A. & Pezzuti, J.C.B. 2008b. Ecologia e conservação de quelônios no Reservatório da Usina Hidrelétrica de Tucuruí. Relatório Técnico. MPEG/ELN. Belém. 120p.

Ernst, C.H. & Barbour, R.W. 1989. *Turtles of the World*. Smithsonian Institution Press. 313p.

Rueda-Almonacid, J.V.; Carr, J.L.; Mittermeier, R.A.; Rodriguez-Mahecha, J.V.; Mast, R.B.; Vogt, R.C.; Rhodin, A.G.J.; Ossa-Velasquez, J.; Rueda, J.N. & Mittermeier, C.G. 2007. Las tortugas e los crocodilianos de los países andinos del Trópico. *Conservación Internacional*.

537p

6. RESULTADOS

Capítulo 1: MOLECULAR CYTOGENETICS CHARACTERIZATION OF *RHINOCLEMMYS PUNCTULARIA* (TESTUDINES, GEOEMYDIDAE) AND DESCRIPTION OF A GYPSY-H3 ASSOCIATION IN ITS GENOME

Manoella Gemaque Cavalcante¹, Luciano Farias Souza¹, Marcelo Ricardo Vicari², Carlos Eduardo Matos de Bastos¹, Jaime Viana de Sousa³, Cleusa Yoshiko Nagamachi¹, Julio Cesar Pieczarka¹, Cesar Martins⁴, Renata Coelho Rodrigues Noronha¹

1 Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Laboratório de Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil

2 Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

3 Universidade Federal Rural da Amazônia (Campus Capanema), Brazil

4 Departamento de Morfologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil

***Artigo publicado na Revista Gene.**

RESUMO

A grande variação encontrada no tamanho dos genomas eucarióticos está amplamente relacionada ao acúmulo de sequências repetitivas. Estudos mostram que essas sequências podem passar por um processo evolutivo (cooptação molecular) e adquirir novas funções genômicas. Estudos citogenéticos revelam uma ampla variação cariotípica entre quelônios (ordem Testudines) ($2n = 26-68$), atribuída principalmente ao número de microcromossomos. Estudos sobre DNAs repetitivos têm o potencial de fornecer dados importantes sobre a dinâmica dessas sequências e como elas influenciam a organização do genoma. Aqui, revelamos os primeiros dados de mapeamento *in situ* do rDNA 45S, genes de Histona H3 e sequências teloméricas, para uma espécie do gênero *Rhinoclemmys*, *R. punctularia*. O cariótipo descrito aqui para *R. punctularia* é diferente dos reportados anteriores para o complemento diploide desta espécie, com diferenças provavelmente atribuíveis a fissões cêntricas e inversões pericêntricas ou reposicionamento do centrômero. O rDNA 45S está presente em um único par de cromossomos (como em outros quelônios), as sequências teloméricas estão em posição terminal em todos os cromossomos, e os genes de Histona H3 estão dispersos em baixo número de cópias, com agrupamentos em regiões pericentroméricas de três pares cromossômicos. Relatamos também a inserção do retrotransposon Gypsy na sequência dos genes de histona H3 de *R. punctularia*, o qual faz parte da fase de leitura aberta da sequência de histona. A modelagem comparativa revelou um padrão funcional para a proteína, sugerindo que o retroelemento Gypsy pode ter sido recrutado para novas funções no genoma de *R. punctularia*.

Palavras-chave: Genes de Histonas, Retrotransposon LTR, rDNA 45S, Reorganização Cariotípica, Quelônios.

INTRODUÇÃO

A grande variação encontrada no tamanho dos genomas eucarióticos está amplamente relacionada ao acúmulo de sequências repetitivas de DNA (Petrov, 2001; Kidwell, 2002). Embora essas sequências fossem tradicionalmente descartadas como "parasitas moleculares" (Orgel e Crick, 1980), o avanço do sequenciamento do DNA, das técnicas bioquímicas, genômicas e epigenéticas, revelaram que esses elementos são componentes biologicamente importantes dos genomas eucarióticos, e suas atividades podem influenciar significativamente na estrutura e função do próprio genoma (Richardson et al., 2015; Guichard et al., 2018).

Retrotransposons são sequências repetitivas de DNA que têm a capacidade de se copiar e mover as novas cópias para outras regiões genômicas. O genoma pode usar diferentes estratégias para controlar o número de cópias desses elementos, como permitir preferencialmente a inserção dessas sequências repetitivas em regiões pobres em genes, como heterocromatina ou telômeros (Okazaki et al., 1995; Takahashi et al., 1997), usando proteínas reparadores do DNA para desestabilizar as novas cópias durante sua transcrição reversa (Bryk et al., 2001; Gasior et al., 2008) e/ou silenciar retrotransposons via metilação de DNA, modificações de histonas ou regulação pós-transcricional (Bourc'His e Bestor, 2004; Yin et al., 2018). Porém, apesar dos diversos mecanismos que protegem o genoma, a ação dos retrotransposons pode causar eventos de recombinação entre os retroelementos; isso pode gerar quebras e rearranjos genômicos, como recombinação homóloga não alélica (Servant e Deininger, 2015; Yin et al., 2018), ou interromper sequências de codificação de genes endógenos, alterando sua expressão (Kemp e Longworth, 2015).

Estudos recentes sobre a dinâmica evolutiva de retroelementos sugeriram fortemente que eles geralmente são cooptados para a regulação de genes do hospedeiro e, assim, impactam o funcionamento e a evolução dos genomas (Göke e Ng, 2016; Chuong et al., 2017; McCullers e Steiniger, 2017; Guichard et al., 2018). Foi proposto que a maioria dos retrotransposons perderam sua capacidade de transposição e os fragmentos restantes contêm componentes importantes, como sequências regulatórias cis, locais de início da transcrição e/ou genes transcritíveis inteiros; se verdadeiro, isso indicaria que os retroelementos podem contribuir tanto para a regulação quanto para a transcrição no genoma eucariótico (Göke e Ng, 2016). No entanto, ainda não entendemos totalmente como os retrotransposons coevoluem com o genoma do hospedeiro para otimizar a sobrevivência de ambos, e as funções e mecanismos dos

retrotransposons não foram totalmente elucidados (Yin et al., 2018).

Testudines é considerada uma das ordens mais antigas entre os répteis existentes. Os quelônios são organizados em 13 famílias desta ordem; compreendem aproximadamente 300 espécies e podem ser subdivididos em duas subordens (Cryptodira e Pleurodira) (Pough et al., 2013). Estudos citogenéticos revelaram que existe uma ampla variação cariotípica entre os quelônios ($2n = 26-68$); esta diversidade tem sido amplamente atribuída ao número variável de microcromossomos, com múltiplos rearranjos cromossômicos (como fusões entre microcromossomos) sendo responsáveis pelos números diploides mais baixos (Gunki et al., 2013; Montiel et al., 2016; Cavalcante et al., 2018).

O avanço dos estudos citogenéticos ajudou a melhorar nossa compreensão dos mecanismos evolutivos envolvidos na diversificação cariotípica de quelônios. O DNA ribossômico 45S (rDNA) é encontrado em um único par de cromossomos em todas as espécies de quelônios investigados até a presente data; naqueles com $2n$ alto, o rDNA 45S é observado em um par de microcromossomos (Noletto et al., 2006; Fantin e Giuliano-Caetano, 2014; Montiel et al., 2016), enquanto naqueles com $2n$ baixo, com poucos ou nenhum microcromossomo, o ribossomal é reportado na região pericentromérica do primeiro par de macrocromossomos (Montiel et al., 2016; Noronha et al., 2016; Cavalcante et al., 2018). Sítios teloméricos intersticiais foram detectados em quelônios com baixo $2n$ e sem microcromossomos, potencialmente indicando os remanescentes de eventos de fusão microcromossômica (Montiel et al., 2016; Cavalcante et al., 2018). Até o presente momento, os genes que codificam as Histonas H1 e H3 foram mapeados por Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) apenas em duas tartarugas do gênero *Podocnemis*. Os genes H1 foram encontrados associados ao rDNA 45S, enquanto que os genes H3 foram identificados em vários pares cromossômicos, provavelmente refletindo recombinação não homóloga e/ou dispersão mediada por elementos transponíveis (Cavalcante et al., 2018).

O gênero *Rhinoclemmys* (Cryptodira, Geoemydidae) é composto por nove espécies e duas subespécies, todas analisadas apenas por citogenética clássica até o momento, com exceção de *R. annulata* e *R. nasuta* (Tabela 1). Este é o único grupo da família Geoemydidae distribuído na América Central e do Sul (Le e McCord, 2008). Os membros investigados de *Rhinoclemmys* têm $2n=52$ e muitos microcromossomos (Killebrew, 1977; Carr e Bickham, 1986; Vahos, 1998), com exceção de *R. punctularia*, que tem dois pares cromossômicos

adicionais ($2n=56$) (Barros et al., 1975; Bickham e Baker, 1976a,b; Viana et al., 2016). O presente estudo descreve um novo cariótipo para *R. punctularia* e os primeiros dados sobre o mapeamento físico por Hibridização *in situ* Fluorescência (FISH) de genes rDNA 45S, genes de histona H3 e seqüências teloméricas. Além disso, demonstramos a associação entre os genes da histona H3 e o retrotransposon Gypsy.

Table 1

Diploid numbers and karyotypic formulas for the species of genus *Rhinoclemmys*. Abbreviations: m/sm, metacentric and submetacentric chromosomes; t/st, telocentric and subtelocentric chromosomes; a, acrocentric chromosomes; micro, microchromosomes.

Species of genus <i>Rhinoclemmys</i>	2n	Karyotypic Formula	FN	References
<i>R. areolata</i>	52	18 m/sm + 10st/t + 24micro	Not available	Carr and Bickham (1986)
<i>R. diademata</i>	52	16 m/sm + 16 t/st + 20micro	Not available	Vahos (1998)
<i>R. funerea</i>	52	16 m/sm + 10 t/st + 26micro	Not available	Carr and Bickham (1986)
<i>R. melanosterna</i>	52	16 m/sm + 10 t/st + 26micro	Not available	Killebrew (1977)
<i>R. punctularia</i>	56	16 m/sm + 6a + 34micro	72	Barros et al. (1975)
		12m/sm + 10 t/st + 34micro	Not available	Bickham and Baker (1976a,b)
		16m/sm + 10 t/st + 30micro	Not available	Carr and Bickham (1986)
		14m/sm + 4st + 10a + 28micro	74	Present study
<i>R. pulcherrima</i>	52	12 m/sm + 10 t/st + 30micro	Not available	Bickham and Baker (1976a)
<i>R. p. incisa</i>	52	18 m/sm + 10 t/st + 24micro	Not available	Carr and Bickham (1986)
<i>R. p. manni</i>	52	18 m/sm + 10 t/st + 24micro	Not available	Carr and Bickham (1986)
<i>R. rubida</i>	52	18 m/sm + 10 t/st + 24micro	Not available	Carr and Bickham (1986)

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes e aprovação

Os espécimes de *Rhinoclemmys punctularia* analisados no presente estudo foram mantidos no Parque Zoobotânico Adhemar Monteiro, Capitão Poço, Pará, Brasil. Foram utilizados cinco espécimes, sendo três machos e duas fêmeas. Este estudo foi conduzido estritamente de acordo com as recomendações éticas para o uso e manejo de quelônios em pesquisa, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal Experimental (licença de número 68-2015) e Sistema de Informação e Autorização sobre Biodiversidade (SISBIO; licença número 42642-6).

Preparação cromossômica e citogenética clássica

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir da cultura de células de linfócitos dos espécimes, conforme descrito por Viana et al. (2016). Os cromossomos foram corados com

Giernsa e organizados pelo tamanho e posição do centrômero, caracterizados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st), acrocêntricos (a) ou microcromossomo (micro), conforme descrito por Guerra (1986), com modificações. Para a caracterização das regiões organizadoras do nucléolo (NOR), foi realizada a coloração com AgNO₃ de acordo com Howell e Black (1980).

Extração de DNA e síntese das sondas

O DNA genômico foi purificado dos tecidos musculares e amostras de sangue usando um kit GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich). Genes que codificam Histona H3 foram amplificados usando *primers* (Forward) 5-ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC-3 e (Reverse) 5-ATA TCC TTV GGC ATV ATV GTG AC-3, que foram desenhados por Colgan et al. (1998). A mistura de reação consistia em 80ng de DNA genômico, 0,2 μM de cada iniciador, 0,16 mM de dNTPs, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ e 1 × tampão de reação (200 mM Tris, pH 8,4, 500 mM KCl). O programa de amplificação consistiu em 4 min a 95 ° C seguido por 30 ciclos de 1 min a 95 ° C, 1 min a 60 ° C e 2 min a 74 ° C, e uma extensão final de 5 min a 74 ° C.

A sequência telomérica geral de vertebrados (TTAGGG)_n foi obtida conforme descrito por Ijdo et al. (1991). Para a síntese da sonda do rDNA 45S, usamos o plasmídeo pTa71, que contém as sequências dos genes 5.8S, 18S e 28S e seus respectivos espaçadores intergênicos de *Triticum aestivum* (Gerlach e Bedbrook, 1979). As sondas foram marcadas por *nick-translation* com biotina 14-dATP ou digoxigenina 16-dUPT usando o BioNick Labeling System (Invitrogen) e um kit DIG-Nick (Roche Applied Science), respectivamente.

Sequenciamento e análise de H3

Os produtos de PCR foram purificados com o kit GenElute PCR Clean-Up (Sigma-Aldrich) e sequenciados com analisador gênico ABI 3500 (Applied Biosystems). As sequências foram analisadas e editadas por meio do software Geneious 7.1.3 (Kearse et al., 2012). As identidades das sequências analisadas foram confirmadas usando a ferramenta CENSOR para sequências repetitivas (Girinst) (Kohany et al., 2006) e BLASTn (ferramenta básica de busca

de alinhamento local para nucleotídeos) do National Center for Biotechnology Information (NCBI). As sequências H3 foram pesquisadas por fases de leitura aberta (ORFs) e submetidas à tradução de sequência de aminoácidos usando o software Geneious, e as sequências traduzidas foram pesquisadas por similaridade de proteínas e domínios conservados putativos usando BLASTp ou (quando trabalhando diretamente a partir da sequência de nucleotídeos) BLASTx.

Hibridização in situ Fluorescente

As hibridizações foram realizadas conforme descrito por Pinkel et al. (1986) com algumas modificações. Os sinais foram detectados com avidina-CY3 (Sigma-Aldrich) e antidigoxigenina-FITC (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contrastados com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 0,2 μ g mL⁻¹) em Vectashield H-100, e analisados em microscópio de epifluorescência (H550S; Nikon).

Modelagem por homologia

A modelagem por homologia permite que a estrutura terciária de uma proteína seja construída com base na similaridade de sua estrutura primária. Essa técnica é baseada na ideia de que as estruturas 3D de proteínas homólogas são conservadas durante o processo evolutivo, principalmente próximo aos resíduos funcionais, uma vez que a preservação estrutural é fundamental para a manutenção e desempenho de funções específicas (Höltje et al., 2003). No presente estudo, a estrutura primária da sequência H3 (histona H3.2 de *Chelonia Mydas*) foi obtida no banco de dados do NCBI. Selecionamos os códigos PDB mmdb_2HIO.pdb, mmdb_2IO5.pdb e mmdb_3LEL.pdb como modelos para construir os modelos 3D; cada uma dessas escolhas tinha cobertura máxima, pontuação de identidade alta e um baixo valor eletrônico na análise da ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico (BLAST) (Geer et al., 2009). A identidade de sequência entre os três modelos e a sequência H3 alvo estava acima de 30%, o que é uma margem aceitável para modelagem de proteínas homólogas (Sander e Schneider, 1991). MODELLER foi usado para realizar a modelagem da estrutura de homologia. Este programa calcula automaticamente um modelo contendo todos os átomos não-hidrogênio e pode realizar tarefas auxiliares adicionais, incluindo atribuição de dobra e alinhamento simultâneo de duas sequências de proteínas estruturais (Webb e Sali, 2014).

RESULTADOS

Rhinoclemmys punctularia apresentou $2n=56$ e número fundamental (NF) igual a 74, com a seguinte fórmula cariotípica: oito cromossomos metacêntricos, seis cromossomos submetacêntricos, quatro cromossomos subtelocêntricos, 10 cromossomos acrocêntricos e 28 microcromossomos (14 m/sm + 4st + 10a + 28 micros). Não encontramos pares de cromossomos heteromórficos em machos ou fêmeas de *R. punctularia* aqui analisados (Fig. 1a).

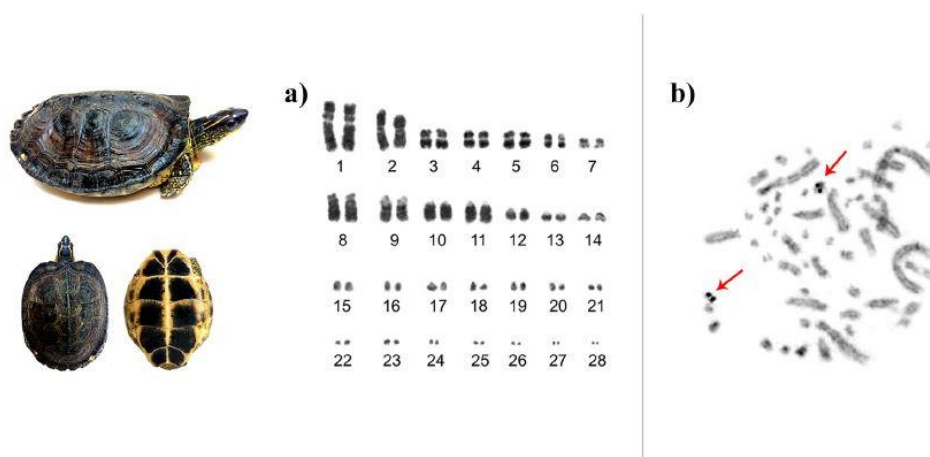


Fig. 1. Karyotype of *Rhinoclemmys punctularia*. In a) the chromosomes were stained with Giemsa and organized by size and centromere position. The diploid number is 56, the fundamental number is 74, and the karyotypic formula is 14 m/sm + 4st + 10a + 28micro; b) Ag-NOR staining on metaphase chromosomes of *R. punctularia* after Giemsa staining (arrows show the NOR-bearing microchromosomes).

A impregnação com AgNO₃ revelou apenas um par de regiões organizadoras do nucléolo ativas (Ag-NOR), localizada em um par de microcromossomos (par 15) (Fig. 1b). FISH com sonda de rDNA 45S produziu sinais em um par de microcromossomos (par 15) (Fig. 2a). Sinais teloméricos foram observados nas regiões distais de todos os pares cromossômicos (Fig. 2a). Os genes da histona H3 foram observados de forma dispersa por todo o cariótipo de *R. punctularia*, com acumulações nas regiões pericentroméricas dos pares de cromossomos 5, 6 e 10 (Fig. 2b).

