

unesp 

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

**Estudo morfológico e citogenético em duas
espécies de jabutis do gênero *Chelonoidis*
(Fitzinger, 1835) (Testudines)**

TIAGO LUCENA DA SILVA

MESTRADO



PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Tiago Lucena da Silva

**Estudo morfológico e citogenético em
duas espécies de jabutis do gênero
Chelonoidis (FITZINGER, 1835) (Testudines)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do Título de Mestre em Biologia Animal.

São José do Rio Preto - SP

2011

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Tiago Lucena da Silva

**Estudo morfológico e citogenético em
duas espécies de jabutis do gênero
Chelonoidis (FITZINGER, 1835) (Testudines)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do Título de Mestre em Biologia Animal, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto - SP

2011

Silva, Tiago Lucena da.

Estudo morfológico e citogenético em duas espécies de jabutis do gênero *Chelonoidis* (FITZINGER, 1835) (Testudines) / Tiago Lucena da Silva. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2011.

116 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira

Co-orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Citogenética animal. 2. Jabuti – Morfologia. I. Azeredo-Oliveira, Maria Tercília Vilela. II. Bonini-Domingos, Claudia Regina. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 598.13

TIAGO LUCENA DA SILVA

**Estudo morfológico e citogenético em duas espécies de jabutis do gênero
Chelonoidis (FITZINGER, 1835) (Testudines)**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, área de Biologia Estrutural junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo
Oliveira.

Professora Doutora

UNESP – São José do Rio Preto

Orientadora

Prof. Dr. Fabiano Gazzi Taddei

Professor Doutor

Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP)

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo

Professor Doutor

UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 23 de fevereiro de
2011

Este trabalho foi desenvolvido junto ao Centro de Estudos de Quelônios (CEQ), parte integrante dos Laboratórios de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas e de Biologia Celular, do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro do CNPq (edital taxonomia), FUNDUNESP (processo 1098/2007) e FAPESP (processo 2009/04466-9).

Dedico este trabalho:

A minha família, meus pais, Sandra Regina da Silva e Edson Lucena da Silva, e aos meus irmãos: Bruna Lucena da Silva, Lucas Lucena da Silva, Yasmim Lucena da Silva e Kalel Lucena da Silva, por sempre incentivarem os meus estudos, por todo amor, carinho, compreensão e apoio. Agradeço por acreditarem em mim.

A Maria Isabel Afonso da Silva, meu grande amor, que tem sido minha grande companheira em todos os momentos. Tua presença em minha vida foi fundamental em todas as etapas deste trabalho, e com certeza, foi e continua sendo minha grande fonte de inspiração. Obrigado pela compreensão, amor, carinho e amizade e, especialmente, pelo apoio nos momentos de desânimo e incertezas. Amo muito você!

Agradecimentos

Aos meus pais, Sandra Regina da Silva e Edson Lucena da Silva, pela educação, ensinamentos, amor, carinho, amizade, confiança e exemplos de vida. Aos meus irmãos, Bruna Lucena da Silva, Lucas Lucena da Silva, Yasmim Lucena da Silva e Kalêl Lucena da Silva, pelo carinho, respeito, apoio e incentivo.

À minha namorada, Maria Isabel Afonso da Silva, pela paciência, cumplicidade, amor, compreensão, por dizer-me não somente o que quero ouvir, mas também o que preciso! Obrigado pela sua amizade tão sincera e preciosa. Você é o grande amor da minha vida, é bom saber que te tenho ao meu lado, você é muito importante para mim, obrigado por tudo que vivemos e ainda viveremos juntos. À dona Iracema Afonso da Silva, por me aceitar em sua família e me acolher como um filho. Aos meus cunhados, Rafael Afonso da Silva, Raquel Afonso da Silva e Daniel Afonso da Silva, pela confiança e amizade.

À orientação da Professora Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, que me acolheu e me ensinou o caminho da pesquisa. Por me aconselhar no meu trabalho, pela paciência e pelos conhecimentos que me transmitiu.

À professora Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos pela amizade, oportunidades, confiança, paciência, ensinamentos, orientação e pela formação não só acadêmica e profissional, mas também pessoal.

À família Bonini-Domingos, Luiz Henrique, Ana Luiza, Ana Carolina, Marcos, D. Nadir e Lucas, pela confiança, amizade e momentos de descontração.

Ao prof^o Dr. Luiz Dino Vizotto, pela participação constante neste projeto de pesquisa, pela grande amizade e exemplo, e por estar sempre presente nos momentos difíceis da minha vida pessoal e profissional.

Ao Prof^o Dr. Classius de Oliveira, por participar deste projeto abrindo as portas de seu laboratório, pelos seus conhecimentos e dedicação, e por acreditar nesta linha de pesquisa.