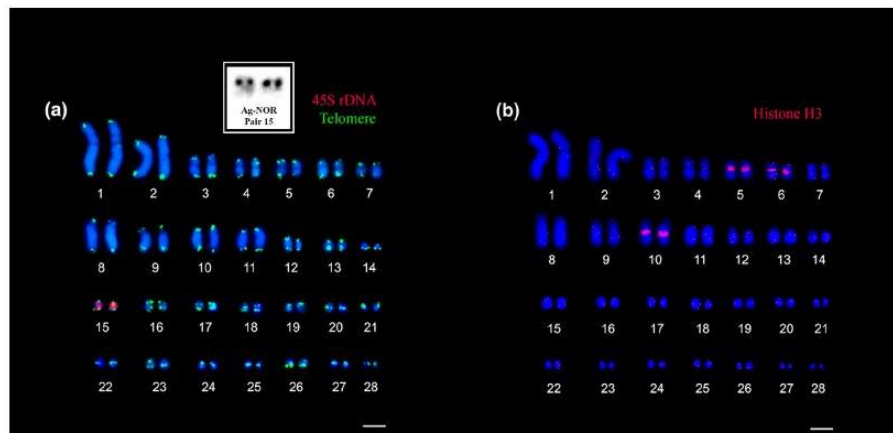


Fig. 2. Mapping of 45S rDNA, telomeric sequences and histone H3 genes in the *Rhinoclemmys punctularia* karyotype. In a) the 45S rDNA (red) locates to a pair of microchromosomes (Ag-NOR in box), while telomeric signals (green) are seen in the distal regions of all chromosomal pairs; b) clusters of histone H3 genes (red) are seen in the pericentromeric regions of three chromosome pairs (pairs 5, 6, and 10), while additional signals are scattered throughout the karyotype. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

O alinhamento da sequência H3 obtida a partir do genoma de *Rhinoclemmys punctularia* revelou alta similaridade com a variante H3.2-like da tartaruga *Chelonia mydas* (Histona H3.2-like LOC102940196, mRNA), com os nucleotídeos 94 a 410 da sequência H3 de *R. punctularia* mostrando 92% de similaridade (286/311). Enquanto isso, os nucleotídeos 102-158 da sequência H3 de *R. punctularia* apresentaram 82% de similaridade com o retrotransposon LTR Gypsy-40_BRa-I de *Brassica* (Fig. 3). A análise da sequência de aminoácidos revelou que havia 98% de similaridade com uma sequência parcial de histona H3 de *Ylistrum japonicum japonicum* (Sequência ID: AEK26337.1) e a região semelhante ao Gypsy continha o quadro de leitura aberto da sequência de histona.

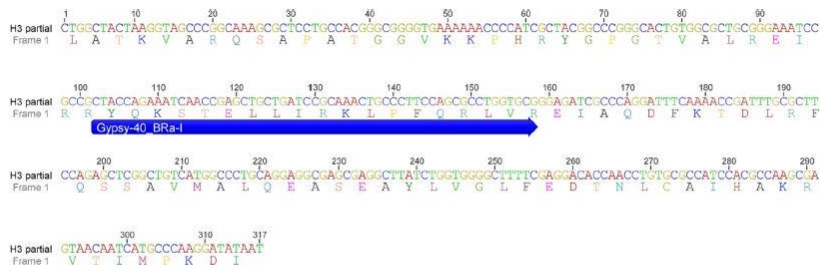


Fig. 3. Analysis of the partial sequence of H3 from *Rhinoclemmys punctularia*. Highlight indicates the sequence spanning nucleotides 102–158, which exhibits 82% similarity to the retrotransposon LTR Gypsy-40_BRa-1 of *Brassica*. In frame 1, the line shows the amino acid sequence, which is 97% similar to a partial sequence of histone H3 from *Ylistrum japonicum japonicum*.

Usando a sequência de aminoácidos de H3 obtida no presente estudo, realizamos modelagem comparativa usando H3 da tartaruga verde *Chelonia mydas* como sequência de referência. Apesar da inserção do retroelemento, observamos um padrão funcional para a proteína (fig. 4).

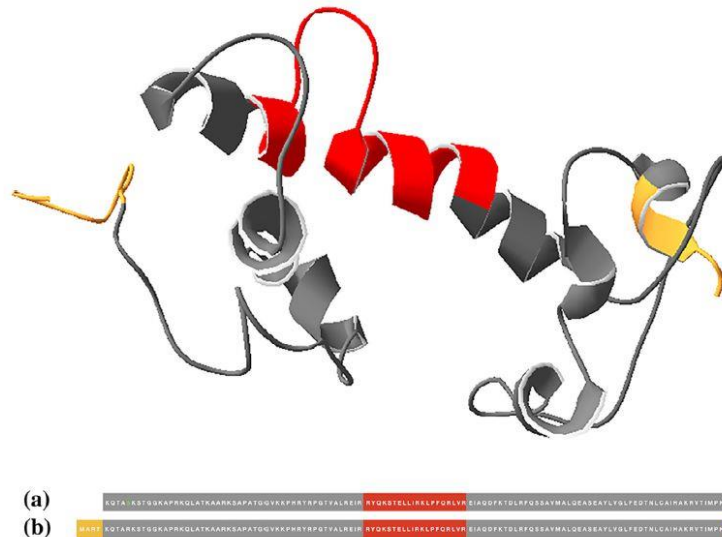


Fig. 4. Comparative modeling of Histone H3. For comparative modeling, the primary structures generated for the H3.2 sequences of the turtle, *Chelonia mydas* (NCBI database, PDB mmdb_2H10.pdb, mmdb_2I05.pdb, and mmdb_3LEL.pdb) were used. Yellow indicates amino acid sequence fragments of the reference genome (*C. mydas*) that were not amplified from *Rhinoclemmys punctularia*. Gray represents the extensive homology between the H3.2 sequences of the turtles, *C. mydas* and *R. punctularia*. Red indicates the fragment which represents the Gypsy retrotransposon inserted in histone, demonstrating high similarity including the reference genome (*C. mydas*). Our findings indicate that the insertion of the retroelement does not appear to alter the function-related structures of the protein. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

DISCUSSÃO

O número diploide aqui observado para *R. punctularia* ($2n=56$) é consistente com

aqueles encontrados em estudos anteriores sobre a espécie (Barros et al., 1975; Carr e Bickham, 1986; Bickham e Baker, 1976a,b), mas diferenças são observados no NF e na fórmula cariotípica (ver Tabela 1). A aparente disparidade no presente NF pode refletir inversões pericêntricas e/ou a ativação de novos centrômeros evolutivos (também chamados de centrômeros reposicionados), que se movem para uma nova posição ao longo do cromossomo sem qualquer inversão ou outros rearranjos estruturais (Rocchi et al., 2012).

A variação de $2n$ observada no gênero *Rhinoclemmys* ($2n=52-56$) é refletida por um aumento no número de pares de cromossomos acrocêntricos em *R. punctularia*, sugerindo que esta espécie pode ter sofrido reorganização cariotípica durante o processo evolutivo. Análises filogenéticas usando genes nucleares e mitocondriais mostram *R. punctularia* ($2n=56$) em uma posição filogenética derivada em relação às outras espécies descritas do gênero *Rhinoclemmys* (Guillon et al., 2012), que têm $2n=52$ cromossomos (Killebrew, 1977; Carr e Bickham, 1986; Vahos, 1998). Nesse contexto, sugerimos que fissões cêntricas e subseqüente diferenciação cariotípica podem ser responsáveis pelo aumento de $2n$ observado em *R. punctularia* em comparação com os outros membros do gênero *Rhinoclemmys*.

Nossas hibridizações *in situ* com sondas teloméricas (TTAGGG) n não identificaram nenhum sítio intersticial dessas sequências no genoma de *R. punctularia*. Isso é consistente com a expectativa para quelônios com alto $2n$ (Montiel et al., 2016), que geralmente exibem acumulações teloméricas em associação com regiões heterocromáticas em poucos ou nenhum par de cromossomos (como observado neste estudo). Em contraste, os quelônios com $2n$ baixo e poucos ou nenhum microcromossomo têm múltiplos aglomerados teloméricos intersticiais; acredita-se que estes representem remanescentes das fusões microcromossômicas que reduziram o número diploide nessas espécies (Cavalcante et al., 2018).

O mapeamento *in situ* revelou que a localização do rDNA 45S varia entre os quelônios. Nossos resultados são consistentes com os obtidos para outras espécies de quelônios com alto $2n$, em que os sinais de rDNA 45S correspondem a um único par de microcromossomos (Noletto et al., 2006; Fantin e Giuliano-Caetano, 2014; Montiel et al., 2016); nossos resultados de Ag-NOR confirmam esse padrão, o que indica que a espécie não possui sítios de NORs adicionais. Em quelônios com $2n$ baixo, os sinais de rDNA 45S são vistos na região pericentromérica do maior par de macrocromossomos (Montiel et al., 2016; Noronha et al., 2016; Cavalcante et al., 2018). Cavalcante et al. (2018) destacou que o rDNA 45S está co-localizado com sequências

teloméricas intersticiais no primeiro par de macrocromossomos nas tartarugas *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* ($2n=28$), propondo que, durante a evolução do cariótipo daquelas espécies, as quais representam o segundo menor número diploide entre os quelônios, o 45S mudou de micro para macrocromossomos através de eventos de fusão. Porém, embora ocorra essa variação na localização do rDNA 45S entre os quelônios investigados, o ribossomal apresenta um caráter conservado quanto ao número de locus gênicos (apenas um par de cromossomos para todas as espécies de quelônios investigadas até o momento). Essa condição pode ser explicada por uma tendência geral dos genomas de manter um baixo número de loci de rDNA (Sochorová et al., 2018), e isso provavelmente reflete uma condição cromossômica plesiomórfica em Testudines.

Nossas análises de sequência de nucleotídeos revelaram que os nucleotídeos 102-158 da sequência H3 de *R. punctularia* exibiram uma alta similaridade com o retrotransposons Gypsy. Além disso, descobrimos que este elemento fazia parte do quadro de leitura de H3, mas não introduziu um códon de parada na sequência. A inserção de retrotransposons Gypsy em genes de histonas (H3 e H4) foi relatada anteriormente em peixes do gênero *Characidium*, onde os autores propuseram que eventos de transposição mediados por retroelementos poderiam estar envolvidos na disseminação de sequências de histonas ao longo dos genomas das espécies investigadas (Pucci et al., 2018). No entanto, sugerimos que a dispersão de H3 observada no cariótipo de *R. punctularia* pode sinalizar o próprio Gypsy, pois um segmento do gene da histona H3 de *R. punctularia* possui alta similaridade com o retroelemento.

O ciclo de um elemento transponível (*Transposable Element* - TE) consiste na invasão do genoma do hospedeiro, onde o TE aumenta o seu número de cópias, seguido de uma inativação e, por fim, eliminação (Kidwell e Lisch, 2001). Portanto, em geral, os TEs estão presentes como cópias não autônomas nos genomas, gerados em um processo de degradação (Fernández-Medina et al., 2012). No entanto, essas sequências mutadas podem não apenas se comportar de forma "neutra" nos genomas; estudos mostram que essas sequências, após a inativação, podem passar por um processo evolutivo (cooptação molecular), onde perdem suas características de TE e adquirem novas funções genômicas, o que pode até favorecer o hospedeiro (Schemberger et al., 2016). Nesse contexto, é provável que o retroelemento Gypsy tenha sido recrutado para novas funções no genoma de *R. punctularia*.

Nossa modelagem por homologia baseada na sequência de aminoácidos do gene de

histona H3 de *R. punctularia* em relação ao da tartaruga verde, *Chelonia mydas*, sugere que as duas espécies têm semelhanças estruturais e funcionais, com regiões internas conservadas. A partir disso, inferimos que, apesar da inserção do retrotransposon Gypsy, a proteína H3 permanece funcional em *R. punctularia*. Esses dados apóiam nossa hipótese de cooptação molecular do Gypsy. O gene da histona H3 da tartaruga *Chelonia mydas* (usado no presente estudo como modelo para homologia de sequência de aminoácidos) também parece ter um inserto de retroelemento Gypsy, pois esta espécie possui a mesma sequência de aminoácidos da região de inserção quando comparada a *R. punctularia*. Essas inserções não parecem interferir no padrão funcional de proteínas e abrem perspectivas para investigações de inserções de elementos transponíveis em genes de histonas em outras espécies de quelônios.

Foi proposto que os retrotransposons LTR podem contribuir com material genético para a evolução de funções multigênicas, por exemplo, fornecendo diferentes tipos de regiões codificantes que estão "prontas para uso". Na verdade, a estrutura de leitura aberta para o domínio gag do retrotransposon Gypsy é uma região doadora principal para novas funções genômicas (Kim et al., 2005; Merenciano et al., 2016; McCullers e Steiniger, 2017). A maior fração de DNA repetitivo é fornecida por retrotransposons. Quando perdem a capacidade de transposição, os fragmentos restantes contêm os principais ingredientes das redes regulatórias: sequências cisregulatórias, locais de início da transcrição e até genes que podem ser transcritos. Estudos sugerem que eles podem contribuir tanto para a regulação quanto para a transcrição (Göke e Ng, 2016). No futuro, novos avanços na análise genômica nos permitirão entender como esses retroelementos coevoluem e contribuem para suas sequências de hospedeiros.

CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos dados permitem inferir que: (i) a diferenciação cromossômica de *R. punctularia* pode sinalizar inversões pericêntricas e/ou reposicionamento centromérico; (ii) a variação $2n$ no gênero *Rhinoclemmys* ($2n=52-56$) é refletida por um aumento no número de pares de cromossomos acrocêntricos em *R. punctularia* e isso pode sugerir eventos de reorganização cariotípica, como fissões cêntricas; (iii) o rDNA 45S apresenta um caráter conservado para quelônios, quanto ao número de locus gênicos (apenas um único par cromossômico), e isso provavelmente indica uma condição cromossômica plesiomórfica em

Testudines; (iv) a análise da sequência H3 demonstra que a inserção de um retroelemento Gypsy não alterou a funcionalidade da proteína H3 em *R. punctularia*, e é provável que o retrotransposon tenha sido recrutado para novas funções no genoma de *R. punctularia* (molecular cooptação).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barros, R.M., Sampaio, M.M., Assis, M.F., Ayres, M., Cunha, O.R., 1975. A karyological study of *Geomyda punctularia punctularia* (Daudin, 1802) from the Amazon region of Brazil (Chelonia, Emydidae). *Acta Amazônica* 5 (1), 95-96. <https://doi.org/10.1590/180943921975051095>.
- Bickham, J.W., Baker, R.J., 1976a. Chromosome homology and evolution of Emydid turtles. *Chromosoma* 54, 201-219. <https://doi.org/10.1007/bf00293451>.
- Bickham, J.W., Baker, R.J., 1976b. Karyotypes of some Neotropical turtles. *Copeia* 703-708. <https://doi.org/10.2307/1443452>.
- Bourc' His, D., Bestor, T.H., 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431, 96-99. <https://doi.org/10.1038/nature02886>.
- Bryk, M., Banerjee, M., Conte, D., Curcio, M.J., 2001. The Sgs1 helicase of *Saccharomyces cerevisiae* inhibits retrotransposition of Ty1 multimeric arrays. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5374-5388. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.16.5374-5388.2001>.
- Carr, J.L., Bickham, J.W., 1986. Phylogenetic implications of karyotypic variation in the Batagurinae (Testudines: Emydidae). *Genetica* 70, 89-106. <https://doi.org/10.1007/BF00123580>.
- Cavalcante, M.G., Bastos, C.E.M.C., Nagamachi, C.Y., Pieczarka, J.C., Vicari, M.R., Noronha, R.C.R., 2018. Physical mapping of repetitive DNA suggests 2n reduction in Amazon turtles *Podocnemis* (Testudines: Podocnemididae). *PLoS One* 13 (5), e0197536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197536>.

Chuong, E.B., Elde, N.C., Feschotte, C., 2017. Regulatory activities of transposable elements: from conflicts to benefits. *Nat. Rev. Genet.* 2, 71-86. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.139>.

Colgan, D.J., McLauchlan, A., Wilson, G.D.F., Livingston, S.P., Edgecombe, G.D., Macaranas, J., et al., 1998. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aust. J. Zool.* 46 (5), 419. <https://doi.org/10.1071/zo98048>.

Fantin, C., Giuliano-Caetano, L., 2014. Cytogenetic characterization of two turtle species: *Trachemys dorbigni* and *Trachemys scripta elegans*. *Caryologia* 61 (3), 253-257. <https://doi.org/10.1080/00087114.2008.10589637>.

Fernández-Medina, R.D., Ribeiro, J.M.C., Carareto, C.M.A., Velasque, L., Struchiner, C.J., 2012. Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics* 13, 272. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-272>.

Gasior, S.L., Roy-Engel, A.M., Deininger, P.L., 2008. ERCC1/XPF limits L1 retrotransposition. *DNA Repair (Amst.)* 7, 983-989. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.02.006>.

Geer, L.Y., Marchler-Bauer, A., Geer, R.C., Han, L., He, J., He, S., Liu, C., Shi, W., Bryant, S.H., 2009. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res.* 2010 38 (Database issue), D492-D496 PMID: 19854944.

Gerlach, W.L., Bedbrook, J.R., 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* 7, 1885-1969. <https://doi.org/10.1093/nar/7.7.1869>.

Göke, J., Ng, H.H., 2016. CTRL+INSERT: retrotransposons and their contribution to regulation and innovation of the transcriptome. *EMBO Rep.* 17 (8), 1131-1144. <https://doi.org/10.15252/embr.201642743>.

Guerra, M.S., 1986. Reviewing the chromosome Nomenclature of Levan et al. *Brazil. J. Genetics* IX (4), 741–743. <https://doi.org/10.1590/S0100-84551997000400001>.

Guichard, E., Peona, V., Tagliazucchi, G.M., Abitante, L., Jagoda, E., Musella, M., Ricci, M., Rubio-Roldán, A., Sarno, S., Luiselli, D., Pettener, D., Taccioli, C., Pagani, L., Garcia-Perez, J.L., Boattini, A., 2018. Impact of non-LTR retrotransposons in the differentiation and evolution of anatomically modern humans. *Mobile DNA*. <https://doi.org/10.1186/s13100-018-0133-4>.

Guillon, J.-M., Guéry, L., Hulin, V., Girondot, M., 2012. A large phylogeny of turtles (Testudines) using molecular data. *Contrib. Zool.* 81 (3), 147–158. <https://doi.org/10.1163/18759866-08103002>.

Gunski, R.J., Cunha, I.S., Degrandi, T.M., Ledesma, M., Garnerio, A.D.V., 2013. Cytogenetic comparison of *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis*: a case of inversion and duplication involving constitutive heterochromatin. *Genet. Mol. Biol.* 36 (3), 353–356. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013005000029>.

Höltje, H.D., Sippl, W., Rognan, D., Folkers, G., 2003. *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications. Introduction to Comparative Protein Modeling*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 310.

Howell, W.M., Black, D.A., 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions

with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36, 1014–1015. <https://doi.org/10.1007/BF01953855>.

Ijdo, J.W., Wells, R.A., Baldini, A., Reeders, S.T., 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res.* 19 (17), 4780. <https://doi.org/10.1093/nar/19.17.4780>.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Stur-Rock, S., et al., 2012. Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.

Kemp, J.R., Longworth, M.S., 2015. Crossing the LINE toward genomic instability: LINE-1 retrotransposition in cancer. *Front. Chem.* <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00068>.

Kidwell, M.G., Lisch, D.R., 2001. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution* 55, 1–24. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb01268.x>.

Kidwell, M.G., 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115, 49–63. <https://doi.org/10.1023/A:1016072014259>.

Killebrew, F.C., 1977. Mitotic chromosomes of turtles IV. The Emydidae. *Texas J. Sci.* 29, 245–253.

Kim, M.K., Claiborn, K.C., Levin, H.L., 2005. The long terminal repeat-containing retrotransposon Tf1 possesses amino acids in Gag that regulate nuclear localization and particle formation. *J. Virol.* 79, 9540–9555. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.9540-9555.2005>.

Kohany, O., Gentles, A.J., Hankus, L., Jurka, J., 2006. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: Repbase submitter and censor. *BMC Bioinf.* 25, 474. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-474>.

Le, M., McCord, W., 2008. Phylogenetic relationships and biogeographical history of the genus *Rhinoclemmys* Fitzinger, 1835 and the monophyly of the turtle family *Geoemydidae* (Testudines: Testudinoidea). *Zool. J. Linn. Soc.* 153 (4), 751–767.

<https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2008.00413.x>.

McCullers, T.J., Steiniger, M., 2017. Transposable elements in *Drosophila*. *Mob. Genet. Elem.* 7 (3), 1–18. <https://doi.org/10.1080/2159256X.2017.1318201>.

Merenciano, M., Ullastres, A., de Cara, M.A.R., Barrón, M.G., González, J., 2016. Multiple independent retroelement insertions in the promoter of a stress response gene have variable molecular and functional effects in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 12, e1006249. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006249>. PMID: 27517860.

Montiel, E.E., Badenhorst, D., Lee, L.S., Literman, R., Trifonov, V., Valenzuela, N., 2016. Cytogenetic insights into the evolution of chromosomes and sex determination reveal striking homology of turtle sex chromosomes to amphibian autosomes. *Cytogenet. Genome Res.* <https://doi.org/10.1159/000447478>.

Noieto, R.B., Kantek, D.L.Z., Swarça, A.C., Dias, A.L., Fenocchio, A.S., Cestari, M.M., 2006. Karyotypic characterization of *Hydromedusa tectifera* (Testudines, Pleurodira) from the upper Iguazu River in the Brazilian state of Paraná. *Genet. Mol. Biol.* 29 (São Paulo). <https://doi.org/10.1590/S141547572006000200011>.

Noronha, R.C.R., Barros, L.M.R., Araújo, R.E.F., Marques, D.F., Nagamachi, C.Y., Martins, C., Pieczarka, J.C., 2016. New insights of karyoevolution in the Amazonian turtles *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemidae). *Mol. Cytogenet.* 9, 73. <https://doi.org/10.1186/s13039-016-0281-5>.

Okazaki, S., Ishikawa, H., Fujiwara, H., 1995. Structural analysis of TRAS1, a novel family of telomeric repeat-associated retrotransposons in the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4545–4552. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.8.4545>.

Orgel, L.E., Crick, F.H., 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284, 604–607. <https://doi.org/10.1038/284604a0>.

Petrov, D.A., 2001. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet.* 17, 23–28. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(00\)02157-0](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(00)02157-0).

Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W., 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 2934–2938. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934>.

Pough, F.H., Janis, C.M., Heiser, J.B., 2013. *Vertebrate Life*, 9th ed. Pearson, pp. 720.

Pucci, M.B., Nogaroto, V., Moreira-Filho, O., Vicari, M.R., 2018. Dispersion of transposable elements and multigene families: microstructural variation in *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae) genomes. *Genet. Mol. Biol.* 41, 585–592. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0121>.

Richardson, S.R., Doucet, A.J., Kopera, H.C., Moldovan, J.B., García-Pérez, J.L., Moran, J.V.,

2015. The influence of LINE-1 and SINE retrotransposons on mammalian genomes. *Microbiol. Spectr.* <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0061-2014>.

Rocchi, M., Archidiacono, N., Schempp, W., Capozzi, O., Stanyon, R., 2012. Centromere repositioning in mammals. *Heredity* 108, 59–67. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.101>.

Sander, C., Schneider, R., 1991. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins* 9, 56–68. <https://doi.org/10.1002/prot.340090107>.

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 (2), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.08.034>.

Servant, G., Deininger, P.L., 2015. Insertion of retrotransposons at chromosome ends: adaptive response to chromosome maintenance. *Front. Genet.* 6, 358. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00358>.

Sochorová, J., Garcia, S., Gálvez, F., Symonová, R., Kovařík, A., 2018. Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma* 127 (1), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0651-8>.

Takahashi, H., Okazaki, S., Fujiwara, H., 1997. A new family of site-specific retrotransposons, SART1, is inserted into telomeric repeats of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Res.* 25, 1578–1584. <https://doi.org/10.1093/nar/25.8.1578>.

Vahos, S.Y.M., 1998. Caracterizacion citogenetica de *Rhinochemmys diademata* (Mertens, 1954) (Testudinata: Emydidae). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Department of Biology.

Viana, P.F., Ribeiro, L.B., Lima, T., Carvalho, V.T., Vogt, R.C., et al., 2016. An optimized protocol for obtaining mitotic chromosomes from cultured reptilian lymphocytes. *Nucleus*. <https://doi.org/10.1007/s13237-016-0174-3>.

Webb, B., Sali, A., 2014. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinf.* 47. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0506s47>.

Yin, Y., Zhou, L., Yuan, S., 2018. Enigma of retrotransposon biology in mammalian early embryos and embryonic stem cells. *Stem Cells Int.* <https://doi.org/10.1155/2018/6239245>.

Capítulo 2: EVOLUTIONARY INSIGHTS IN AMAZONIAN TURTLES (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE): CO-LOCATION OF 5S RDNA AND U2 SNRNA AND WIDE DISTRIBUTION OF TC1/MARINER

Manoella Gemaque Cavalcante, Cleusa Yoshiko Nagamachi, Julio Cesar Pieczarka, Renata Coelho Rodrigues Noronha

Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Laboratório de Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil.

Artigo publicado na revista *Biology Open

RESUMO

Os genomas eucarióticos exibem um acúmulo substancial de sequências de DNA repetitivas. Essas sequências podem participar de eventos de reorganização cromossômica, sofrer cooptação molecular, e interferir na função e evolução dos genomas. Em quelônios, as sequências repetitivas de DNA parecem se acumular em prováveis pontos de quebra e participar de eventos como recombinação não homóloga e rearranjos cromossômicos. Neste estudo, sequências repetidas de rDNA 5S, snRNA U2 e transposon Tc1 / Mariner foram amplificadas a partir dos genomas das tartarugas, *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis*, e mapeadas por Hibridização *in situ* fluorescente. Nossos dados confirmam o $2n=28$ cromossomos para essas espécies (o segundo menor $2n$ na ordem Testudines). Observamos a alta conservação dos genes rDNA 5S e snRNA U2 co-localizados em um pequeno par de cromossomos (par 13), e supomos que isso representa uma condição ancestral. Nossa análise revela uma ampla distribuição do transposon Tc1 / Mariner, e discutimos como a mobilidade desses transposons pode atuar em eventos de reorganização cariotípica, contribuindo para a diminuição de $2n$ dessas espécies. Nossos resultados adicionam novos dados citogenéticos para a ordem Testudines e fornecem informações importantes sobre a dinâmica e a organização de sequências repetitivas nos genomas de quelônios.

Palavras-chave: Citogenética Molecular, DNA móvel, Evolução Cariotípica

INTRODUÇÃO

A grande variação no tamanho e organização dos genomas eucarióticos é atribuída principalmente ao acúmulo de sequências de DNA repetitivas (Feschotte e Pritham, 2007; Kordis, 2009). Estudos sugerem que locais ricos em sequências repetitivas podem ser pontos críticos para quebras de dupla fita, recombinação não homóloga e reorganização cromossômica em vários organismos (Cazaux et al., 2011; Barros et al., 2017; Cavalcante et al., 2018). Além disso, a alta mobilidade de certas sequências (como elementos transponíveis, TEs) pode permitir que esses elementos interrompam sequências de codificação de genes endógenos e modifiquem sua expressão (Kemp e Longworth, 2015; Yin et al., 2018), ou serem cooptados para a regulação de genes do hospedeiro e, assim, interferir na função e evolução do genoma

(McCullers e Steiniger, 2017; Guichard et al., 2018).

Os genes que codificam o rRNA 5S têm o menor comprimento de unidade de repetição entre os genes ribossomais (Salina e Adonina, 2018). Devido ao seu caráter conservado, o rDNA 5S tem sido amplamente utilizado como marcador citogenético molecular para a caracterização de várias espécies. A maioria dos cariótipos investigados tem relativamente poucos loci do rDNA 5S (frequentemente apenas um) (Sochorová et al., 2018; Frade et al., 2019). O rDNA 5S também foi descrito anteriormente co-localizado com outros multigenes, como genes de histonas e pequenos RNAs nucleares (snRNAs) da família U (Novotná et al., 2011; Piscor et al., 2018). Essas associações parecem indicar uma organização antiga e vinculada de tais sequências nos genomas (Cabralde-Mello et al., 2011).

Outro grupo de multigenes frequentemente usado para mapeamento citogenético molecular são os snRNAs, como os RNAs spliceossômicos U2. Embora os genes snRNA U2 mostrem alguma conservação de sequência, o mapeamento *in situ* revela que seus padrões de distribuição podem ser amplamente diversificados entre os cariótipos de alguns grupos. Por exemplo, os snRNAs U2 foram anteriormente descritos: (i) organizados em um único ou pequeno número de agrupamentos cromossômicos, conforme relatado em peixes (Araya-Jaime et al., 2017; Piscor et al., 2018) e alguns invertebrados (Almeida et al., 2017; Anjos et al., 2018); (ii) arranjados em múltiplos agrupamentos, conforme observado em alguns peixes (Xu et al., 2017); (iii) dispersos em pequenas cópias pelo genoma, como em peixes da família Batrachoididae (Úbeda-Manzanaro et al., 2010); (iv) alocados em cromossomos supranumerários, como observado no gafanhoto, *Abracris flavolineata* (Bueno et al., 2013); e (v) em cromossomos sexuais, conforme descrito em gafanhotos da subfamília Melanoplinae (Palacios-Gimenez et al., 2013). Essa ampla heterogeneidade de localização cromossômica observada para os genes snRNA U2 pode estar relacionada à história evolutiva da família snRNA U, cujos membros podem se comportar como elementos móveis e exibir muito pouca sintenia conservada (Marz et al., 2008).

O maior grupo de transposons eucarióticos de Classe II é composto por membros relacionados às famílias Mariner e Tc1 (Benjamin et al., 2007). Em termos de um padrão organizacional, Tc1 / Mariner é descrito como estando predominantemente disperso ao longo dos cariótipos de várias espécies (Schemberger et al., 2016); no entanto, acumulações foram relatadas em regiões heterocromáticas (Ayres-Alves et al., 2017), regiões terminais

(Schemberger et al., 2016; Gouveia et al., 2017) e cromossomos sexuais (Schemberger et al., 2016). Também foi reportada a co-localização de sítios de rDNA com blocos de acumulação de sequências Tc1 / Mariner, onde os autores propuseram que o transposon pode participar na dispersão de rDNA por meio de eventos de recombinação e/ou mobilização derivada da transposição (Ayres-Alves et al., 2017; Gouveia et al., 2017).

A ordem Testudines é considerada uma das linhagens mais antigas entre os vertebrados existentes (Ferri, 2002). Estudos citogenéticos revelaram ampla variação cariotípica entre seus representantes ($2n=26-68$), que é atribuída principalmente ao número de microcromossomos (Montiel et al., 2016; Cavalcante et al., 2018). As espécies do gênero *Podocnemis* (Pleurodira, Podocnemididae) apresentam o segundo menor número diploide da ordem ($2n=28$) (Noronha et al., 2016; Cavalcante et al., 2018). Estudos citogenômicos indicam uma condição derivada para *Podocnemis* e sugerem que múltiplas fusões envolvendo microcromossomos podem ter sido responsáveis pela redução de $2n$ neste gênero (Montiel et al., 2016; Cavalcante et al., 2018).

Em quelônios, estudos citogenômicos baseados em sequências de múltiplas cópias de DNA forneceram dados importantes sobre a dinâmica dessas sequências e como elas podem interferir na organização genômica do grupo. Embora a dinâmica organizacional do rDNA 5S, snRNA U2 e Tc1 / Mariner tenha sido estudada em diferentes grupos de animais, tais dados são limitados entre répteis (Sochorová et al., 2018), e até o presente momento, não haviam dados disponíveis sobre o mapeamento *in situ* dessas sequências em quelônios. Aqui, relatamos as localizações cromossômicas das sequências rDNA 5S, snRNA U2 e transposon Tc1 / Mariner nas espécies de tartarugas amazônicas *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis*, e buscamos entender melhor as organizações genômicas entre répteis, e identificar fatores evolutivos que podem estar envolvidos na ampla diversidade cariotípica da ordem Testudines.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes e aprovação do Comitê de Ética

Os materiais biológicos dos espécimes de *P. expansa* e *P. unifilis* foram coletados no Parque Zoobotânico Mangal das Garças, Belém, Pará, Brasil. Cinco machos e cinco fêmeas foram analisados para cada espécie. Este estudo foi conduzido de acordo com as recomendações

éticas para uso e manejo de quelônios em pesquisa, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal Experimental (licença número 68–2015) e Sistema de Informação e Autorização sobre Biodiversidade (SISBIO; licença número 42642–5).

Preparação cromossômica e produção de sondas

A cultura de linfócitos e as preparações cromossômicas foram realizadas conforme descrito por Viana et al. (2016). O DNA genômico foi extraído usando o kit GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os genes que codificam o rDNA 5S, snRNA U2 e transposon Tc1 / Mariner foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os seguintes iniciadores: 5S rDNA, 5rF (5'-GCC ACA CCA CCC TGA ACA C-3') e 5rR (5'-GCC TAC GAC ACC TGG TAT TC-3') (Suárez et al., 2017); U2 snRNA, 5'-TCT CGG CCT (AT) (AT) T GGC TAA-3' e 5'-G (AC) G GTA (GC) TG CAA TAC CGG-3' (Colgan et al., 1998); e Tc1 / Mariner, MAR-188F5'-ATCTGRAGCTATAAATCACT e MAR-251R 5'-CAAAGATGTCCTTGGGTGTG (Lampe et al., 2003). As misturas de reação continham 80 ng de DNA genômico, 0,2 µM de cada iniciador, dNTPs 0,16 mM, 1 U Taq de DNA polimerase (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ e tampão de reação 10x (200 mM Tris, pH 8,4, 500 mM KCL). As condições de amplificação foram as seguintes: 4 min - 95 ° C / (1 min - 95 ° C / 1 min - 60 ° C / 2 min - 74 ° C) por 35 ciclos / 5 min - 74 ° C para 5S rDNA e Tc1 / Mariner; e 4 min - 95 ° C / (1 min - 95 ° C / 1 min - 57 ° C / 2 min - 74 ° C) 30 ciclos / 5 min - 74 ° C para U2 snRNA. As amplificações geraram bandas com os seguintes tamanhos: 120 pb para 5S rDNA; 220 pb para U2 snRNA; e bandas múltiplas (300, 500 e 1000 bp) para Tc1 / Mariner. As sondas foram marcadas por nick-translation com biotina 14-dATP ou digoxigenina 16-dUPT usando um BioNick Labeling System (Invitrogen) e um kit DIG-Nick (Roche Applied Science), respectivamente.

Hibridização in situ Fluorescente (FISH)

As FISHs foram realizadas conforme descrito por Pinkel et al. (1986), com algumas adaptações. Os sinais foram detectados com avidina-CY3 (Sigma-Aldrich) e antidigoxigenina-FITC (Roche). Os cromossomos foram contrastados com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 0,2 µg ml⁻¹) em meio Vectashield H-100 (Vector) e analisados em microscópio de

epifluorescência (Nikon H550S).

RESULTADOS

Ambas as espécies apresentaram número diploide de 28 cromossomos. *Podocnemis expansa* teve um número fundamental (NF) de 54 e fórmula cariotípica de $24\ m/sm + 2st + 2a$, enquanto que *P. unifilis* apresentou NF= 52 e fórmula cariotípica de $22\ m/sm + 2st + 4a$.

O mapeamento *in situ* com sondas de rDNA 5S revelou sinais pericentroméricos em um único par cromossômico (par 13) para *P. expansa* e *P. unifilis* (Fig. 1A, B).

Hibridizações do snRNA U2 foram observadas na região pericentromérica do mesmo par cromossômico que o rDNA 5S (par 13) para ambas as espécies (Fig. 1C, D).

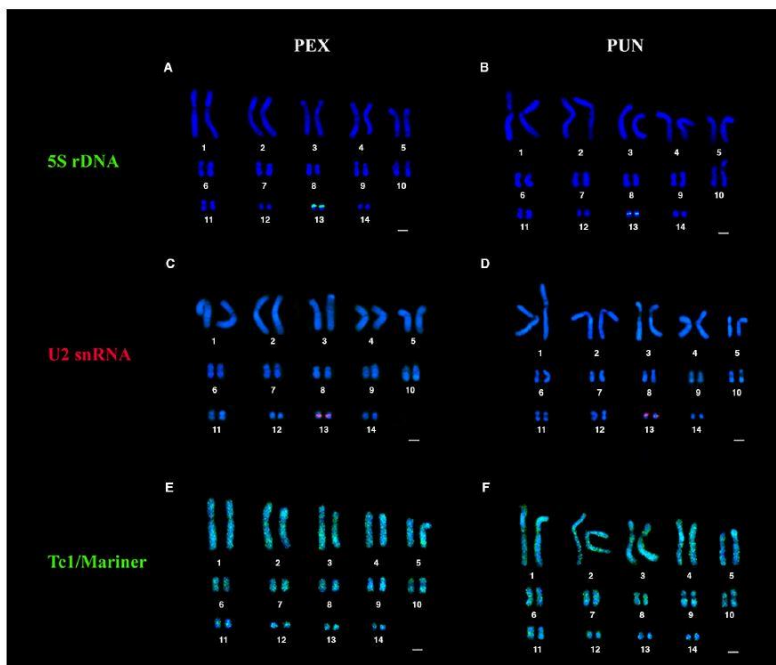


Fig. 1. Physical mapping of repetitive DNA. The codes PEX and PUN refer to the karyotypes of *P. expansa* and *P. unifilis*, respectively. The 5S rDNA (green) is detected in a single chromosomal pair (pair 13) in (A) PEX and (B) PUN. Mapping of the U2 snRNA (red) also yields signals on chromosome pair 13 for (C) PEX and (D) PUN. The transposon, Tc1/Mariner (green), is widely distributed along the karyotypes of (E) PEX and (F) PUN.

Double-FISH usando sondas de 5S e U2 confirmou que os sinais desses multigenes estão co-localizados no par de cromossomos 13 de ambas as espécies (Fig. 2).

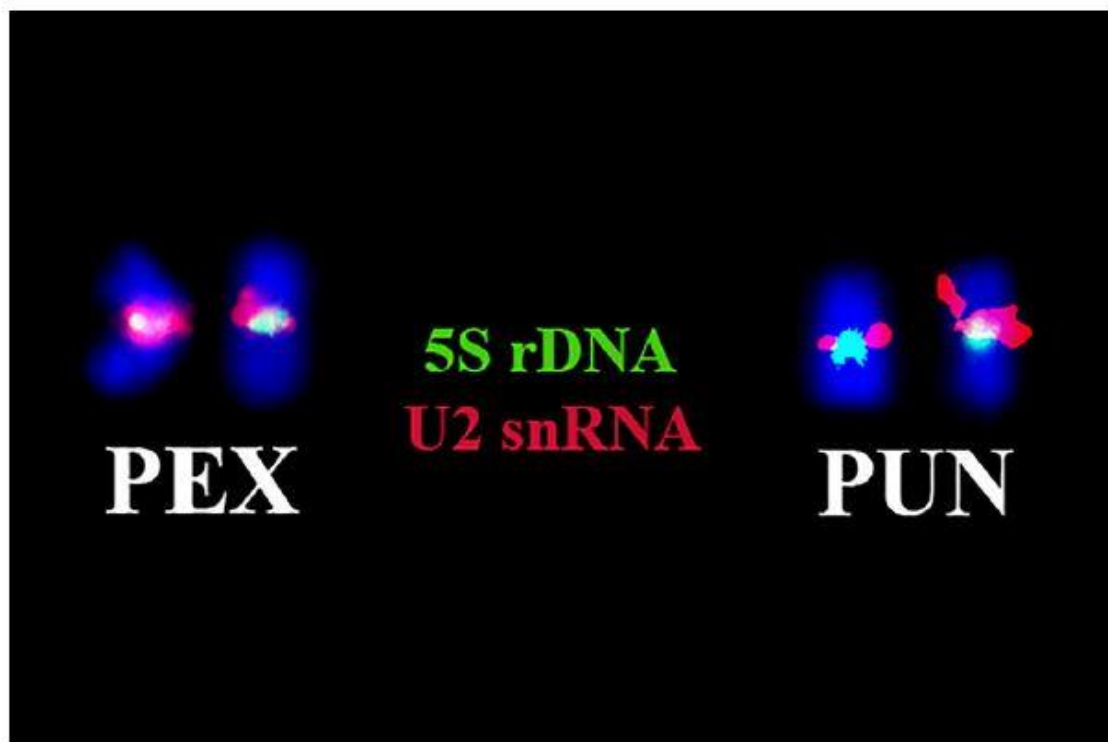


Fig. 2. Double-FISH with 5S rDNA and U2 snRNA probes. Double-FISH using probes for the 5S rDNA (green) and U2 snRNA (red) reveals that these sequences co-localize similarly in chromosome pair 13 of *P. expansa* (PEX) and *P. unifilis* (PUN).