*À professora Shirlei Maria Recco Pimentel, à Débora Silva Rodrigues, pela imensa ajuda na realização da técnica de hibridação *in situ*, e a todos os alunos e professores do Laboratório de Estudos Cromossômicos, do Departamento de Anatomia e Biologia Celular, da UNICAMP, por terem me recebido tão bem.*

Ao Prof. Dr. Francisco Langeani Neto e à Profa. Dra. Lílian Castiglioni, pela valiosa contribuição durante o exame de qualificação.

Ao amigo, biólogo e técnico, Josué Rodrigues dos Santos, pelos ensinamentos no campo da citogenética, amizade, dedicação, auxílio, respeito e apontamentos que ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

À Larissa Paola Rodrigues Venancio, pela valiosa contribuição nas análises estatísticas e análises dos dados e, principalmente pela imensa amizade.

Aos meus amigos, Alexandre Vidotto Barboza Lima, Aline Fernanda Chessa, Flávia Helena Quintino, Camila Minguet, Carlos Eduardo Saranz Zago e Lícia Thais Reinoso pelas inúmeras conversas e momentos de descontração, e pela grande amizade e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), Danilo, Gisele, Paula, Carol, Belini, Eliana, Isabeth, Vinicius, Ítalo, Júlia, Lidiane, Haruo, Willian, Isabela, Rafael, Marina, João Vitor, Tayrone, Natália, Jéssica, Mariana, Priscila, Lucilene e a todos que passaram pelo laboratório, pelos inúmeros momentos de descontração, aprendizagem, amizade e diversão. O bom convívio que tivemos nesse período fez mais leve o peso das responsabilidades e cobranças que o programa de pós-graduação trás.

À todos os meus amigos que, direta ou indiretamente, auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, quer seja auxiliando na elaboração do mesmo, ou pela convivência, pela amizade, pelo companheirismo, pelos ensinamentos e por estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida.

E a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

À FAPESP pela bolsa de estudos.

À Deus pela vida e pelo caminho que pude percorrer.

*“No fim tudo dá certo, se não deu certo
é porque ainda não chegou ao fim”
(Fernando Sabino)*

*"Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais,
e, neste dia, um crime contra um animal será considerado
um crime contra a humanidade".
Leonardo da Vinci (1452-1519)*

SILVA, T.L. **Estudo morfológico e citogenético em duas espécies de jabutis do gênero *Chelonoidis* (FITZINGER, 1835) (Testudines)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, 116p., 2011.

Os répteis sofreram redução do número de espécies desde a época em que dominavam a Terra até os dias atuais. Os quelônios são pouco estudados, principalmente quanto à sua caracterização citogenética e morfológica. O presente projeto teve por objetivo estabelecer a análise das características morfológicas e citogenéticas, efetivas para a diferenciação das espécies *Chelonoidis carbonaria* e *Chelonoidis denticulata*, quelônios terrestres representativos de dois biomas brasileiros (Cerrado e Amazônia); avaliar a existência de um morfotipo de *Chelonoidis carbonaria*, além de descrever o cariótipo das espécies em estudo. Os animais foram coletados no criatório “Reginaldo Uvo Leone”, localizado na cidade de Tabapuã- SP. O presente trabalho possui licença do IBAMA/RAN e aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) UNESP/IBILCE. Foram realizadas aferições da morfologia externa, avaliando-se as características morfológicas efetivas para a diferenciação das duas espécies de jabutis brasileiras, *Chelonoidis carbonaria* e *Chelonoidis denticulata*, dando ênfase à comparação com um grupo de *Chelonoidis carbonaria**, que apresenta tamanho e coloração diferenciada do padrão estabelecido para a espécie. As características morfológicas foram avaliadas no intuito de caracterizar as diferenças entre as espécies, além de verificar quais são as características sexualmente dimórficas entre os grupos avaliados. Os dados obtidos permitiram o reconhecimento de um morfotipo de *C. carbonaria*, que apresentou características morfológicas intermediárias entre as duas espécies clássicas. Os estudos citogenéticos permitiram o reconhecimento do número cromossômico $2n= 52$ para os três grupos avaliados. O bandamento G não mostrou boa reprodutibilidade e constância nos padrões de bandamentos. Na espécie *Chelonoidis carbonaria*, a técnica de bandamento C em machos, revelou a presença de heterocromatina constitutiva em dois microcromossomos e na região centromérica de dois macrocromossomos, nas fêmeas apenas dois microcromossomos apresentaram marcação específica. A espécie *Chelonoidis denticulata* e o grupo *Chelonoidis carbonaria**, não apresentaram blocos heterocromáticos evidentes. Em todos os grupos avaliados, a impregnação por íons prata (Ag-NOR) revelou marcação no décimo par de cromossomos. Nos machos foram evidenciados as regiões teloméricas de um par de macrocromossomos acrocêntricos, e nas fêmeas em apenas um único macrocromossomo acrocêntrico desse mesmo par. Os resultados da hibridação *in situ*, com sonda de DNAr 28S de anfíbios, revelaram duas RONS nos machos e nas fêmeas dos três grupos de jabutis avaliados. Com base nos dados morfológicos avaliados, sugerimos que o morfotipo *C. carbonaria** corresponda a uma nova espécie de jabuti, entretanto, se faz necessário uma avaliação morfológica, genética e geográfica mais abrangente no Brasil, no intuito de avaliar o *status* de conservação e a área de ocorrência deste morfotipo. Esses resultados contribuem para o conhecimento da biologia dos quelônios, incentivando futuros estudos genéticos e de evolução desses animais e, principalmente, gerando dados que contribuam para a preservação desse importante grupo de répteis.