O transposon Tc1 / Mariner foi observado amplamente distribuído ao longo dos cariótipos de *P. expansa* e *P. unifilis*. Os sinais de Tc1 / Mariner foi predominantemente disperso em toda a região eucromática, com acumulações pericentroméricas em alguns pares cromossômicos. As regiões heterocromáticas do par cromossômico 10 de *P. expansa* e dos pares 9 e 10 de *P. unifilis* apresentaram baixa intensidade de sinal para Tc1 / Mariner (Fig. 1E, F).

DISCUSSÃO

O gênero *Podocnemis* possui o segundo menor número diploide entre os quelônios. Nossos resultados corroboram relatórios anteriores de que *P. expansa* e *P. unifilis* (Montiel et al., 2016; Noronha et al., 2016) têm número diploide de $2n=28$ cromossomos. Estudos citogenéticos moleculares indicam que os baixos números diploides de *Podocnemis* representam uma condição cariotípica derivada; múltiplas fusões envolvendo microcromossomos parecem ser responsáveis pela redução do número diploide nessas espécies (Montiel et al., 2016; Cavalcante et al., 2018). Anteriormente, Cavalcante et al. (2018) demonstraram evidências de possíveis fusões cromossômicas nas espécies *P. expansa* e *P. unifilis*. Sinais teloméricos intersticiais foram visualizados em sete pares cromossômicos daquelas espécies (pares 1–5, 7 e 13), sugerindo possíveis locais cromossômicos que podem estar envolvidos em eventos de reorganização genômica, como fusões cromossômicas. Elementos móveis são frequentemente encontrados em pontos de quebra cromossômicas (Barros et al., 2017). Portanto, é provável que TEs como o Tc1 / Mariner, que foi observado amplamente distribuído pelos genomas de *P. expansa* e *P. unifilis*, estejam envolvidos nas reorganizações cariotípicas que se acredita terem ocorrido nessas espécies.

Embora os dados disponíveis da localização *in situ* do rDNA ainda sejam limitados para répteis, os rDNAs 18S e 5S são normalmente encontrados em apenas um par cromossômico nesse grupo: as sequências 18S são geralmente encontradas em um par de microcromossomos, enquanto as sequências 5S relatadas em macro ou microcromossomos (Srikulnath et al., 2015). Cavalcante et al. (2018) relataram que as sequências de rDNA 45S de *P. expansa* e *P. unifilis* estão localizadas na região pericentromérica do primeiro par de macrocromossomos, em associação com regiões de sequência telomérica intersticial. Os autores propuseram que o rDNA 45S estava localizado em um par de microcromossomos no início da evolução cariotípica dessas espécies (semelhante à localização descrita para espécies de quelônios mais basais, com alto $2n$), e foi subsequentemente realocado para o primeiro par de macrocromossomos por meio de eventos de fusão. O presente relatório oferece as primeiras informações sobre o locus do rDNA 5S em quelônios. Nossos resultados demonstram o caráter conservado de um único locus gênico (par cromossômico 13) em *P. expansa* e *P. unifilis* e indicam que, apesar da reorganização genômica proposta para essas espécies, há uma alta conservação dos genes 5S em cromossomos menores em *Podocnemis*. Em outros répteis, o rDNA 5S também está

presente em apenas um par de cromossomos, embora com localizações cromossômicas diferentes (Srikulnath et al., 2011; 2015). Em peixes, Martins e Galetti-Junior (1999) propuseram que a presença do rDNA 5S em apenas um par de cromossomos representa a condição ancestral. Este também parece ser o caso dos répteis. Além disso, sugerimos que uma forte seleção purificadora atua nos agrupamentos de rDNA 5S, evitando que esses multigenes se espalhem nos genomas de *P. expansa* e *P. unifilis*.

Os sinais do snRNA U2 foram observados no mesmo par cromossômico que o rDNA 5S em *P. expansa* e *P. unifilis* (par 13). Cavalcante et al. (2018) relataram anteriormente que o par cromossômico 13 apresentava sinais pericentroméricos dos genes da histona H3 em *P. expansa* e sequências teloméricas intersticiais em *P. expansa* e *P. unifilis*. Assim, o par cromossômico 13 parece abrigar múltiplas sequências repetitivas no genoma dessas espécies. Em genomas animais, a associação/co-localização de famílias multigênicas foi relatada para rRNAs, genes de histonas e snRNAs (Cabral-de-Mello et al., 2011; Cavalcante et al., 2018). De acordo com os estudos de Dover (1989) e Liu e Fredga (1999), essas ligações entre multigenes são importantes para a manutenção da conservação de matrizes múltiplas. Também foi levantada a hipótese de que essas associações entre famílias multigênicas podem desempenhar um papel funcional na organização nuclear (Kaplan et al., 1993; Cabral-de-Mello et al., 2011).

A ampla dispersão observada do Tc1 / Mariner em *P. expansa* e *P. unifilis* é consistente com o padrão organizacional descrito anteriormente para o transposon (Schemberger et al., 2016). Acúmulos heterocromáticos de Tc1 / Mariner também foram relatados anteriormente em alguns peixes (Ayres-Alves et al., 2017; Gouveia et al., 2017). Isso pode indicar que há uma pressão seletiva contra a inserção de TEs na eucromatina, levando essas sequências para regiões do genoma com baixas taxas de recombinação, o que reduz os danos da inserção (Delaurière et al., 2009). Estudos relatam que os elementos transponíveis ativos e recentemente adquiridos estejam preferencialmente localizados na eucromatina (Oliveira et al., 2013). Nesse sentido, as sequências Tc1 / Mariner presentes em *P. expansa* e *P. unifilis* podem ser consideradas recentes, devido à sua ampla dispersão eucromática e poucos acúmulos heterocromáticos. É importante destacar a existência de considerável heterogeneidade intragenômica entre os TEs; os produtos de amplificação de TEs são misturas de várias sequências genômicas de composição desconhecida. Portanto, as sondas derivadas hibridizariam em diferentes localizações

genômicas em diferentes intensidades. Se, como é possível, isso ocorreu no presente estudo para hibridizações com sondas de Tc1 / Mariner, explicaria por que alguns sinais eram fracos enquanto outros eram fortes, e alguns sinais estavam agrupados enquanto outros estavam dispersos.

Noronha et al. (2016) demonstraram ampla distribuição do retrotransposon Rex 6, na eucromatina de *P. expansa* e *P. unifilis*. Os autores enfatizaram que a mobilidade dos TEs pode produzir mudanças estruturais, desencadear rearranjos cromossômicos e modificar os padrões de regulação gênica. Em geral, os TEs estão presentes como cópias não autônomas nos genomas, que são geradas por um processo de degradação (Fernández-Medina et al., 2012). No entanto, é possível detectar atividade transcricional nos limites das sequências degeneradas, como demonstrado na família dos peixes Parodontidae (Schemberger et al., 2016), onde a cooptação molecular dessas sequências foi detectada mesmo após sua inativação. Nesse sentido, dada a intensa presença eucromática de Tc1 / Mariner em *P. expansa* e *P. unifilis*, é possível inferir que a atividade do transposon pode alterar a regulação gênica, conferir novas funções genômicas, ou ainda atuar nos eventos de reorganização cariotípica resultantes na diminuição de $2n$ nessas espécies.

CONCLUSÃO

Nós aqui demonstramos que o número do locus gênico para o rDNA 5S é altamente conservado (apenas um par de cromossomos) em *P. expansa* e *P. unifilis*. Resultado semelhante foi obtido anteriormente para os locus de rDNA 45S dessas espécies (embora em pares cromossômicos distintos), sugerindo que um baixo número de locus de rDNA é consistente neste grupo e representa um caráter plesiomórfico. Também demonstramos que existem ligações entre os multigenes, rDNA 5S e snRNA U2, que provavelmente atuam para manter suas matrizes conservadas nessas espécies. Finalmente, mostramos que o transposon Tc1 / Mariner está amplamente disperso ao longo dos cariótipos das espécies aqui analisadas (preferencialmente em regiões eucromáticas). Com base nisso, sugerimos que esses transposons podem alterar a regulação gênica, ter suas sequências degeneradas cooptadas para novas funções genômicas e / ou participar de eventos de reorganização cariotípica. Esses dados não foram relatados anteriormente para a ordem Testudines, e nossas descobertas fornecem informações importantes sobre a dinâmica e a organização dessas sequências repetitivas em genomas de quelônios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, B. R. R., Milhomem-Paixão, S. S. R., Noronha, R. C. R., Nagamachi, C. Y., Costa, M. J. R., Pardal, P. P. O., Coelho, J. S. and Pieczarka, J. C. (2017). Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). *BMC Genet.* 18, 35. doi:10.1186/s12863-017-0494-6

Anjos, A., Paladini, A., Mariguela, T. C. and Cabral-de-Mello, D. C. (2018). U1snDNA chromosomal mapping in ten spittlebug species (Cercopidae, Auchenorrhyncha, Hemiptera). *Genome* 61, 59-62. doi:10.1139/gen-2017-0151

Araya-Jaime, C., Lam, N., Pinto, I. V., Méndez, M. A. and Iturra, P. (2017). Chromosomal organization of four classes of repetitive DNA sequences in killifish *Orestias ascotensis* Parenti, 1984 (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae). *CompCytogen* 11, 463-475. doi:10.3897/compcytogen.v11i3.11729

Ayres-Alves, T., Cardoso, A. L., Nagamachi, C. Y., de Sousa, L. M., Pieczarka, J. C. and Noronha, R. C. R. (2017). Karyotypic evolution and chromosomal organization of repetitive DNA sequences in species of panaque, panaolus, and scobinancistrus (Siluriformes and Loricariidae) from the amazon basin. *Zebrafish* 14, 251-260. doi:10.1089/zeb.2016.1373

Barros, A. V., Wolski, M. A. V., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Moreira-Filho, O. and Vicari, M. R. (2017). Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? *Gene* 608, 20-27. doi:10.1016/j.gene.2017.01.013

Benjamin, B., Yves, B. and 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, 105-120. doi:10.1007/s10709-006-0025-2

Bueno, D., Palacios-Gimenez, O. M. and Cabral-de-Mello, D. C. (2013). Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *PLoS ONE* 8, e66532. doi:10.1371/journal.pone.0066532

Cabral-de-Mello, D. C., Oliveira, S. G., de Moura, R. C. and Martins, C. (2011). Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC Genet*; 12, 88. doi:10.1186/1471-2156-12-88

Cavalcante, M. G., Bastos, C. E. M. C., Nagamachi, C. Y., Pieczarka, J. C., Vicari, M. R. and Noronha, R. C. R. (2018). Physical mapping of repetitive DNA suggests 2n reduction in Amazon turtles *Podocnemis* (Testudines: Podocnemididae). *PloS One*. 13, e0197536. doi:10.1371/journal.pone.0197536

Cazaux, B., Catalan, J., Veyrunes, F., Douzery, E. J. P. and Britton-Davidian, J. (2011). Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol Biol*; 11, 124. doi:10.1186/1471-2148-11-124

Colgan, D. J., McLauchlan, A., Wilson, G. D. F., Livingston, S. P., Edgecombe, G. D., Macaranas, J., Cassis, G. and Gray, M. R. (1998). Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aust. J. Zool.* 46, 419. doi:10.1071/zo98048

Delaurière, L., Chénais, B., Hardivillier, Y., Gauvry, L. and Casse, N. (2009). Mariner transposons as genetic tools in vertebrate cells. *Genetica*, 137, 9-17. doi:10.1007/s10709-009-9370-2

Dover, G. A. (1989). Linkage disequilibrium and molecular drive in the rDNA gene family.

Genetics 122, 249-252.

Fernández-Medina, R. D., Ribeiro, J. M. C., Carareto, C. M. A., Velasque, L. and Struchiner, C. J. (2012). Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics* 13, 272. doi:10.1186/1471-2164-13-272

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

Feschotte, C. and Pritham, E. J. (2007). DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu. Rev. Genet.* 41, 331-368. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090448

Frade, L. F. d. S., Almeida, B. R. R., Milhomem-Paixão, S. S. R., Ready, J. S., Nagamachi, C. Y., Pieczarka, J. C. and Noronha, R. C. R. (2019). Karyoevolution of *Crenicichla heckel* 1840 (Cichlidae, Perciformes): a process mediated by inversions. *Biology Open* 8, bio041699. doi:10.1242/bio.041699

Gouveia, J. G., Wolf, I. R., Vilas-Boas, L. A., Heslop-Harrison, J. S., Schwarzacher, T. and Dias, A. L. (2017). Repetitive DNA in the Catfish Genome: rDNA, Microsatellites, and Tc1-Mariner Transposon Sequences in *Imparfinis* Species (Siluriformes, Heptapteridae). *J. Hered.* 108, 650-657. doi:10.1093/jhered/esx065

Guichard, E., Peona, V., Tagliazucchi, G. M., Abitante, L., Jagoda, E., Musella, M., Ricci, M., Rubio-Roldán, A., Sarno, S., Luiselli, D. et al. (2018). Impact of non-LTR retrotransposons in the differentiation and evolution of anatomically modern humans. *Mobile DNA* 9, 28. doi:10.1186/s13100-018-0133-4

Kaplan, F. S., Murray, J., Sylvester, J. E., Gonzalez, I. L., O'Connor, J. P., Doering, J. L., Muenke, M., Emanuel, B. S. and Zasloff, M. A. (1993). The topographic organization of repetitive DNA in the human nucleolus. *Genomics*; 15, 123-132. doi:10.1006/geno.1993.1020

Kemp, J. R. and Longworth, M. S. (2015). Crossing the LINE toward genomic instability: LINE-1 retrotransposition in cancer. *Front. Chem.* 3, 68. doi:10.3389/fchem.2015.00068

Kordis, D. (2009). Transposable elements in reptilian and avian (Sauropsida) genomes. *Cytogenet Genome Res.* 127, 94-111. doi:10.1159/000294999

Lampe, D. J., Witherspoon, D. J., Soto-Adames, F. N. and Robertson, H. M. (2003). Recent horizontal transfer of mellifera subfamily Mariner transposons into insect lineages representing four different orders shows that selection acts only during horizontal transfer. *Mol Biol Evol*; 20, 554-562. doi:10.1093/molbev/msg069

Liu, W. S. and Fredga, K. (1999). Telomeric (TTAGGG)_n sequences are associated with nucleolus organizer regions (NORs) in the wood lemming. *Chromosome Res*; 7, 235-240. doi:10.1023/A:1009255517764

Martins, C. and Galetti-Junior, P. M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res*; 7, 363-367. doi:10.1023/A:1009216030316

Marz, M., Kirsten, T. and Stadler, P. F. (2008). Evolution of Spliceosomal snRNA Genes in Metazoan Animals. *J. Mol. Evol.* 67, 594-607. doi:10.1007/s00239-008-9149-6

McCullers, T. J. and Steiniger, M. (2017). Transposable elements in *Drosophila*. *Mob Genet*

Montiel, E. E., Badenhorst, D., Lee, L. S., Literman, R., Trifonov, V. and Valenzuela, N. (2016). Cytogenetic insights into the evolution of chromosomes and sex determination reveal striking homology of turtle sex chromosomes to amphibian autosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 148, 292-304. doi:10.1159/000447478

Noronha, R. C. R., Barros, L. M. R., Araújo, R. E. F., Marques, D. F., Nagamachi, C. Y., Martins, C. and Pieczarka, J. C. (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

Novotná, J., Havelka, J., Starý, P., Koutecký, P. and Vítková, M. (2011). Karyotype analysis of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) (Hemiptera: Aphididae) reveals a large×chromosome with rRNA and histone gene families. *Genetica*; 139, 281-289. doi:10.1007/s10709-011-9546-4

Oliveira, S. G., Cabral-de-Mello, D. C., Moura, R. C. and Martins, C. (2013). Chromosomal organization and evolutionary history of Mariner transposable elements in Scarabaeinae coleopterans. *Molecular Cytogenetics*, 6, 54. doi:10.1186/1755-8166-6-54

Palacios-Gimenez, O. M., Castillo, E. R., Martí, D. A. and Cabral-de-Mello, D. C.(2013). Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. *BMC Evol. Biol.* 13, 167. doi:10.1186/1471-2148-13-167

Pinkel, D., Straume, T. and Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83, 2934-2938.

doi:10.1073/pnas.83.9.2934

Piscor, D., Fernandes, C. A. and Parise-Maltempi, P. P. (2018). Conserved number of U2 snDNA sites in *Piabina argentea*, *Piabarchus stramineus* and two *Bryconamericus* species (Characidae, Stevardiinae). *Neotropical Ichthyology* 16. doi:10.1590/1982-0224-20170066

Salina, E. A. and Adonina, I. G. (2018). Cytogenetics in the study of chromosomal rearrangement during wheat evolution and breeding. *Cytogenetics - Past, Present and Further Perspectives*. doi:10.5772/intechopen.80486

Schemberger, M. O., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Artoni, R. F., Valente, G. T., Martins, C., Moreira-Filho, O., Cestari, M. M. and Vicari, M. R. (2016). Sequence analyses and chromosomal distribution of the Tc1/Mariner element in Parodontidae fish (Teleostei: Characiformes). *Gene* 593, 308-314. doi:10.1016/j.gene.2016.08.034

Sochorová, J., Garcia, S., Gálvez, F., Symonová, R. and Kovařík, A. (2018). Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma* 127, 141-150. doi:10.1007/s00412-017-0651-8

Srikulnath, K., Uno, Y., Matsubara, K., Thongpan, A., Suputtitada, S., Apsitwanich, S., Nishida, C. and Matsuda, Y. (2011). Chromosomal localization of the 18S-28S and 5S rRNA genes and (TTAGGG)_n sequences of butterfly lizards (*Leiolepis belliana belliana* and *Leiolepis boehmei*, Agamidae, Squamata). *Genet. Mol. Biol.* 34, 583-586. doi:10.1590/S1415-47572011005000042

Srikulnath, K., Uno, Y., Nishida, C., Ota, H. and Matsuda, Y. (2015). Karyotype Reorganization in the Hokou Gecko (*Gekko hokouensis*, Gekkonidae): The Process of Microchromosome Disappearance in Gekkota. *PLOS ONE* 10,e0134829.

doi:10.1371/journal.pone.0134829

Suárez, P., Pinto Barroso, I. C. G., Silva, D. d. S., Milhomem, S. S. R., Cabral-de-Mello, D. C., Martins, C. and Nagamachi, C. Y. (2017). Highest diploid number among gymnotiformes: first cytogenetic insights into rhabdoliops (Sternopygidae). *Zebrafish* 14, 272-279. doi:10.1089/zeb.2016.1405

Úbeda-Manzanaro, M., Merlo, M. A., Palazón, J. L., Cross, I., Sarasquete, C. and Rebordinos, L. (2010). Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae Family. *Genetica*, 138, 787-794. doi:10.1007/s10709-010-9460-1

Viana, P. F., Ribeiro, L. B., Lima, T., Carvalho, V. T., Vogt, R. C., Gross, M. C. and Feldberg, E. (2016). An optimized protocol for obtaining mitotic chromosomes from cultured reptilian lymphocytes. *The Nucleus*, 59, 191-195. doi:10.1007/s13237-016-0174-3

Xu, D., Molina, W. F., Yano, C. F., Zhang, Y., de Oliveira, E. A., Lou, B. and Cioffi, M. B. (2017). Comparative cytogenetics in three Sciaenid species (Teleostei, Perciformes): evidence of interspecific chromosomal diversification. *Mol Cytogenet*, 10, 37. doi:10.1186/s13039-017-0338-0

Yin, Y., Zhou, L. and Yuan, S. (2018). Enigma of retrotransposon biology in mammalian early embryos and embryonic stem cells. *Stem Cells International* 2018, 1-6. doi:10.1155/2018/6239245

7. CONCLUSÕES FINAIS

Os dados aqui publicados a partir dos resultados obtidos com o desenvolvimento da presente tese são, em sua maioria, inéditos para a ordem Testudines. Isso contribui para aumentar o acervo de informações citogenéticas moleculares dessas espécies, dados esses que ainda são muito escassos para o grupo estudado. Vale ressaltar a importância da produção de dados multidisciplinares que caracterizem as espécies em diferentes âmbitos, contribuindo para entender seus processos evolutivos. Conhecer a história evolutiva das espécies é essencial para futuras aplicações em projetos maiores, como por exemplo, envolvendo o manejo, conservação e reprodução dessas espécies.

Nossas contribuições através do mapeamento de sequências de DNAs repetitivos indicam diversos sinais de possíveis rearranjos cromossômicos, que podem estar relacionados a variação cariotípica e evolução genômica do grupo. Futuras análises genômicas, como por pintura cromossômica, podem mostrar as homologias entre essas espécies de quelônios e confirmar os pontos de rearranjos propostos a partir do mapeamento de sequências repetitivas. Além disso, o avanço dos estudos acerca da ação de elementos transponíveis nos genomas das espécies de quelônios, pode elucidar de que maneira esses elementos contribuem de fato na evolução genômica dessas espécies, uma vez que estes são encontrados também em associação com outros genes, e podem ser cooptados para novas funções genômicas.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

Research paper

Molecular cytogenetics characterization of *Rhinoclemmys punctularia* (Testudines, Geoemydidae) and description of a Gypsy-H3 association in its genome



Manoella Gemaque Cavalcante^a, Luciano Farias Souza^a, Marcelo Ricardo Vicari^b,
Carlos Eduardo Matos de Bastos^a, Jaime Viana de Sousa^c, Cleusa Yoshiko Nagamachi^a,
Julio Cesar Pieczarka^a, Cesar Martins^d, Renata Coelho Rodrigues Noronha^{a,*}

^a Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Laboratório de Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil

^b Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

^c Universidade Federal Rural da Amazônia (Campus Capanema), Brazil

^d Departamento de Morfologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Histone genes
Retrotransposon LTR
45S rDNA
Karyotypic reorganization
Turtle

ABSTRACT

The wide variation found in the size of eukaryotic genomes is largely related to the accumulation of repetitive sequences. Studies show that these sequences can go through an evolutionary process (molecular co-optation) and acquire new genomic functions. Cytogenetic studies reveal a wide karyotypic variation between chelonians (order Testudines) ($2n = 26-68$), attributed mainly to the number of microchromosomes. The study of repetitive DNAs has the potential to provide data on the dynamics of these sequences, and how they influence the organization of the genome. Here, we reveal the first *in situ* mapping data of 45S rDNA, histone H3 genes, and telomeric sequences, for a species of the genus *Rhinoclemmys*, *R. punctularia*. The karyotype described here for *R. punctularia* is different from previous reports for the diploid complement of this species, with differences probably attributable to centric fissions and pericentric inversions or centromere repositioning. The 45S rDNA are on a single chromosome pair (like in other turtles), telomeric sequences are in terminal position on all the chromosomes, and histone H3 is dispersed in low copy number, with clusters in pericentromeric regions of three chromosome pairs. We report on the presence of a Gypsy retrotransposon insert located within H3 histone of *R. punctularia*, and the H3 region sequenced contained the open reading frame of the histone sequence. Comparative modeling revealed a functional pattern for the protein, thus suggesting that the Gypsy element might have been recruited for new functions in the genome of this species.

1. Introduction

The wide variation in the size of eukaryotic genomes is largely related to the accumulation of repetitive DNA sequences (Petrov, 2001; Kidwell, 2002). Although these sequences were traditionally dismissed as “molecular parasites” (Orgel and Crick, 1980), the advent of DNA sequencing and advances in biochemical, genomic, and epigenetic techniques revealed that these elements are biologically important components of eukaryotic genomes, and their activities can significantly influence the structure and function of the genome itself

(Richardson et al., 2015; Guichard et al., 2018).

Retrotransposons are repetitive DNA sequences that have the capacity to copy themselves and move the new copies to other genomic regions. The genome can use different strategies to control the number of copies, such as preferentially allowing insertion of these repetitive sequences in gene-poor regions such as heterochromatin or telomeres (Okazaki et al., 1995; Takahashi et al., 1997), using DNA repair proteins to destabilize the new copies during their reverse transcription (Bryk et al., 2001; Gasior et al., 2008), and/or silencing retrotransposons via DNA methylation, histone modifications, or post-

Abbreviations: $2n$, diploid number; m , metacentric; sm , submetacentric; t , telocentric; st , subtelocentric; a , acrocentric; bp , base pair; $dNTPs$, deoxyribonucleoside triphosphate; DT , dysfunctional telomere; $FISH$, fluorescence *in situ* hybridization; FN , fundamental number; TE , transposable elements; $rDNA$, ribosomal DNA; PCR , polymerase chain reaction; $BLASTn$, basic local alignment search tool for nucleotides; $NCBI$, Center for Biotechnology Information; LTR , long terminal repeat

* Corresponding author at: Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Universidade Federal do Pará, Augusto Corrêa Street, 01, Guamá, CEP 66075-110 Belém, Pará, Brazil.

E-mail address: rccrn@ufpa.br (R.C.R. Noronha).

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144477>

Received 20 November 2019; Received in revised form 1 February 2020; Accepted 11 February 2020

Available online 12 February 2020

0378-1119/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

transcriptional regulation (Bourc'His and Bestor, 2004; Yin et al., 2018). However, despite the various mechanisms that protect the genome, the action of retrotransposons can cause recombination events between the retroelements; this can generate breaks and genomic rearrangements, as non-allelic homologous recombination (Servant and Deininger, 2015; Yin et al., 2018) and/or interrupt the coding sequences of endogenous genes, altering their expression (Kemp and Longworth, 2015).

Recent studies on the evolutionary dynamics of retroelements have strongly suggested that they are generally co-opted for the regulation of host genes, and thereby impact the functioning and evolution of genomes (Göke and Ng, 2016; Chuong et al., 2017; McCullers and Steiniger, 2017; Guichard et al., 2018). It has been proposed that most retrotransposons have lost their transposition capacity, and the remaining fragments contain important components, such as cis-regulatory sequences, transcription start sites, and/or entire transcribable genes; if true, this would indicate that retroelements can contribute to both regulation and transcription in the eukaryotic genome (Göke and Ng, 2016). However, we still do not fully understand how retrotransposons coevolve with the host genome to optimize the survival of both, and the functions and mechanisms of retrotransposons have not been fully elucidated (Yin et al., 2018).

Testudines is considered to be one of the oldest orders among the existing reptiles. The chelonians represent 13 families of this order; they comprise approximately 300 species and may be subdivided into two suborders (Cryptodira and Pleurodira) (Pough et al., 2013). Cytogenetic studies have revealed that there is a wide karyotypic variation among turtles ($2n = 26-68$); this diversity has been largely attributed to the varying number of microchromosomes, with multiple chromosomal rearrangements (i.e., microchromosome fusions) accounting for the lower diploid numbers (Gunki et al., 2013; Montiel et al., 2016; Cavalcante et al., 2018).

The advancement of cytogenetic analysis has helped improve our understanding of the evolutionary mechanisms involved in the karyotypic diversification of chelonians. The 45S ribosomal DNA (rDNA) is found on a single chromosome pair in all turtle species investigated to date; in those with higher $2n$, it is found on a microchromosome pair (Noletto et al., 2006; Fantin and Giuliano-Caetano, 2014; Montiel et al., 2016), while in those with low $2n$ and few or no microchromosomes, it is conserved in the pericentromeric region of a macrochromosome pair (Montiel et al., 2016; Noronha et al., 2016; Cavalcante et al., 2018). Interstitial telomeric sites have been detected in turtles with low $2n$ and without microchromosomes, potentially indicating the remnants of microchromosome fusion events (Montiel et al., 2016; Cavalcante et al., 2018). The genes encoding Histones H1 and H3 were mapped by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) only in two turtles of the genus *Podocnemis*; H1 genes were found in conserved synteny with the 45S rDNA, whereas H3 genes were identified in multiple chromosomal pairs, probably reflecting non-homologous recombination and/or dispersion mediated by transposable elements (Cavalcante et al., 2018).

The genus *Rhinoclemmys* (Cryptodira, Geoemydidae) is composed of nine species and two subspecies, all of which of which have been analyzed by classical cytogenetics to date, with the exception of *R. annulata* and *R. nasuta* (Table 1). This is the only group in the family Geoemydidae distributed in Central and South America (Le and McCord, 2008). The investigated members of *Rhinoclemmys* have $2n = 52$ and many microchromosomes (Killebrew, 1977; Carr and Bickham, 1986; Vahos, 1998), with the exception of the *R. punctularia*, which has two additional chromosome pairs ($2n = 56$) - including Amazonian specimens (Barros et al., 1975; Bickham and Baker, 1976a,b; Viana et al., 2016). The present study describes a new karyotype for *R. punctularia* and the first data on the physical mapping by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) of 45S rDNA genes, H3 histone, and telomeric sequences. In addition, we demonstrate the association between H3 histone genes and Gypsy retrotransposon.

2. Materials and methods

2.1. Specimens and approval

The studied specimens of *Rhinoclemmys punctularia* were kept at the Zoobotanical Park Adhemar Monteiro, Capitão Poço, Pará, Brazil. Five specimens were used, three males and two females. This study was conducted in strict accordance with the ethical recommendations for the use and management of chelonians in research, and was approved by the Ethics Committee on Experimental Animal Research (license number 68-2015) and the Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO; license number 42642-6).

2.2. Chromosomal preparation and classical cytogenetics

The chromosomal preparations were obtained from lymphocyte cell culture, as described by Viana et al. (2016). The chromosomes were stained with Giemsa and organized by the size and centromere position, and characterized as metacentric (m), submetacentric (sm), subtelocentric (st), acrocentric (a) or microchromosome (micro), as described by Guerra (1986), with modifications. For the characterization of the nucleolus organizer regions (NORs), an AgNO₃ stain was done according to Howell and Black (1980).

2.3. DNA extraction and probe synthesis

Genomic DNA was purified from the muscle tissues and blood specimens using a GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Histone H3-encoding genes were amplified using primers (Forward) 5-ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC-3 and (Reverse) 5-ATA TCC TTV GGC ATV ATV GTG AC-3, which were designed by Colgan et al. (1998). The reaction mix consisted of 80 ng genomic DNA, 0.2 μM of each primer, 0.16 mM dNTPs, 1U Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂, and 1 × reaction buffer (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl). The amplification program consisted of 4 min at 95 °C followed by 30 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 60 °C and 2 min at 74 °C, and a final extension of 5 min at 74 °C.

The general telomeric sequence of vertebrates (TTAGGG)_n was obtained as described by Ijdo et al. (1991). For synthesis of the 45S rDNA probe, we used plasmid pTa71, which contains the 5.8S, 18S and 28S gene sequences and their respective intergenic spacers from *Triticum aestivum* (Gerlach and Bedbrook, 1979). The probes were labeled with biotin 14-dATP or digoxigenin 16-dUPT using the BioNick Labeling System (Invitrogen) and a DIG-Nick kit (Roche Applied Science), respectively.

2.4. Sequencing and analysis of H3

The PCR products were purified using a GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) and sequenced using an ABI 3500 genic analyzer (Applied Biosystems). The sequences were analyzed and edited using the Geneious 7.1.3 software (Kearse et al., 2012). The identities of the analyzed sequences were confirmed using the CENSOR tool for repetitive sequences (Girinst) (Kohany et al., 2006) and BLASTn (basic local alignment search tool for nucleotides) from the National Center for Biotechnology information (NCBI). The H3 sequences were searched for open reading frames (ORFs) and subjected to amino acid sequence translation using the Geneious software, and the translated sequences were searched for protein similarity and putative conserved domains using BLASTp or (when working directly from the nucleotide sequence) BLASTx.

2.5. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Fluorescence *in situ* hybridization was performed as described by Pinkel et al. (1986) with some modifications. The signals were detected

Table 1

Diploid numbers and karyotypic formulas for the species of genus *Rhinoclemmys*. Abbreviations: m/sm, metacentric and submetacentric chromosomes; t/st, telocentric and subtelocentric chromosomes; a, acrocentric chromosomes; micro, microchromosomes.

Species of genus <i>Rhinoclemmys</i>	2n	Karyotypic Formula	FN	References
<i>R. areolata</i>	52	18 m/sm + 10st/t + 24micro	Not available	Carr and Bickham (1986)
<i>R. diademata</i>	52	16 m/sm + 16 t/st + 20micro	Not available	Vahos (1998)
<i>R. funerea</i>	52	16 m/sm + 10 t/st + 26micro	Not available	Carr and Bickham (1986)
<i>R. melanosterna</i>	52	16 m/sm + 10 t/st + 26micro	Not available	Killebrew (1977)
<i>R. punctularia</i>	56	16 m/sm + 6a + 34micro	72	Barros et al. (1975)
		12m/sm + 10 t/st + 34micro	Not available	Bickham and Baker (1976a,b)
		16m/sm + 10 t/st + 30micro	Not available	Carr and Bickham (1986)
		14m/sm + 4st + 10a + 28micro	74	Present study
<i>R. pulcherrima</i>	52	12 m/sm + 10 t/st + 30micro	Not available	Bickham and Baker (1976a)
<i>R. p. incisa</i>	52	18 m/sm + 10 t/st + 24micro	Not available	Carr and Bickham (1986)
<i>R. p. manni</i>	52	18 m/sm + 10 t/st + 24micro	Not available	Carr and Bickham (1986)
<i>R. rubida</i>	52	18 m/sm + 10 t/st + 24micro	Not available	Carr and Bickham (1986)

with avidin-CY3 (Sigma-Aldrich) and antidigoxigenin-FITC (Roche Applied Science). Chromosomes were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in Vectashield H-100 mounting medium (Vector) and analyzed under an epifluorescence microscope (H550S; Nikon).

2.6. Homology modeling

Homology modeling allows the tertiary structure of a protein to be constructed based on the similarity of its primary structure. This technique is based on the idea that the 3D structures of homologous proteins are conserved during the evolutionary process, especially near functional residues, since structural preservation is crucial to the maintenance and performance of specific functions (Höltje et al., 2003). In the present study, the primary structure of the H3 sequence (*Chelonia Mydas* histone H3.2) was obtained from the NCBI database. We selected PDB codes mmdb_2HIO.pdb, mmdb_2IO5.pdb, and mmdb_3LEL.pdb as templates for building the 3D models; these choices each had maximum coverage, a high identity score, and a low e-value upon basic local alignment search tool (BLAST) analysis (Geer et al., 2009). The sequence identity between all three templates and the target H3 sequences was above 30%, which is an acceptable margin for modeling of homologous proteins (Sander and Schneider, 1991). MODELLER was used to perform the homology structure modeling. This program automatically calculates a model containing all of the non-hydrogen atoms and can perform additional auxiliary tasks, including bending assignment and simultaneous alignment of two structural protein sequences (Webb and Sali, 2014).

3. Results

Rhinoclemmys punctularia presented 2n = 56 and a fundamental number (FN) of 74, with the following karyotypic formula: eight metacentric chromosomes, six submetacentric chromosomes, four subtelocentric chromosomes, 10 acrocentric chromosomes, and 28 microchromosomes (14 m/sm + 4st + 10a + 28 micros). We did not find heteromorphic chromosome pairs in either males or females of *R. punctularia* here analyzed (Fig. 1a).

Impregnation with AgNO₃ revealed only one pair of active nucleolus organizer regions (Ag-NOR), located in microchromosomes (pair 15) (Fig. 1b). FISH with 45S rDNA probe produced signals in a pair of microchromosomes (pair 15) (Fig. 2a). Telomeric signals were observed in the distal regions of all chromosomal pairs (Fig. 2a). Histone H3 genes were dispersed throughout the karyotype of *R. punctularia*, with clusters located in the pericentromeric regions of chromosome pairs 5, 6, and 10 (Fig. 2b).

The H3 sequence alignment obtained from *Rhinoclemmys punctularia* genome revealed high similarity to the H3.2-like variant of the turtle

Chelonia mydas (Histone H3.2-like LOC102940196, mRNA), with nucleotides 94 to 410 of the H3 sequence of *R. punctularia* showing 92% similarity (286/311). Meanwhile, nucleotides 102–158 of the H3 sequence of *R. punctularia* presented 82% similarity to the LTR Gypsy-40_Bra-I retrotransposon of *Brassica* (Fig. 3). Amino acid sequence analysis revealed that there was 98% similarity to a partial histone H3 sequence from *Ylistrum japonicum japonicum* (Sequence ID: AEK26337.1), and the Gypsy-like region contained the open reading frame (ORF) of the histone sequence.

Using the amino acid sequence of the H3 obtained in the present study, we performed comparative modeling using H3 of *Chelonia mydas* as a reference sequence. Despite the insertion of the retroelement, we were able to observe a functional pattern for the protein (Fig. 4).

4. Discussion

The diploid number observed herein for *R. punctularia* (2n = 56) is consistent with those found in previous reports on the species (Barros et al., 1975; Carr and Bickham, 1986; Bickham and Baker, 1976a,b), but differences are seen in the FN and karyotypic formula (see Table 1). The apparent disparity in the present FN may reflect pericentric inversions and/or the activation of new evolutionary centromeres (also called repositioned centromeres), which move to a new position along the chromosome without any inversion or other structural rearrangements (Rocchi et al., 2012).

The 2n variation observed in the genus *Rhinoclemmys* (2n = 52–56) is reflected by an increase in the number of acrocentric chromosome pairs in *R. punctularia*, suggesting that this species may have undergone karyotypic reorganization during the evolutionary process. Phylogenetic analyses using nuclear and mitochondrial genes show *R. punctularia* (2n = 56) in a derived phylogenetic position in relation to the other described species of the genus *Rhinoclemmys* (Guillon et al., 2012), which have 2n = 52 chromosomes (Killebrew, 1977; Carr and Bickham, 1986; Vahos, 1998). In this context, we suggest that centric fissions and subsequent karyotypic differentiation are largely responsible for the increase of 2n observed in *R. punctularia* compared to the other members of genus *Rhinoclemmys*.

Our *in situ* hybridization with telomeric probes (TTAGGG)_n did not identify any interstitial site for *R. punctularia*. This is consistent with the expectation for turtles with high 2n (Montiel et al., 2016), which generally exhibit telomeric accumulations in association with heterochromatic regions on few or no chromosome pairs (as observed in this study). In contrast, chelonians with low 2n and few or no microchromosomes have multiple interstitial telomeric clusters; these are thought to represent remnants of the microchromosome fusions that reduced the diploid number in these species (Cavalcante et al., 2018).