Palavras-chave: *Chelonoidis carbonaria*. *Chelonoidis denticulata*. Morfotipo. Citogenética, Jabutis.

SILVA, T.L. **Cytogenetic and morphologic study in two tortoises species of the genus *Chelonoidis* (FITZINGER, 1835) (Testudines)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, 116p., 2011.

The reptiles were reduced in number of species since the time that they ruled the earth until nowadays. The tortoises are poorly studied, particularly regarding its morphological and cytogenetics features. This project aimed to establish the analysis of morphology and cytogenetics, effective to differentiate the species *Chelonoidis carbonaria* and *Chelonoidis denticulata*, terrestrial tortoises representative of two biomes (Cerrado and Amazonia), to evaluate the existence of a possible *Chelonoidis carbonaria* morphotype, and describe the karyotype of the studied species. The animals were collected in the "Reginaldo Uvo Leone" breeding farm, located in Tabapuã-SP. This work is licensed by IBAMA/RAN and approval by the Ethics Committee on Animal Experiments (ECAE) UNESP/IBILCE. We conducted measurements of external morphology, in order to evaluate the morphological characteristics effective for the differentiation of two species of Brazilian tortoises *Chelonoidis carbonaria* and *Chelonoidis denticulata*, emphasizing the comparison with a *Chelonoidis carbonaria** group, which differ in color and size patterns established for the species. The morphological characteristics were evaluated in order to characterize differences between species, and check which characteristics are sexually dimorphic between the groups. The data obtained allowed the recognition of a *C. carbonaria* morphotype, which showed morphological characteristics intermediate between the two classic species. Cytogenetic studies led to the recognition of the chromosome number $2n=52$ for all three groups. The G-banding did not show good reproducibility and consistency in the banding patterns. In *Chelonoidis carbonaria* males, the C banding technique revealed the presence of constitutive heterochromatin in two microchromosomes and in two centromeric region of macrochromosomes, in females only two microchromosomes showed specific staining. The species *Chelonoidis denticulata* and the group *Chelonoidis carbonaria**, did not showed evident heterochromatic blocks. In all groups, silver staining technique (Ag-NOR) revealed marking in the tenth pair of chromosomes. Males were shown the telomeric regions of a acrocentric macrochromosomes pair, and females in only a single acrocentric macrochromosome of the same pair. The results of *in situ* hybridization with amphibians 28S rDNA probe, showed two NORs in males and females of the three groups of tortoises evaluated. Based on morphological data analyzed, we suggest that the morphotype *C. carbonaria** corresponds to a new tortoises specie, however, it is necessary a broader evaluation of morphological, genetic and geographic in Brazil, in order to assess the conservation status and occurrence area of this morphotype. These findings contribute to knowledge of the tortoise biology, encouraging future studies of genetics and evolution of these animals and, especially, generating data that contribute to the preservation of this important group of reptiles.

Keywords: *Chelonoidis carbonaria*, *Chelonoidis denticulata*, Morphotype, Cytogenetics, Tortoises.