In situ mapping has revealed that the locations of the 45S rDNA varies widely among the chelonians. Our results are consistent with

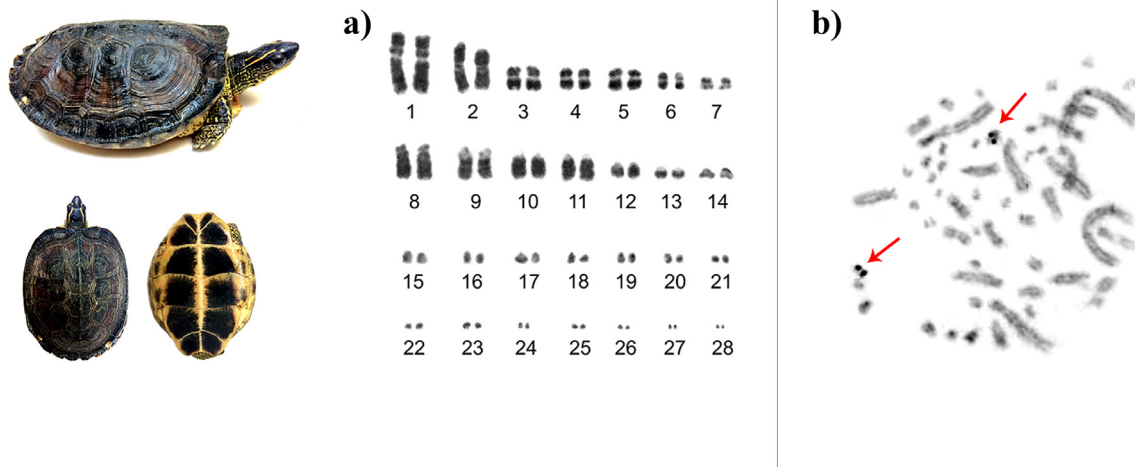


Fig. 1. Karyotype of *Rhinoclemmys punctularia*. In a) the chromosomes were stained with Giemsa and organized by size and centromere position. The diploid number is 56, the fundamental number is 74, and the karyotypic formula is $14\ m/sm + 4st + 10a + 28micro$; b) Ag-NOR staining on metaphase chromosomes of *R. punctularia* after Giemsa staining (arrows show the NOR-bearing microchromosomes).

those obtained for other species of turtles with high $2n$, in which the 45S rDNA signals correspond to a single pair of microchromosomes (Noieto et al., 2006; Fantin and Giuliano-Caetano, 2014; Montiel et al., 2016); our Ag-NOR results confirm this pattern, which indicates that the species does not possess additional NOR-sites. In turtles with low $2n$, the 45S rDNA signals are seen in the pericentromeric region of the larger pair of macrochromosomes (Montiel et al., 2016; Noronha et al., 2016; Cavalcante et al., 2018). Cavalcante et al. (2018) highlighted that the 45S rDNA co-localizes with interstitial telomeric sequences in the first pair of macrochromosomes for *P. expansa* and *P. unifilis* ($2n = 28$), proposing that, during karyotype evolution, the 45S moved from micro to macrochromosomes through fusion events. However, although occurs this variation in 45S rDNA location between the chelonians investigated, the ribosomal presents a conserved character regarding the number of gene locus (only one chromosome pair for all turtle species investigated to date). This condition can be explained by a general

tendency of genomes to maintain a low number of rDNA loci (Sochorová et al., 2018), and this is likely to reflect a plesiomorphic chromosomal condition in Testudines.

Our nucleotide sequence analyses revealed that nucleotides 102–158 of the H3 sequence of *R. punctularia* exhibited a high similarity to the LTR Gypsy Retrotransposons. Moreover, we found that this element was part of the H3 reading frame, but did not introduce a stop codon into the sequence. The invasion of Gypsy retrotransposons into histone genes (H3 and H4) was previously reported in fish of genus *Characidium*, where the authors proposed that retroelement-mediated transposition events could be involved in disseminating histone sequences throughout the genomes of the investigated species (Pucci et al., 2018). However, we suggest that the dispersion of H3 observed in *R. punctularia* karyotype may signals the Gypsy itself, because a segment of the histone H3 gene of *R. punctularia* has high similarity to Gypsy.

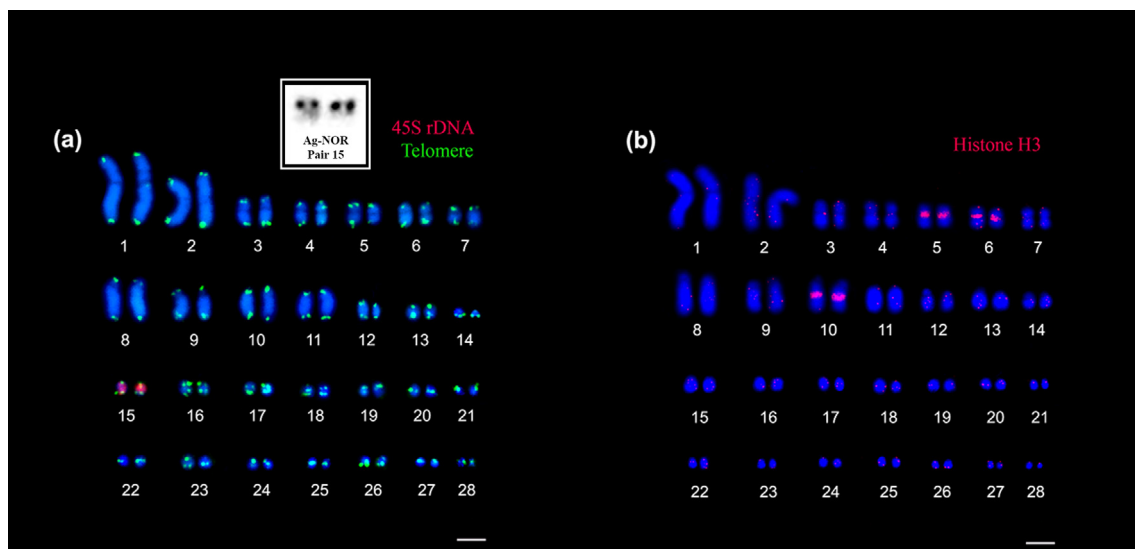


Fig. 2. Mapping of 45S rDNA, telomeric sequences and histone H3 genes in the *Rhinoclemmys punctularia* karyotype. In a) the 45S rDNA (red) locates to a pair of microchromosomes (Ag-NOR in box), while telomeric signals (green) are seen in the distal regions of all chromosomal pairs; b) clusters of histone H3 genes (red) are seen in the pericentromeric regions of three chromosome pairs (pairs 5, 6, and 10), while additional signals are scattered throughout the karyotype. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

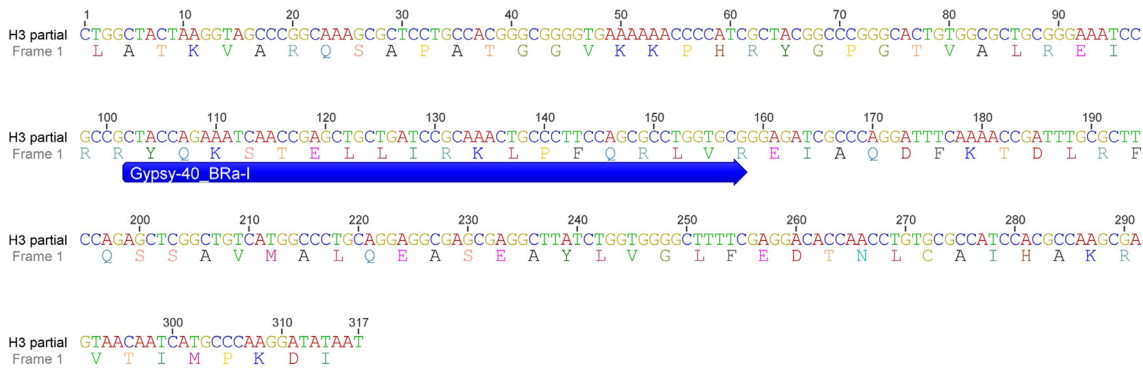


Fig. 3. Analysis of the partial sequence of H3 from *Rhinoclemmys punctularia*. Highlight indicates the sequence spanning nucleotides 102–158, which exhibits 82% similarity to the retrotransposon LTR Gypsy-40_BRa-I of *Brassica*. In frame 1, the line shows the amino acid sequence, which is 97% similar to a partial sequence of histone H3 from *Ylistrum japonicum japonicum*.

The cycle of a transposable element (TE) consists of invasion of the host genome, where it increases the number of copies, followed by an inactivation and, finally, elimination (Kidwell and Lisch, 2001). Therefore, in general, TEs are present as non-autonomous copies in the genomes, generated in a degradation process (Fernández-Medina et al., 2012). However, these mutated sequences may not only behave “neutrally” in genomes; studies show that these sequences, after inactivation, can go through an evolutionary process (molecular co-optation), where they lose their TE characteristics and acquire new genomic functions, which may even favor the host (Schemberger et al., 2016). In this context, it is likely that the retroelement Gypsy has been recruited for new functions in the genome of *R. punctularia*.

Our amino acid sequence-based homology modeling of the H3 of *R.*

punctularia with respect to that of the green turtle, *Chelonia mydas*, suggest that the two species have structural and functional similarities with conserved internal regions. From this, we infer that, despite the insertion of Gypsy, the H3 protein remains functional in *R. punctularia*. These data support our hypothesis of molecular co-optation of the Gypsy retroelement. The histone gene H3 of the turtle *Chelonia mydas* (used in the present study as a model for amino acid sequence homology) also appears to have a Gypsy retroelement insert, because this species has the same amino acid sequence as the insertion region when compared to *Rhinoclemmys punctularia*. These insertions do not appear to interfere with the functional pattern of proteins and open perspectives for investigations of insertions of transposable elements into histone genes in other turtles species.

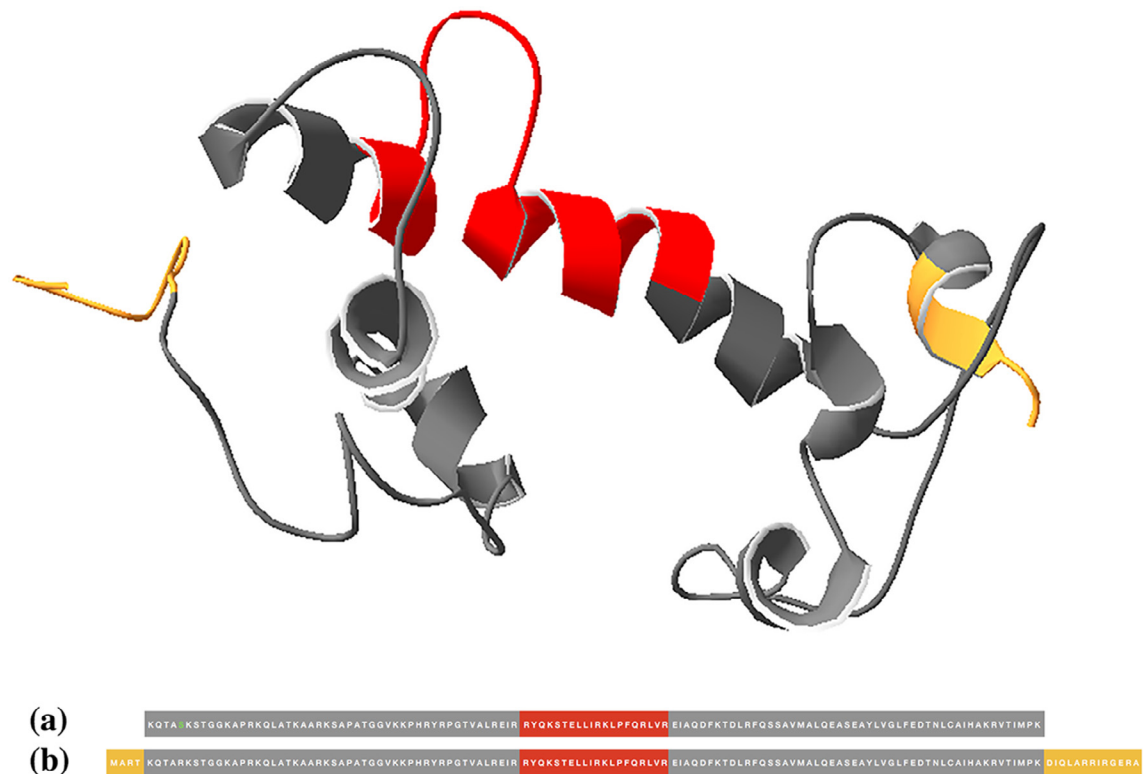


Fig. 4. Comparative modeling of Histone H3. For comparative modeling, the primary structures generated for the H3.2 sequences of the turtle, *Chelonia mydas* (NCBI database, PDB mmdb_2HIO.pdb, mmdb_2IO5.pdb, and mmdb_3LEL.pdb) were used. Yellow indicates amino acid sequence fragments of the reference genome (*C. mydas*) that were not amplified from *Rhinoclemmys punctularia*. Gray represents the extensive homology between the H3.2 sequences of the turtles, *C. mydas* and *R. punctularia*. Red indicates the fragment which represents the Gypsy retrotransposon inserted in histone, demonstrating high similarity including the reference genome (*C. mydas*). Our findings indicate that the insertion of the retroelement does not appear to alter the function-related structures of the protein. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

It has been proposed that LTR-retrotransposons can contribute genetic material for the evolution of multigenic functions, such as by providing different types of coding regions that are “ready to use”. Indeed, the open reading frame for the Gypsy retrotransposon gag domain is a main donor region for new genomic functions (Kim et al., 2005; Merenciano et al., 2016; McCullers and Steiniger, 2017). The largest fraction of repetitive DNA is contributed by retrotransposons. When they lose their capacity for transposition, yours remaining fragments contain the major ingredients of regulatory networks: cisregulatory sequences, transcription start sites, and even genes that can be transcribed. Studies suggest that they can contribute to both regulation and transcription (Göke and Ng, 2016). In the future, new advances in genomic analysis will allow us to understand how these retroelements coevolve with and contribute to their host sequences.

5. Conclusion

In conclusion, our data allow us to infer that: (i) the chromosomal differentiation of *R. punctularia* may reflect pericentric inversions and/or centromeric repositioning; (ii) the 2n variation in the genus *Rhinoclemmys* (2n = 52–56) is reflected by an increase in the number of acrocentric chromosome pairs in *R. punctularia* and this may suggest karyotypic reorganization events such as centric fissions; (iii) the 45S rDNA presents a conserved character for turtles, regarding the number of gene locus (a single pair), and this is likely to reflect a plesiomorphic chromosomal condition in Testudines; (iv) the H3 sequence analysis demonstrates that the insertion of a retroelement did not alter the functionality of the protein in *R. punctularia*, and it is probable that the retroelement Gypsy has been recruited for new functions in the genome of *R. punctularia* (molecular co-optation).

CRedit authorship contribution statement

Manoella Gemaque Cavalcante: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - review & editing, Writing - original draft. **Luciano Farias Souza:** Investigation. **Marcelo Ricardo Vicari:** Investigation, Writing - review & editing. **Carlos Eduardo Matos de Bastos:** Methodology. **Jaime Viana de Sousa:** Softwar. **Cleusa Yoshiko Nagamachi:** Writing - review & editing. **Julio Cesar Pieczarka:** Writing - review & editing. **Cesar Martins:** Writing - review & editing. **Renata Coelho Rodrigues Noronha:** Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors thank ICMBio (Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation) for the collection permit (Registration: 42642). This work was supported by a project coordinated through JCP CNPq (Universal–Proc. 475013/2012-3) and National Bank for Economic and Social Development – BNDES (Operação 2.318.697.0001), and by a project coordinated through C.Y.N (Pró-Amazônia Proc 47/2012). CYN (305880/2017-9) and JCP (305876/2017-1) are grateful to CNPq for Productivity Grants. This study is part of the Doctoral thesis of MGC, who was a recipient of a CAPES Scholarship in Fisheries and Aquatic Ecology (PPGEAP), Federal University of Pará, Brazil.

References

Barros, R.M., Sampaio, M.M., Assis, M.F., Ayres, M., Cunha, O.R., 1975. A karyological study of *Geomyda punctularia punctularia* (Daudin, 1802) from the Amazon region of Brazil (Chelonia, Emydidae). *Acta Amazônica* 5 (1), 95–96. <https://doi.org/10.1590/1809-43921975051095>.

- Bickham, J.W., Baker, R.J., 1976a. Chromosome homology and evolution of Emydid turtles. *Chromosoma* 54, 201–219. <https://doi.org/10.1007/bf00293451>.
- Bickham, J.W., Baker, R.J., 1976b. Karyotypes of some Neotropical turtles. *Copeia* 703–708. <https://doi.org/10.2307/1443452>.
- Bourc'His, D., Bestor, T.H., 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431, 96–99. <https://doi.org/10.1038/nature02886>.
- Bryk, M., Banerjee, M., Conte, D., Curcio, M.J., 2001. The Sgs1 helicase of *Saccharomyces cerevisiae* inhibits retrotransposition of Ty1 multimeric arrays. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5374–5388. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.16.5374-5388.2001>.
- Carr, J.L., Bickham, J.W., 1986. Phylogenetic implications of karyotypic variation in the Batagurinae (Testudines: Emydidae). *Genetica* 70, 89–106. <https://doi.org/10.1007/BF00123580>.
- Cavalcante, M.G., Bastos, C.E.M.C., Nagamachi, C.Y., Pieczarka, J.C., Vicari, M.R., Noronha, R.C.R., 2018. Physical mapping of repetitive DNA suggests 2n reduction in Amazon turtles *Podocnemis* (Testudines: Podocnemididae). *PLoS One* 13 (5), e0197536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197536>.
- Chuong, E.B., Elde, N.C., Feschotte, C., 2017. Regulatory activities of transposable elements: from conflicts to benefits. *Nat. Rev. Genet.* 2, 71–86. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.139>.
- Colgan, D.J., McLauchlan, A., Wilson, G.D.F., Livingston, S.P., Edgecombe, G.D., Macaranas, J., et al., 1998. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aust. J. Zool.* 46 (5), 419. <https://doi.org/10.1071/zo98048>.
- Fantini, C., Giuliano-Caetano, L., 2014. Cytogenetic characterization of two turtle species: *Trachemys dorbignii* and *Trachemys scripta elegans*. *Caryologia* 61 (3), 253–257. <https://doi.org/10.1080/00087114.2008.10589637>.
- Fernández-Medina, R.D., Ribeiro, J.M.C., Carareto, C.M.A., Velasque, L., Struchiner, C.J., 2012. Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics* 13, 272. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-272>.
- Gasior, S.L., Roy-Engel, A.M., Deininger, P.L., 2008. ERCC1/XPF limits L1 retrotransposition. *DNA Repair (Amst.)* 7, 983–989. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.02.006>.
- Geer, L.Y., Marchler-Bauer, A., Geer, R.C., Han, L., He, J., He, S., Liu, C., Shi, W., Bryant, S.H., 2009. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res.* 2010 38 (Database issue), D492–D496 PMID: 19854944.
- Gerlach, W.L., Bedbrook, J.R., 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* 7, 1885–1969. <https://doi.org/10.1093/nar/7.7.1869>.
- Göke, J., Ng, H.H., 2016. CTRL + INSERT: retrotransposons and their contribution to regulation and innovation of the transcriptome. *EMBO Rep.* 17 (8), 1131–1144. <https://doi.org/10.15252/embr.201642743>.
- Guerra, M.S., 1986. Reviewing the chromosome Nomenclature of Levan et al. *Braz. J. Genetics* IX (4), 741–743. <https://doi.org/10.1590/S0100-84551997000400001>.
- Guichard, E., Peona, V., Tagliazucchi, G.M., Abitante, L., Jagoda, E., Musella, M., Ricci, M., Rubio-Roldán, A., Sarno, S., Luiselli, D., Pettener, D., Taccioli, C., Pagani, L., Garcia-Perez, J.L., Boattini, A., 2018. Impact of non-LTR retrotransposons in the differentiation and evolution of anatomically modern humans. *Mobile DNA*. <https://doi.org/10.1186/s13100-018-0133-4>.
- Guillon, J.-M., Guéry, L., Hulin, V., Girondot, M., 2012. A large phylogeny of turtles (Testudines) using molecular data. *Contrib. Zool.* 81 (3), 147–158. <https://doi.org/10.1163/18759866-08103002>.
- Gunski, R.J., Cunha, I.S., Degrandi, T.M., Ledesma, M., Garner, A.D.V., 2013. Cytogenetic comparison of *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis*: a case of inversion and duplication involving constitutive heterochromatin. *Genet. Mol. Biol.* 36 (3), 353–356. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013005000029>.
- Höltje, H.D., Sippl, W., Rognan, D., Folkers, G., 2003. *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*. Introduction to Comparative Protein Modeling. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 310.
- Howell, W.M., Black, D.A., 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36, 1014–1015. <https://doi.org/10.1007/BF01953855>.
- Ijdo, J.W., Wells, R.A., Baldini, A., Reeders, S.T., 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res.* 19 (17), 4780. <https://doi.org/10.1093/nar/19.17.4780>.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Stur-Rock, S., et al., 2012. Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.
- Kemp, J.R., Longworth, M.S., 2015. Crossing the LINE toward genomic instability: LINE-1 retrotransposition in cancer. *Front. Chem.* <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00068>.
- Kidwell, M.G., Lisch, D.R., 2001. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution* 55, 1–24. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb01268.x>.
- Kidwell, M.G., 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115, 49–63. <https://doi.org/10.1023/A:1016072014259>.
- Killebrew, F.C., 1977. Mitotic chromosomes of turtles IV. The Emydidae. *Texas J. Sci.* 29, 245–253.
- Kim, M.K., Claiborn, K.C., Levin, H.L., 2005. The long terminal repeat-containing retrotransposon Tf1 possesses amino acids in Gag that regulate nuclear localization and particle formation. *J. Virol.* 79, 9540–9555. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.9540-9555.2005>.
- Kohany, O., Gentles, A.J., Hankus, L., Jurka, J., 2006. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: Repbase submitter and censor. *BMC*

- Bioinf. 25, 474. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-474>.
- Le, M., McCord, W., 2008. Phylogenetic relationships and biogeographical history of the genus *Rhinoclemmys* Fitzinger, 1835 and the monophyly of the turtle family Geoemydidae (Testudines: Testudinoidea). *Zool. J. Linn. Soc.* 153 (4), 751–767. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2008.00413.x>.
- McCullers, T.J., Steiniger, M., 2017. Transposable elements in *Drosophila*. *Mob. Genet. Elem.* 7 (3), 1–18. <https://doi.org/10.1080/2159256X.2017.1318201>.
- Merenciano, M., Ullastres, A., de Cara, M.A.R., Barrón, M.G., González, J., 2016. Multiple independent retroelement insertions in the promoter of a stress response gene have variable molecular and functional effects in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 12, e1006249. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006249>. PMID: 27517860.
- Montiel, E.E., Badenhorst, D., Lee, L.S., Literman, R., Trifonov, V., Valenzuela, N., 2016. Cytogenetic insights into the evolution of chromosomes and sex determination reveal striking homology of turtle sex chromosomes to amphibian autosomes. *Cytogenet. Genome Res.* <https://doi.org/10.1159/000447478>.
- Noieto, R.B., Kantek, D.L.Z., Swarça, A.C., Dias, A.L., Fenocchio, A.S., Cestari, M.M., 2006. Karyotypic characterization of *Hydromedusa tectifera* (Testudines, Pleurodira) from the upper Iguacu River in the Brazilian state of Paraná. *Genet. Mol. Biol.* 29 (2 São Paulo). <https://doi.org/10.1590/S141547572006000200011>.
- Noronha, R.C.R., Barros, L.M.R., Araújo, R.E.F., Marques, D.F., Nagamachi, C.Y., Martins, C., Pieczarka, J.C., 2016. New insights of karyoevolution in the Amazonian turtles *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemidae). *Mol. Cytogenet.* 9, 73. <https://doi.org/10.1186/s13039-016-0281-5>.
- Okazaki, S., Ishikawa, H., Fujiwara, H., 1995. Structural analysis of TRAS1, a novel family of telomeric repeat-associated retrotransposons in the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4545–4552. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.8.4545>.
- Orgel, L.E., Crick, F.H., 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284, 604–607. <https://doi.org/10.1038/284604a0>.
- Petrov, D.A., 2001. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet.* 17, 23–28. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02157-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02157-0).
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W., 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 2934–2938. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934>.
- Pough, F.H., Janis, C.M., Heiser, J.B., 2013. *Vertebrate Life*, 9th ed. Pearson, pp. 720.
- Pucci, M.B., Nogaroto, V., Moreira-Filho, O., Vicari, M.R., 2018. Dispersion of transposable elements and multigene families: microstructural variation in *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae) genomes. *Genet. Mol. Biol.* 41, 585–592. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0121>.
- Richardson, S.R., Doucet, A.J., Kopera, H.C., Moldovan, J.B., García-Pérez, J.L., Moran, J.V., 2015. The influence of LINE-1 and SINE retrotransposons on mammalian genomes. *Microbiol. Spectr.* <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0061-2014>.
- Rocchi, M., Archidiacono, N., Schempp, W., Capozzi, O., Stanyon, R., 2012. Centromere repositioning in mammals. *Heredity* 108, 59–67. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.101>.
- Sander, C., Schneider, R., 1991. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins* 9, 56–68. <https://doi.org/10.1002/prot.340090107>.
- 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 (2), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.08.034>.
- Servant, G., Deininger, P.L., 2015. Insertion of retrotransposons at chromosome ends: adaptive response to chromosome maintenance. *Front. Genet.* 6, 358. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00358>.
- Sochorová, J., García, S., Gálvez, F., Symonová, R., Kovařík, A., 2018. Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma* 127 (1), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0651-8>.
- Takahashi, H., Okazaki, S., Fujiwara, H., 1997. A new family of site-specific retrotransposons, SART1, is inserted into telomeric repeats of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Res.* 25, 1578–1584. <https://doi.org/10.1093/nar/25.8.1578>.
- Vahos, S.Y.M., 1998. *Caracterización citogenética de Rhinoclemmys diademata* (Mertens, 1954) (Testudinata: Emydidae). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Department of Biology.
- Viana, P.F., Ribeiro, L.B., Lima, T., Carvalho, V.T., Vogt, R.C., et al., 2016. An optimized protocol for obtaining mitotic chromosomes from cultured reptilian lymphocytes. *Nucleus*. <https://doi.org/10.1007/s13237-016-0174-3>.
- Webb, B., Sali, A., 2014. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinf.* 47. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0506s47>.
- Yin, Y., Zhou, L., Yuan, S., 2018. Enigma of retrotransposon biology in mammalian early embryos and embryonic stem cells. *Stem Cells Int.* <https://doi.org/10.1155/2018/6239245>.

RESEARCH ARTICLE

Evolutionary insights in Amazonian turtles (Testudines, Podocnemididae): co-location of 5S rDNA and U2 snRNA and wide distribution of Tc1/Mariner

Manoella Gemaque Cavalcante, Cleusa Yoshiko Nagamachi, Julio Cesar Pieczarka and Renata Coelho Rodrigues Noronha*

ABSTRACT

Eukaryotic genomes exhibit substantial accumulation of repetitive DNA sequences. These sequences can participate in chromosomal reorganization events and undergo molecular cooption to interfere with the function and evolution of genomes. In turtles, repetitive DNA sequences appear to be accumulated at probable break points and may participate in events such as non-homologous recombination and chromosomal rearrangements. In this study, repeated sequences of 5S rDNA, U2 snRNA and Tc1/Mariner transposons were amplified from the genomes of the turtles, *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis*, and mapped by fluorescence *in situ* hybridization. Our data confirm the $2n=28$ chromosomes for these species (the second lowest $2n$ in the order Testudines). We observe high conservation of the co-located 5S rDNA and U2 snRNA genes on a small chromosome pair (pair 13), and surmise that this represents the ancestral condition. Our analysis reveals a wide distribution of the Tc1/Mariner transposons and we discuss how the mobility of these transposons can act on karyotypic reorganization events (contributing to the $2n$ decrease of those species). Our data add new information for the order Testudines and provide important insights into the dynamics and organization of these sequences in the chelonian genomes.

KEY WORDS: Molecular cytogenetics, Mobile DNA, Karyotype evolution

INTRODUCTION

The wide variation in the size and organization of eukaryotic genomes is attributed principally to the accumulation of repetitive DNA sequences (Feschotte and Pritham, 2007; Kordis, 2009). Studies suggest that sites rich in repetitive sequences can be critical points for double-strand breaks, non-homologous recombination and chromosomal reorganization in several organisms (Cazaux et al., 2011; Barros et al., 2017; Cavalcante et al., 2018). Moreover, the high mobility of certain sequences (as transposable elements, TEs) can enable them to interrupt the coding sequences of

endogenous genes and modify their expression (Kemp and Longworth, 2015; Yin et al., 2018), or be co-opted for the regulation of host genes and thereby interfere with genome function and evolution (McCullers and Steiniger, 2017; Guichard et al., 2018).

The genes encoding the 5S rRNA have the smallest repeating unit length among ribosomal genes (Salina and Adonina, 2018). Due to its conserved character, the 5S rDNA has been widely used as a marker in molecular cytogenetics for the characterization of various species. Most of the investigated karyotypes have relatively few (often just one) 5S rDNA loci (Sochorová et al., 2018; Frade et al., 2019). The 5S rDNA has been reported to co-localize with other multigenes, such as histones genes and small nuclear RNAs (snRNAs) of the U family (Novotná et al., 2011; Piscor et al., 2018). These associations seem to indicate an old and linked organization of such sequences in the genomes of the relevant species (Cabral-de-Mello et al., 2011).

Another group of multigenes often used for mapping in molecular cytogenetics are the snRNAs, which are U2 spliceosomal RNAs. Although the U2 snRNA genes show some sequence conservation, *in situ* mapping reveals that their distribution patterns can be widely diverse among the karyotypes of some groups. For example, the U2 snRNAs can be (i) organized into a single or small number of chromosomal clusters, as reported in fish (Araya-Jaime et al., 2017; Piscor et al., 2018) and some invertebrates (Almeida et al., 2017; Anjos et al., 2018); (ii) arranged in multiple clusters, as observed in some fish (Xu et al., 2017); (iii) dispersed in small copies throughout the genome, as in fish of the family Batrachoididae (Úbeda-Manzanaro et al., 2010); (iv) allocated on supernumerary chromosomes, as noted in the grasshopper, *Abracris flavolineata* (Bueno et al., 2013); and (v) in sex chromosomes, as described in grasshoppers of the subfamily Melanoplinae (Palacios-Gimenez et al., 2013). This broad heterogeneity of chromosomal location observed for U2 snRNA genes may be related to the evolutionary history of the snRNA U family, whose members can behave as mobile elements and exhibit very little conserved synteny (Marz et al., 2008).

The largest group of Class II eukaryotic transposons is composed of members related to the Mariner and Tc1 families (Benjamin et al., 2007). In terms of an organizational pattern, Tc1/Mariner is described as being predominantly dispersed along the karyotypes of several species (Schemberger et al., 2016); however, accumulations have been reported in heterochromatic regions (Ayes-Alves et al., 2017), terminal regions (Schemberger et al., 2016; Gouveia et al., 2017) and sex chromosomes (possibly caused by lack of recombination) (Schemberger et al., 2016). In addition, co-location of rDNA sites with Tc1/Mariner clusters has been observed and it has been proposed that the transposon can participate in rDNA dispersion through recombination events and/

Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Cytogenetics Laboratory, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil.

*Author for correspondence (renatacrn@gmail.com)

© C.Y.N., 0000-0003-1516-2734; J.C.P., 0000-0003-2951-8877; R.C.R.N., 0000-0001-8815-2399

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 3 December 2019; Accepted 18 March 2020

or transposition-derived mobilization (Ayres-Alves et al., 2017; Gouveia et al., 2017).

The order Testudines is considered one of the oldest lineages among existing vertebrates (Ferri, 2002). Cytogenetic studies have revealed wide karyotypic variation among their representatives ($2n=26-68$), which is attributed mainly to the number of microchromosomes (Montiel et al., 2016; Cavalcante et al., 2018). Species of genus *Podocnemis* (Pleurodira, Podocnemididae) present the second smallest diploid number in the order ($2n=28$) (Noronha et al., 2016; Cavalcante et al., 2018). Cytogenomic studies indicate a derived condition for *Podocnemis* and suggest that multiple fusions involving microchromosomes may have been responsible for the reduction of $2n$ in this genus (Montiel et al., 2016; Cavalcante et al., 2018).

In turtles, cytogenomic studies based on multiple-copy DNA sequences have provided important data on the dynamics of these sequences and how they can interfere with the genomic organization of the group. Although the organizational dynamics of 5S rDNA, U2 snRNA and Tc1/Mariner have been studied in different groups of animals, such data are limited among reptiles (Sochorová et al., 2018). At present, no *in situ* mapping data are available for these sequences in turtles (order Testudines). Here, we report the chromosomal locations of the 5S rDNA, U2 snRNA, and Tc1/Mariner sequences in the turtle species, *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis*, and seek to further understand the genomic organizations among reptiles and identify evolutionary factors that may be involved in the wide karyotypic diversity of the order Testudines.

RESULTS

Both species presented a diploid number of 28 chromosomes. *Podocnemis expansa* had a fundamental number (FN) of 54 and a

karyotype formula of $24\ m/sm+2st+2a$, while *P. unifilis* presented with $FN=52$ and a karyotype formula of $22\ m/sm+2st+4a$.

In situ mapping with 5S rDNA probes revealed pericentric signals in a single chromosomal pair (pair 13) for both *P. expansa* and *P. unifilis* (Fig. 1A,B).

Hybridizations of U2 snRNA were observed in the pericentric region of the same chromosomal pair as the 5S rDNA (pair 13) for both species (Fig. 1C,D).

Double-FISH using 5S and U2 probes revealed that these signals co-localized similarly in chromosome pair 13 of both species (Fig. 2).

The transposon, Tc1/Mariner, was widely distributed along the karyotypes of *P. expansa* and *P. unifilis*. The Tc1/Mariner signal was predominantly dispersed throughout the euchromatic region, with pericentric accumulations on some chromosomal pairs. Heterochromatic regions of chromosome pair 10 of *P. expansa* and pairs 9 and 10 of *P. unifilis* had low signal intensities for Tc1/Mariner (Fig. 1E,F).

DISCUSSION

The genus *Podocnemis* has the second-smallest diploid number among the chelonians. Our results corroborate previous reports that *P. expansa* and *P. unifilis* (Montiel et al., 2016; Noronha et al., 2016) have a diploid number of $2n=28$ chromosomes. Molecular cytogenetics studies indicate that the smaller diploid numbers of *Podocnemis* represent a derived condition; multiple fusions involving microchromosomes appear to be responsible for the reduction of the diploid number (Montiel et al., 2016; Cavalcante et al., 2018). Previously, Cavalcante et al. (2018) demonstrated evidence of possible chromosomal fusions in these species. Multiple interstitial telomeric signals are seen on seven chromosomal pairs of *Podocnemis* (pairs 1–5, 7 and 13),

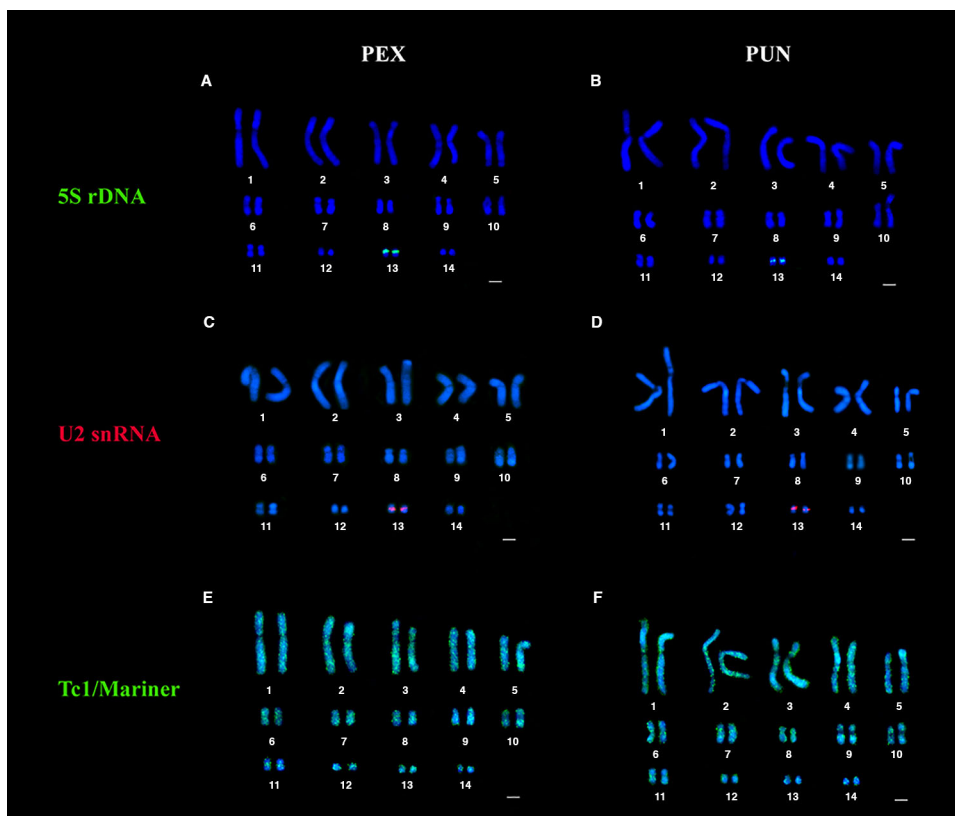


Fig. 1. Physical mapping of repetitive DNA. The codes PEX and PUN refer to the karyotypes of *P. expansa* and *P. unifilis*, respectively. The 5S rDNA (green) is detected in a single chromosomal pair (pair 13) in (A) PEX and (B) PUN. Mapping of the U2 snRNA (red) also yields signals on chromosome pair 13 for (C) PEX and (D) PUN. The transposon, Tc1/Mariner (green), is widely distributed along the karyotypes of (E) PEX and (F) PUN.

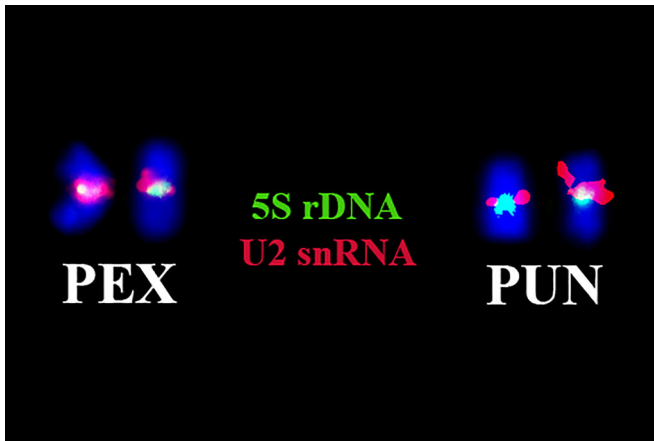


Fig. 2. Double-FISH with 5S rDNA and U2 snRNA probes. Double-FISH using probes for the 5S rDNA (green) and U2 snRNA (red) reveals that these sequences co-localize similarly in chromosome pair 13 of *P. expansa* (PEX) and *P. unifilis* (PUN).

suggesting chromosomal sites that may be involved in these genomic reorganization events. Mobile elements are often found at chromosomal break points (Barros et al., 2017). Therefore, it is likely that TEs such as Tc1/Mariner, which is widely distributed throughout the genomes of *P. expansa* and *P. unifilis*, were involved in the karyotypic reorganizations thought to have occurred in these species.

Although only limited *in situ* rDNA location data are available for other reptiles, the 18S and 5S rDNAs are typically found in only one chromosomal pair: 18S sequences are usually found in a microchromosome, while the 5S sequences may be found in a macro- or microchromosome (Srikulnath et al., 2015). Cavalcante et al. (2018) reported that the 45S rDNA sequences of *P. expansa* and *P. unifilis* are located in the pericentric region of the first pair of macrochromosomes, in association with interstitial telomeric sequence regions. The authors proposed that the 45S rDNA was located on a pair of microchromosomes early during the karyotypic evolution of these species (similar to the location described for more basal chelonian species, which have high 2n), and it was subsequently relocated to the first pair of macrochromosomes through fusion events. The present report offers the first information about the 5S rDNA locus in turtles. Our results demonstrate the conserved character of a single gene locus (chromosome pair 13) in *P. expansa* and *P. unifilis* and indicate that despite the genomic reorganization proposed for *P. expansa* and *P. unifilis*, there is a high conservation of 5S genes in smaller chromosomes across *Podocnemis*. In other reptiles (as in squamates), the 5S rDNA is also present in only one chromosome pair, although with different chromosomal locations (Srikulnath et al., 2011; 2015). In fish, Martins and Galetti-Junior (1999) proposed that the presence of 5S rDNA in only one pair of chromosomes represents the ancestral condition. This seems also to be the case for reptiles. We further suggest that a strong purifying selection acts on 5S rDNA clusters, preventing these multigenes from spreading in the genomes of *P. expansa* and *P. unifilis*.