Lista de Figuras

- 1 Relações filogenéticas da ordem Testudines. Adaptado de Gaffney e Meylan (1989).
..... p. 23
- 2 Imagem ilustrativa dos parâmetros morfológicos avaliados. Modificado de Jerozolimski (2005)..... p. 41
- 3 Análise dos componentes principais de todos os indivíduos avaliados (90). *Chelonoidis carbonaria*, *Chelonoidis carbonaria** e *Chelonoidis denticulata* (15 indivíduos/sexo/grupo), M- Machos, F- Fêmeas, CP- Componente principal.. p. 51
- 4 Análise dos componentes principais de todos os machos avaliados (45). C- *Chelonoidis carbonaria*, C*- *Chelonoidis carbonaria**, D- *Chelonoidis denticulata* (15 indivíduos/grupo), CP- Componente principal. p. 52
- 5 Análise de variância ANOVA *one way* de todos os machos avaliados. A- CP1. B- CP2. CP- Componente principal. C- *Chelonoidis carbonaria*. C*- *Chelonoidis carbonaria**. D- *Chelonoidis denticulata* (15 indivíduos/grupo). p. 53
- 6 Análise de componentes principais de todas as fêmeas avaliadas (45). C- *Chelonoidis carbonaria*, C*- *Chelonoidis carbonaria**, D- *Chelonoidis denticulata* (15 indivíduos/grupo). CP- Componente principal..... p. 54
- 7 Análise de variância ANOVA *one way* de todas as fêmeas avaliadas. A- Componente principal 1. B- Componente principal 2. CP- Componente principal. C- *Chelonoidis carbonaria* (n=15), C*- *Chelonoidis carbonaria** (n= 15), D- *Chelonoidis denticulata* (n= 15)..... p. 55
- 8 Padrão de coloração da cabeça, escamas das patas e olhos dos animais avaliados..... p. 57
- 9 Coloração convencional: Giemsa. *Chelonoidis carbonaria*. **A-** Cariograma de Fêmea. **B-** Cariograma de Macho. Barra 5 μm p. 60
- 10 Coloração convencional: Giemsa. *Chelonoidis carbonaria**. **A-** Cariograma de Fêmea. **B-** Cariograma de Macho. Barra 5 μm p. 61
- 11 Coloração convencional: Giemsa. *Chelonoidis denticulata*. **A-** Cariograma de Fêmea. **B-** Cariograma de Macho. Barra 5 μm p. 61

- 12 Metáfases de *Chelonoidis carbonaria* submetidas às técnicas de bandamento cromossômico. **A** e **B** - Bandamento G; **C** e **D**- Bandamento C; **E** e **F**- Bandamento Ag-NOR. Fêmeas: **A**, **C** e **E**. Machos: **B**, **D** e **F**. As setas em E e F indicam as RONS. Nos detalhes estão destacados os cromossomos portadores das regiões organizadoras nucleolares reveladas pela impregnação por íons prata (Ag-NOR) e os núcleos interfásicos com os dois sítios de DNAr 28S revelados pela técnica de hibridação *in situ*. Barra = 10 µm..... p. 63
- 13 Metáfases de *Chelonoidis carbonaria** submetidas às técnicas de bandamento cromossômico. **A** e **B** - Bandamento G; **C** e **D**- Bandamento C; **E** e **F**- Bandamento Ag-NOR. Fêmeas: **A**, **C** e **E**. Machos: **B**, **D** e **F**. As setas em E e F indicam as RONS. Nos detalhes estão destacados os cromossomos portadores das regiões organizadoras nucleolares reveladas pela impregnação por íons prata (Ag-NOR) e os núcleos interfásicos com os dois sítios de DNAr 28S revelados pela técnica de hibridação *in situ*. Barra = 10 µm..... p. 64
- 14 Metáfases de *Chelonoidis denticulata* submetidas às técnicas de bandamento cromossômico. **A** e **B** - Bandamento G; **C** e **D**- Bandamento C; **E** e **F**- Bandamento Ag-NOR. Fêmeas: **A**, **C** e **E**. Machos: **B**, **D** e **F**. As setas em E e F indicam as RONS. Nos detalhes estão destacados os cromossomos portadores das regiões organizadoras nucleolares reveladas pela impregnação por íons prata (Ag-NOR) e os núcleos interfásicos com os dois sítios de DNAr 28S revelados pela técnica de hibridação *in situ*. Barra = 10 µm..... p. 65

Lista de tabelas

- 1 Valores utilizados na Análise de Variância (ANOVA) - relativos aos dados obtidos após a ACP para o primeiro e segundo CP dos 45 casais avaliados (15 casais/grupo)..... p. 55
- 2 Medidas dos indivíduos de *Chelonoidis carbonaria*, *Chelonoidis carbonaria** e *Chelonoidis denticulata*. Para machos e fêmeas, estão representadas, médias, desvio padrão e valor de p (n= 15 casais por grupo)..... p. 56
- 3 Padrão de coloração da cabeça, escamas das patas e olhos dos animais avaliados p. 57
- 4 Análise de variância entre todas as características morfológicas avaliadas nos três grupos..... p. 58
- 5 Dados referentes ao comprimento linear da carapaça (CLC) de indivíduos adultos de *Chelonoidis carbonaria* em diferentes localidades..... p. 59
- 6 Dados referentes ao comprimento linear da carapaça (CLC) de indivíduos adultos de *Chelonoidis denticulata* em diferentes localidades..... p. 60

Lista de Quadros

- 1 Descrição detalhada dos parâmetros morfológicos avaliados..... p. 40

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AC - Altura da carapaça

ACP - Análise de componentes principais

AgNOR - Regiões argirofílicas organizadoras nucleolares

B23 - Numatrina

BSA - *bovine serum albumin*

C. - *Chelonoidis*

C23 - Nucleolina

CA-Sc - Distância central dos escudos anais ao supra-caudal

CCC - Comprimento curvilíneo da carapaça

CCP - Comprimento curvilíneo do plastrão

CEEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

CLC - Comprimento linear da carapaça

CLP - Comprimento linear do plastrão

cm - Centímetros

CP - Componente Principal

DEA - Distância entre as extremidades dos escudos anais

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

dNTP - Desoxinucleotídeos Trifosfato

DP - Desvio padrão

EAB - Escudos abdominais

EAN - Escudos anais

EA-Sc - Distância da extremidade do escudo anal ao supra-caudal

EF - Escudos femorais

EG - Escudos gulares

EH - Escudos humerais

EP - Escudos peitorais

F - Força do teste

HIS – Hibridação *in situ*

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IUCN - *International Union for Conservation of Nature*
KCL - Cloreto de potássio
Kda - Kilodalton
Kg - Quilograma
LCC - Largura curvilínea da carapaça
LCP - Largura curvilínea do plastrão
LLC - Largura linear da carapaça
LLP - Largura linear do plastrão
MA - Milhões de Anos
mg - Miligrama
mL - Mililitro
N - Normal
n - Número de indivíduos
Nº - Número
NS - Não Significante
°C - Graus Celsius
p - Nível de significância
PEA - Profundidade da abertura dos escudos anais
pH - Potencial Hidrogeniônico
RAN - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios
RNA - Ácido Ribonucléico
RONs - Regiões Organizadoras Nucleolares
rpm - Rotações por minuto
rRNA - RNA ribossomal
S - coeficiente de sedimentação
sp - Espécie
SSC - Cloreto de sódio e citrato de sódio
TE – Tampão de extração
TTWG - *Turtle taxonomic working group*
x – Vezes
µm – Micrometro

Sumário

1.	Introdução	21
1.1.	Origem dos répteis: Testudines	21
1.2.	<i>Chelonoidis carbonaria</i> e <i>Chelonoidis denticulata</i>	25
1.3.	Diferenciação morfológica e genética de <i>C. carbonaria</i> e <i>C. denticulata</i>	27
1.4.	Análise da estrutura cromossômica de <i>C. carbonaria</i> e <i>C. denticulata</i> ...	29
1.4.1.	Citogenética Clássica	29
1.4.2.	Citogenética Molecular	33
2.	Objetivos Gerais	37
2.1.	Objetivos específicos	37
3.	Material e Métodos	39
3.1.	Amostras	39
3.2.	Análise morfométrica	39
3.3.	Padronização da cultura de células	42
3.4.	Bloqueio	43
3.5.	Hipotonização e fixação	43
3.6.	Preparo das lâminas	43
3.7.	Coloração usual com Giemsa	43
3.8.	Bandamento C	44
3.9.	Bandamento G	45
3.10.	Impregnação por íons prata (Ag-NOR)	45
3.11.	Hibridação <i>in situ</i> (HIS)	46
3.12.	Análise Cromossômica ao microscópio	49
3.13.	Análise estatística	49
4.	Resultados	52
4.1.	Análise morfológica de <i>C. carbonaria</i> , <i>C. carbonaria</i> * e <i>C. denticulata</i> ...	52
4.2.	Análise citogenética de <i>C. carbonaria</i> , <i>C. carbonaria</i> * e <i>C. denticulata</i> ...	61
5.	Discussão	68
5.1.	Análise morfológica de <i>C. carbonaria</i> , <i>C. carbonaria</i> * e <i>C. denticulata</i>	68
5.2.	Análise citogenética de <i>C. carbonaria</i> , <i>C. carbonaria</i> * e <i>C. denticulata</i> ...	76
6.	Conclusões	81
7.	Referências	83
8.	Apêndices	96
A.	Artigo – Contribution to the blood sampling in Testudinidae and Chelidae.	96
B.	Artigo – Simple method for Brazilian Testudinidae peripheral blood lymphocyte culture	103
9.	Anexos	114
A.	Comissão de Ética em Experimentação Animal	114
B.	Autorização para Atividades com Finalidade Científicas – IBAMA/RAN 115	

Introdução

1. Introdução

1.1. Origem dos répteis: Testudines

A origem dos répteis é datada em registros fósseis da Era Paleozóica. Esses animais dominaram a Terra durante o período Jurássico até o Cretáceo, há cerca de 125 milhões de anos, e a maioria das espécies existentes foram extintas há aproximadamente 60 milhões de anos (GOULART, 2004).