The snRNA U2 signals were observed in the same chromosomal pair as the 5S rDNA in *P. expansa* and *P. unifilis* (chromosome pair 13). Cavalcante et al. (2018) previously reported that chromosome pair 13 presented pericentromeric signs of histone H3 genes in *P. expansa* and interstitial telomeric sequences in *P. expansa* and *P. unifilis*. Thus, chromosomal pair 13 seems to harbor multiple

repetitive sequences. In animal genomes, the association/co-location of multigene families has been reported for rRNAs, histones genes and snRNAs (Cabral-de-Mello et al., 2011; Cavalcante et al., 2018). According to studies by Dover (1989) and Liu and Fredga (1999), these links between multigenes are important for maintaining the conservation of multiple matrices. It has also been hypothesized that these associations among multigene families may play a functional role in nuclear organization (Kaplan et al., 1993; Cabral-de-Mello et al., 2011).

The wide dispersion observed for Tc1/Mariner in *P. expansa* and *P. unifilis* is consistent with that previously described for transposon (Schemberger et al., 2016). Heterochromatic accumulations of Tc1/Mariner have also previously been reported in some fish (Ayres-Alves et al., 2017; Gouveia et al., 2017). This may indicate that there is a selection pressure against inserting TEs into euchromatin; this could reflect ectopic exchanges (Oliveira et al., 2013) and the low recombination rates of these regions, which reduces insertion damage (Delaurière et al., 2009). It is expected that transposable elements active and recently acquired will be preferentially located in the euchromatin (Oliveira et al., 2013). Therefore, the Tc1/Mariner sequences present in *P. expansa* and *P. unifilis* can be considered recent, due to their wide euchromatic dispersion and few heterochromatic accumulations. It is important to highlight the existence of considerable intragenomic heterogeneity among the TEs; the amplification products of TEs are mixtures of various genomic sequences of unknown composition. Therefore, the derived probes would hybridize to different genomic locations at different intensities. If, as is possible, this occurred in the present study for Tc1/Mariner hybridizations, it would explain why some signals were weak while others were strong, and some signals were clustered while others were dispersed.

Noronha et al. (2016) demonstrated wide distribution of the retrotransposon, Rex 6, in euchromatin of *P. expansa* and *P. unifilis*. The authors emphasized that TE mobility can produce structural changes, trigger chromosomal rearrangements and modify gene regulation patterns. In general, TEs are present as non-autonomous copies in the genomes that are generated by a degradation process (Fernández-Medina et al., 2012). However, it is possible to detect transcriptional activity at the limits of degenerated sequences, as demonstrated in the fish family, Parodontidae (Schemberger et al., 2016), where molecular cooption of these sequences was detected even after their inactivation. In this sense, given the intense euchromatic presence of Tc1/Mariner in *P. expansa* and *P. unifilis*, it is possible to infer that transposon activity may alter gene regulation, confer new genomic functions and/or act on the karyotypic reorganization events that resulted in the decrease of 2n in these species.

Conclusion

We herein demonstrate that the gene locus number for the 5S rDNA is highly conserved (only one chromosome pair) in *P. expansa* and *P. unifilis*. A similar result was previously obtained for the 45S rDNA loci of these species (although in distinct chromosome pairs), suggesting that a low number of rDNA loci is consistent in this group and represents a plesiomorphic character. We also demonstrate that there are links between the multigenes, 5S rDNA and U2 snRNA, which likely act to maintain their matrices in these species. Finally, we show that Tc1/Mariner is widely dispersed along the karyotypes of the species (preferentially in euchromatic regions). Based on this, we suggest that these transposons may alter gene regulation, have their degenerate sequences co-opted for new genomic functions and/or participate in karyotypic reorganization

events. Such data have not previously been reported for the order Testudines, and our findings provide important insight into the dynamics and organization of these repetitive sequences in chelonian genomes.

MATERIALS AND METHODS

Specimens and ethics committee approval

The biological materials of *P. expansa* and *P. unifilis* specimens were collected at the Zoobotanical Park, Mangal das Garças, Belém, Pará, Brazil. Five males and five females were analyzed for each species. This study was conducted in accordance with ethical recommendations for the use and management of turtles in research, under a protocol approved by the Ethics Committee on Experimental Animal Research (license number 68–2015) and the Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO; license number 42642–5).

Chromosome preparation and probe production

Lymphocyte culture and chromosomal preparations were performed as described by Viana et al. (2016). Genomic DNA was extracted using GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The genes encoding 5S rDNA, U2 snRNA and Tc1/Mariner were amplified by polymerase chain reaction (PCR), using the following primers: 5S rDNA, 5rF (5'-GCC ACA CCA CCC TGA ACA C-3') and 5rR (5'-GCC TAC GAC ACC TGG TAT TC-3') (Suárez et al., 2017); U2 snRNA, 5'-TCT CGG CCT (AT) (AT)T GGC TAA-3' and 5'-G(AC)G GTA (GC) TG CAA TAC CGG-3' (Colgan et al., 1998); and Tc1/Mariner, MAR-188F5'-ATCTGRAGCTATAATCACT and MAR-251R 5'-CAAAGATGTCCTGGGTGTG (Lampe et al., 2003).

The reaction mixtures contained 80 ng genomic DNA, 0.2 μM of each primer, 0.16 mM dNTPs, 1 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂ and reaction buffer 10x (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCL). The amplification conditions were as follows: 4 min - 95°C/(1 min - 95°C/1 min - 60°C/2 min - 74°C) for 35 cycles/5 min - 74°C for 5S rDNA and Tc1/Mariner; and 4 min - 95°C/(1 min - 95°C/1 min - 57°C/2 min - 74°C) 30 cycles/5 min - 74°C for U2 snRNA. The amplifications generated bands with the following sizes: 120 bp for 5S rDNA; 220 bp for U2 snRNA; and multiple bands (300, 500 and 1000 bp) for Tc1/Mariner.

The probes were labeled by nick-translation with biotin 14-dATP or digoxigenin 16-dUPT using a BioNick Labeling System (Invitrogen) and a DIG-Nick kit (Roche Applied Science), respectively.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

FISH was performed as described by Pinkel et al. (1986), with some adaptations. Signals were detected with avidin-CY3 (Sigma-Aldrich) and antidigoxigenin-FITC (Roche). Chromosomes were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 0.2 μg ml⁻¹) in Vectashield H-100 mounting medium (Vector) and analyzed under an epifluorescence microscope (Nikon H550S).

Acknowledgements

The authors thank Cesar Martins (UNESP-Botucatu) and Marcelo Vicari (UEPG) for primers for cytogenetic probes, and ICMBio (Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation) for the collection permit (ICMBio Registration: 42642).

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: M.G.C., R.C.R.N.; Methodology: M.G.C., R.C.R.N.; Validation: M.G.C.; Formal analysis: M.G.C., J.C.P.; Investigation: M.G.C.; Resources: M.G.C., R.C.R.N.; Data curation: M.G.C., R.C.R.N.; Writing - original draft: M.G.C.; Writing - review & editing: C.Y.N., J.C.P., R.C.R.N.; Visualization: R.C.R.N.; Supervision: C.Y.N., J.C.P., R.C.R.N.; Project administration: C.Y.N., J.C.P., R.C.R.N.; Funding acquisition: C.Y.N., J.C.P., R.C.R.N.

Funding

This study was conducted as part of the doctoral thesis of M.G.C., who was a recipient of a CAPES Scholarship in Aquatic Ecology and Fishing (PPGEAP), UFPA. This work was also supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq) (Universal–Proc. 475013/2012-3) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Pró-amazônia–47/2012).

References

- Almeida, B. R. R., Milhomem-Paixão, S. S. R., Noronha, R. C. R., Nagamachi, C. Y., Costa, M. J. R., Pardal, P. O., Coelho, J. S. and Pieczarka, J. C. (2017). Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). *BMC Genet.* **18**, 35. doi:10.1186/s12863-017-0494-6
- Anjos, A., Paladini, A., Mariguela, T. C. and Cabral-de-Mello, D. C. (2018). U1 snDNA chromosomal mapping in ten spittlebug species (Cercopidae, Auchenorrhyncha, Hemiptera). *Genome* **61**, 59–62. doi:10.1139/gen-2017-0151
- Araya-Jaime, C., Lam, N., Pinto, I. V., Méndez, M. A. and Iturra, P. (2017). Chromosomal organization of four classes of repetitive DNA sequences in killifish *Orestias ascotanensis* Parenti, 1984 (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae). *CompCytogen* **11**, 463–475. doi:10.3897/compcytogen.v11i3.11729
- Ayres-Alves, T., Cardoso, A. L., Nagamachi, C. Y., de Sousa, L. M., Pieczarka, J. C. and Noronha, R. C. R. (2017). Karyotypic evolution and chromosomal organization of repetitive DNA sequences in species of panaque, panaolus, and scobinancistrus (Siluriformes and Loricariidae) from the amazon basin. *Zebrafish* **14**, 251–260. doi:10.1089/zeb.2016.1373
- Barros, A. V., Wolski, M. A. V., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Moreira-Filho, O. and Vicari, M. R. (2017). Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? *Gene* **608**, 20–27. doi:10.1016/j.gene.2017.01.013
- Benjamin, B., Yves, B. and 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**, 105–120. doi:10.1007/s10709-006-0025-2
- Bueno, D., Palacios-Gimenez, O. M. and Cabral-de-Mello, D. C. (2013). Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *PLoS ONE* **8**, e66532. doi:10.1371/journal.pone.0066532
- Cabral-de-Mello, D. C., Oliveira, S. G., de Moura, R. C. and Martins, C. (2011). Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC Genet.* **12**, 88. doi:10.1186/1471-2156-12-88
- Cavalcante, M. G., Bastos, C. E. M. C., Nagamachi, C. Y., Pieczarka, J. C., Vicari, M. R. and Noronha, R. C. R. (2018). Physical mapping of repetitive DNA suggests 2n reduction in Amazon turtles *Podocnemis* (Testudines: Podocnemididae). *PLoS One* **13**, e0197536. doi:10.1371/journal.pone.0197536
- Cazaux, B., Catalan, J., Veyrunes, F., Douzery, E. J. P. and Britton-Davidian, J. (2011). Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol Biol.* **11**, 124. doi:10.1186/1471-2148-11-124
- Colgan, D. J., McLauchlan, A., Wilson, G. D. F., Livingston, S. P., Edgecombe, G. D., Macaranas, J., Cassis, G. and Gray, M. R. (1998). Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aust. J. Zool.* **46**, 419. doi:10.1071/zo98048
- Delaurière, L., Chénais, B., Hardivillier, Y., Gauvry, L. and Casse, N. (2009). Mariner transposons as genetic tools in vertebrate cells. *Genetica*, **137**, 9–17. doi:10.1007/s10709-009-9370-2
- Dover, G. A. (1989). Linkage disequilibrium and molecular drive in the rDNA gene family. *Genetics* **122**, 249–252.
- Fernández-Medina, R. D., Ribeiro, J. M. C., Carareto, C. M. A., Velasque, L. and Struchiner, C. J. (2012). Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics* **13**, 272. doi:10.1186/1471-2164-13-272
- Ferri, V. (2002). *Turtles & Tortoises: A Firefly Guide*, p. 256. Firefly Books.
- Feschotte, C. and Pritham, E. J. (2007). DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu. Rev. Genet.* **41**, 331–368. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090448
- Frade, L. F. d. S., Almeida, B. R. R., Milhomem-Paixão, S. S. R., Ready, J. S., Nagamachi, C. Y., Pieczarka, J. C. and Noronha, R. C. R. (2019). Karyoevolution of *Crenicichla heckel* 1840 (Cichlidae, Perciformes): a process mediated by inversions. *Biology Open* **8**, bio041699. doi:10.1242/bio.041699
- Gouveia, J. G., Wolf, I. R., Vilas-Boas, L. A., Heslop-Harrison, J. S., Schwarzacher, T. and Dias, A. L. (2017). Repetitive DNA in the Catfish Genome: rDNA, Microsatellites, and Tc1-Mariner Transposon Sequences in *Imparfinis* Species (Siluriformes, Heptapteridae). *J. Hered.* **108**, 650–657. doi:10.1093/jhered/esx065
- Guichard, E., Peona, V., Tagliacucchi, G. M., Abitante, L., Jagoda, E., Musella, M., Ricci, M., Rubio-Roldán, A., Sarno, S., Luiselli, D. et al. (2018). Impact of non-LTR retrotransposons in the differentiation and evolution of anatomically modern humans. *Mobile DNA* **9**, 28. doi:10.1186/s13100-018-0133-4
- Kaplan, F. S., Murray, J., Sylvester, J. E., Gonzalez, I. L., O'Connor, J. P., Doering, J. L., Muenke, M., Emanuel, B. S. and Zaslloff, M. A. (1993). The topographic organization of repetitive DNA in the human nucleolus. *Genomics*; **15**, 123–132. doi:10.1006/geno.1993.1020

- Kemp, J. R. and Longworth, M. S.** (2015). Crossing the LINE toward genomic instability: LINE-1 retrotransposition in cancer. *Front. Chem.* **3**, 68. doi:10.3389/fchem.2015.00068
- Kordis, D.** (2009). Transposable elements in reptilian and avian (Sauropsida) genomes. *Cytogenet Genome Res.* **127**, 94-111. doi:10.1159/000294999
- Lampe, D. J., Witherspoon, D. J., Soto-Adames, F. N. and Robertson, H. M.** (2003). Recent horizontal transfer of mellifera subfamily Mariner transposons into insect lineages representing four different orders shows that selection acts only during horizontal transfer. *Mol Biol Evol*; **20**, 554-562. doi:10.1093/molbev/msg069
- Liu, W. S. and Fredga, K.** (1999). Telomeric (TTAGGG)_n sequences are associated with nucleolus organizer regions (NORs) in the wood lemming. *Chromosome Res*; **7**, 235-240. doi:10.1023/A:1009255517764
- Martins, C. and Galetti-Junior, P. M.** (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res*; **7**, 363-367. doi:10.1023/A:1009216030316
- Marz, M., Kirsten, T. and Stadler, P. F.** (2008). Evolution of Spliceosomal snRNA Genes in Metazoan Animals. *J. Mol. Evol.* **67**, 594-607. doi:10.1007/s00239-008-9149-6
- McCullers, T. J. and Steiniger, M.** (2017). Transposable elements in Drosophila. *Mob Genet Elements*; **7**, 1-18. doi:10.1080/2159256X.2017.1318201
- Montiel, E. E., Badenhorst, D., Lee, L. S., Litterman, R., Trifonov, V. and Valenzuela, N.** (2016). Cytogenetic insights into the evolution of chromosomes and sex determination reveal striking homology of turtle sex chromosomes to amphibian autosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, **148**, 292-304. doi:10.1159/000447478
- Noronha, R. C. R., Barros, L. M. R., Araújo, R. E. F., Marques, D. F., Nagamachi, C. Y., Martins, C. and Pieczarka, J. C.** (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
- Novotná, J., Havelka, J., Starý, P., Koutecký, P. and Vítková, M.** (2011). Karyotype analysis of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) (Hemiptera: Aphididae) reveals a large x-chromosome with rRNA and histone gene families. *Genetica*; **139**, 281-289. doi:10.1007/s10709-011-9546-4
- Oliveira, S. G., Cabral-de-Mello, D. C., Moura, R. C. and Martins, C.** (2013). Chromosomal organization and evolutionary history of Mariner transposable elements in Scarabaeinae coleopterans. *Molecular Cytogenetics*, **6**, 54. doi:10.1186/1755-8166-6-54
- Palacios-Gimenez, O. M., Castillo, E. R., Martí, D. A. and Cabral-de-Mello, D. C.** (2013). Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melanoiplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. *BMC Evol. Biol.* **13**, 167. doi:10.1186/1471-2148-13-167
- Pinkel, D., Straume, T. and Gray, J. W.** (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83**, 2934-2938. doi:10.1073/pnas.83.9.2934
- Piscor, D., Fernandes, C. A. and Parise-Maltempi, P. P.** (2018). Conserved number of U2 snDNA sites in *Piabina argentea*, *Piabarchus stramineus* and two Bryconamericus species (Characidae, Stevardiinae). *Neotropical Ichthyology* **16**. doi:10.1590/1982-0224-20170066
- Salina, E. A. and Adonina, I. G.** (2018). Cytogenetics in the study of chromosomal rearrangement during wheat evolution and breeding. *Cytogenetics - Past, Present and Further Perspectives*. doi:10.5772/intechopen.80486
- Schemberger, M. O., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Artoni, R. F., Valente, G. T., Martins, C., Moreira-Filho, O., Cestari, M. M. and Vicari, M. R.** (2016). Sequence analyses and chromosomal distribution of the Tc1/Mariner element in Parodontidae fish (Teleostei: Characiformes). *Gene* **593**, 308-314. doi:10.1016/j.gene.2016.08.034
- Sochorová, J., Garcia, S., Gálvez, F., Symonová, R. and Kovařík, A.** (2018). Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma* **127**, 141-150. doi:10.1007/s00412-017-0651-8
- Srikulnath, K., Uno, Y., Matsubara, K., Thongpan, A., Suputtitada, S., Apisitwanich, S., Nishida, C. and Matsuda, Y.** (2011). Chromosomal localization of the 18S-28S and 5S rRNA genes and (TTAGGG)_n sequences of butterfly lizards (*Leiolepis belliana belliana* and *Leiolepis boehmei*, Agamidae, Squamata). *Genet. Mol. Biol.* **34**, 583-586. doi:10.1590/S1415-47572011005000042
- Srikulnath, K., Uno, Y., Nishida, C., Ota, H. and Matsuda, Y.** (2015). Karyotype Reorganization in the Hokou Gecko (*Gekko hokouensis*, Gekkonidae): The Process of Microchromosome Disappearance in Gekkota. *PLOS ONE* **10**, e0134829. doi:10.1371/journal.pone.0134829
- Suárez, P., Pinto Barroso, I. C. G., Silva, D. d. S., Milhomem, S. S. R., Cabral-de-Mello, D. C., Martins, C. and Nagamachi, C. Y.** (2017). Highest diploid number among gymnotiformes: first cytogenetic insights into rhabdoliops (Sternopygidae). *Zebrafish* **14**, 272-279. doi:10.1089/zeb.2016.1405
- Úbeda-Manzanaro, M., Merlo, M. A., Palazón, J. L., Cross, I., Sarasquete, C. and Rebordinos, L.** (2010). Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae Family. *Genetica*, **138**, 787-794. doi:10.1007/s10709-010-9460-1
- Viana, P. F., Ribeiro, L. B., Lima, T., Carvalho, V. T., Vogt, R. C., Gross, M. C. and Feldberg, E.** (2016). An optimized protocol for obtaining mitotic chromosomes from cultured reptilian lymphocytes. *The Nucleus*, **59**, 191-195. doi:10.1007/s13237-016-0174-3
- Xu, D., Molina, W. F., Yano, C. F., Zhang, Y., de Oliveira, E. A., Lou, B. and Cioffi, M. B.** (2017). Comparative cytogenetics in three Sciaenid species (Teleostei, Perciformes): evidence of interspecific chromosomal diversification. *Mol Cytogenet*, **10**, 37. doi:10.1186/s13039-017-0338-0
- Yin, Y., Zhou, L. and Yuan, S.** (2018). Enigma of retrotransposon biology in mammalian early embryos and embryonic stem cells. *Stem Cells International* **2018**, 1-6. doi:10.1155/2018/6239245