Os Testudines e os demais amniotas são classificados em relação ao padrão de fenestração temporal em Diapsida, Sinapsida e Anapsida. Os Diapsidas possuem duas aberturas temporais no crânio e são representados pelos Lepidosauromorpha (lagartos, serpentes, tuataras e anfisbenas) e pelos Archosauromorpha (crocodilianos e aves). Os Sinapsida apresentam uma abertura temporal lateral tendo como representantes os Pelycosaurias e Therapsidas, ambos extintos, e os mamíferos atuais, e os Anapsidas são representados pelos répteis que não possuem fossa temporal, os Chelonia ou Testudomorpha (POUGH et al., 2002; POUGH et al., 2003).

Os Testudines tiveram sua origem durante o período Jurássico há cerca de 200 - 146 milhões de anos, ou Cretáceo há 146 - 66 milhões de anos, e atualmente são representados por poucas famílias. Esse grupo é de grande importância em estudos genéticos e taxonômicos por possuir uma história filogenética única, pois mantém diversas características altamente conservadas ao longo de sua evolução, sendo desta forma, importantes candidatos para ações de conservação (SHAFTER, 2009).

Os répteis têm sofrido significativa redução no número de espécies no decorrer da sua história evolutiva, sendo que das 16 ordens existentes no passado, apenas quatro são encontradas nos dias atuais: Crocodylia, com 23 espécies de jacarés, crocodilos, aligátors e gaviais; Rhynchocephalia, com duas espécies de tuataras, Squamata, formada por 2940 espécies de serpentes, 4675 espécies de lagartos e 160 espécies de anfisbenas e Testudines, constituída por 328 espécies de jabutis, cágados e tartarugas (ERNEST, BARBOUR, 1989; GARCIA-NAVARRO, PACHALY, 1994; STORER et al., 2000; GOULART, 2004; RIDLEY, 2006; IVES, SPINKS e SHAFFER, 2008; SHAFTER, 2009, TTWG, 2010).

Os quelônios são um dos grupos de vertebrados mais ameaçados de extinção segundo o órgão internacional *World Conservation Union*. Das espécies avaliadas por esse órgão, 47,6% estão nas mais altas categorias de risco (extintas, extintas na natureza, criticamente ameaçadas ou vulneráveis), indicando um *status* preocupante de conservação para as espécies de quelônios (TTWG, 2007). Esta proporção é maior que a encontrada para a maioria dos vertebrados (aves: 12%, mamíferos: 23%, anfíbios: 32,5%) (STUART, 2004, TTWG, 2010).

A principal característica dos quelônios é a carapaça que reveste seu corpo, formado pela fusão das costelas, vértebras torácicas, lombares, sacrais e alguns ossos da cintura pélvica e torácica. A carapaça é a porção convexa ou dorsal, e o plastrão corresponde à porção ventral, plana ou côncava. Esses animais ocupam diferentes habitats com representantes exclusivamente terrestres, como os jabutis (Testudines); espécies que vivem em ambientes fluviais e lacustres, como os cágados (Chelidae); exclusivamente marinhas como as tartarugas (Cheloniidae), e ainda, aquelas que vivem em ambientes terrestre e de água doce, como a *Rhynoclemmys punctularia* (Aperema) (ZUG, 1993; GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; GOULART, 2004). Os ossos da carapaça são geralmente recobertos por escudos córneos de origem epidérmica que não coincidem, em número e posição com os ossos subjacentes, tornando assim, essa estrutura extremamente resistente a choques mecânicos (POUGH et al., 1993).

Os répteis são adaptados a vida ao meio terrestre; são ectotérmicos e apresentam modificações que evitam a desidratação, como: pele escamosa, aumento do comprimento do intestino grosso, fecundação interna, ovos com casca calcária e membranas embrionárias (âmnio, córion e alantóide) (ERNEST; BARBOUR, 1989; STORER et al., 2000; GOULART, 2004). O sistema porta renal desvia parte da circulação diretamente para os rins, localizados caudal e ventralmente em relação à carapaça e, posteriormente, ao acetábulo, tendo origem metanéfrica. A excreção é uma mistura de uréia e ácido úrico (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; MADER, 1996).

O pulmão é bem desenvolvido e localizado bilateralmente. Por não possuírem diafragma e apresentarem os arcos intercostais fundidos, o ar é bombeado para os pulmões por movimentos da faringe. A expulsão do ar é auxiliada pela contração da musculatura da cintura peitoral e pélvica, que movimentam as vísceras comprimindo os pulmões. Em

algumas espécies aquáticas a respiração ocorre por meio da mucosa cloacal e pela cavidade oronasal (STORER et al., 2000; GOULART, 2004; JACKSON et al., 2004). O coração possui três cavidades, dois átrios e um ventrículo parcialmente dividido por um septo mediano, proporcionando em situações específicas, como em hipóxia, uma mistura entre o sangue arterial e o sangue venoso, conferindo melhor resposta à taxa respiratória e termorregulação (ERNEST; BARBOUR, 1989; GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; POUGH et al., 2003; GOULART, 2004).

A maxila e a mandíbula apresentam um bico córneo; a cavidade oral comunica-se com a cavidade nasal por uma fenda palatina. O pescoço é formado por oito vértebras cervicais recobertas por forte musculatura que propicia em algumas espécies a retração da cabeça quando ameaçados (STORER et al., 2000; GOULART, 2004).

A ordem Testudines é dividida em duas subordens: Cryptodira (cripto: escondido; dire: pescoço), que retraem o pescoço verticalmente, e está representada por três superfamílias: Testudinoidea, Trionychoidea e Chelonioidea, que incluem tartarugas, cágados e jabutis, encontrados em sua maioria no hemisfério sul, com espécies terrestres e aquáticas na América do Sul, terrestres na África e sem representantes na Austrália e na Antártida; e Pleurodira (pleuro: lado), retraem o pescoço horizontalmente, e está dividida em duas famílias: Chelidae e Pelomedusidae, encontradas apenas no hemisfério Sul (ZUG, 1993; POUGH et al., 2003; GOULART, 2004).

Aproximadamente 20% das espécies de quelônios existentes ocorrem na América do Sul, sendo representados por oito famílias (SOUZA, 2004). Os quelônios habitam os mais diversos ecossistemas aquáticos e terrestres, de oceanos a rios e lagos, de desertos a florestas tropicais (ERNEST; BARBOUR, 1989; ZUG, 1993). A família Testudinidae é representada exclusivamente por espécies terrestres, incluindo mais de 200 formas fósseis e aproximadamente 40 espécies viventes (AUFFENBERG, 1974; POUGH et al., 2001).

A ordem Testudines é constituída por 14 famílias e aproximadamente 316 espécies viventes (IVES, SPINKS e SHAFFER, 2008; SHAFTER, 2009). A árvore filogenética da Ordem Testudines está representada na Figura 1.

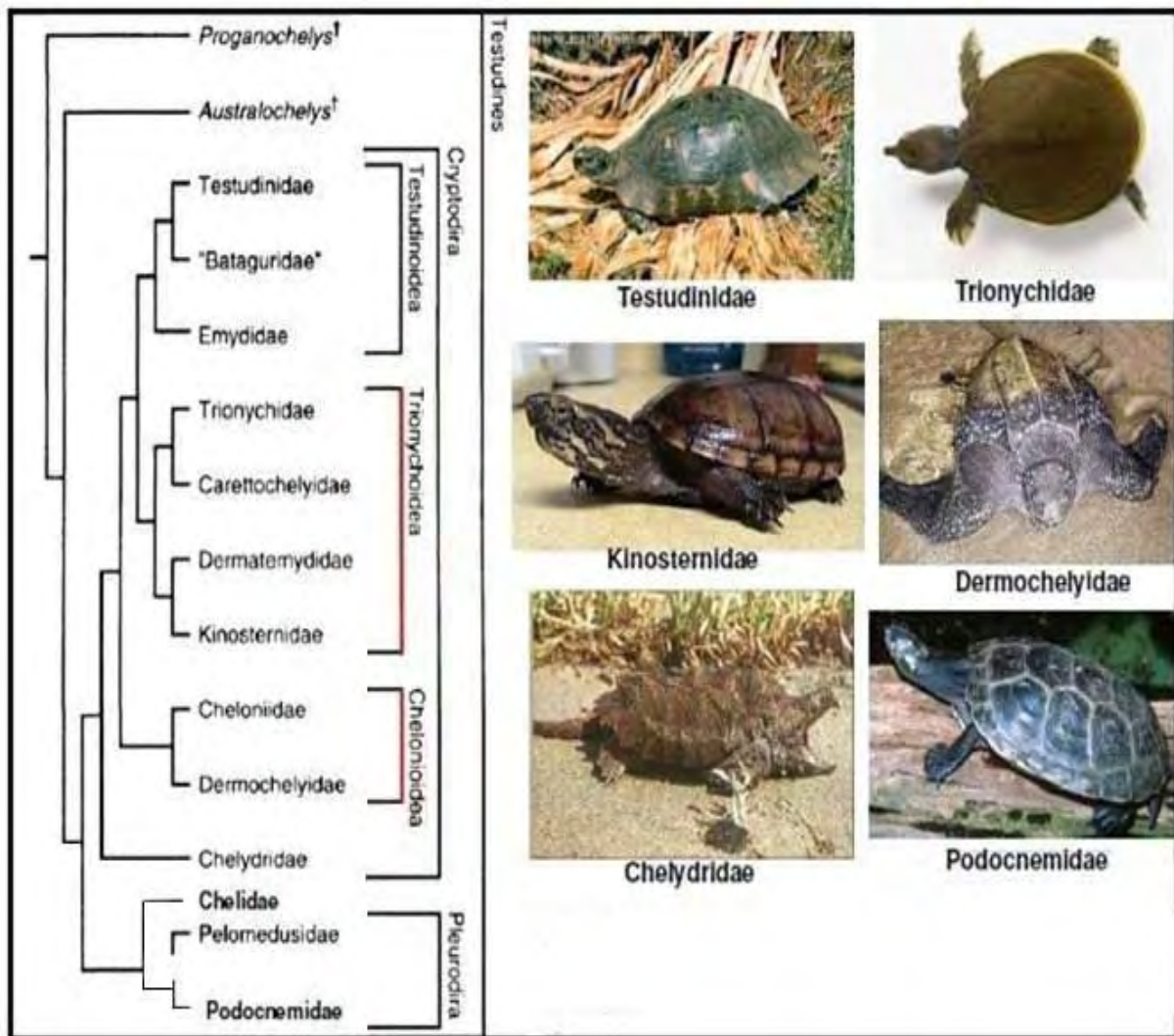


Figura 1. Relações filogenéticas da ordem Testudines. Adaptado de Gaffney e Meylan (1998).

1.2. *Chelonoidis carbonaria* e *Chelonoidis denticulata*

O gênero *Chelonoidis* (FITZINGER, 1835) é representado por quatro espécies da América do Sul, sendo estas: *Chelonoidis carbonaria*, *Chelonoidis denticulata*, *Chelonoidis chilensis* e *Chelonoidis nigra*, sendo a última exclusiva das Ilhas de Galápagos. O gênero *Chelonoidis* foi inicialmente considerado um subgênero de *Geochelone* (FITZINGER, 1856), mas uma recente análise filogenética dos Testudines, que representa a mais abrangente amostragem taxonômica para esse grupo, defende a elevação de *Chelonoidis* para o status de gênero (LE et al., 2006). Portanto, o presente estudo segue esta nova classificação proposta.

A espécie *C. carbonaria* (SPIX, 1824), popularmente conhecida como jabuti-piranga ou jabuti-de-patas-vermelhas, é um animal terrestre encontrado em regiões de cerrado na Venezuela, Colômbia, Suriname, Guianas, Guiana Francesa, Bolívia, Paraguai, Argentina, Caribe, nas ilhas Venezuelanas Margarita e Los Tertigos e, no Brasil, nos estados do Pará, Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia, Goiás, Mato Grosso e Roraima. Estes animais apresentam uma forte carapaça convexa de cor cinza à marrom ou preta, com desenhos simétricos vermelhos ou amarelados. Seu plastrão apresenta a mesma coloração escura, com forma côncava nos machos (PRITCHARD, 1979; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989).

A espécie *C. denticulata* (LINNAEUS, 1766), popularmente conhecida como jabuti-tinga ou jabuti-de-patas-amarelas, possui a cabeça e patas amarelas e a escama nasal preta. Os machos são maiores que as fêmeas, podendo atingir até 70 cm de comprimento e as fêmeas até 40 cm, sendo o peso médio da espécie entre 8 e 18 kg. A espécie representa o maior quelônio terrestre da América do Sul, podendo ser encontrado em florestas densas tropicais e subtropicais, do Sudeste da Venezuela, passando pelas planícies da Guiana para o Brasil, onde habitam toda bacia Amazônica, ocupando áreas da porção oriental do Equador e Colômbia, Norte oriental do Peru e Norte e Sudeste da Bolívia (PRITCHARD; TREBBAU, 1984). No Brasil, ocorre em pontos restritos da região Nordeste, na bacia do Rio Mearim, no Maranhão, e próximo à foz do Rio São Francisco; na região Centro-Oeste está presente junto às nascentes do Rio Tocantins. Em Goiás, ocorre na bacia do Rio Paraguai, nas bordas do Pantanal matogrossense, e na região Sudeste, ocorre em pontos da

Mata Atlântica, próximos a costa, entre a Bahia e o Rio de Janeiro (PRITCHARD; TREBBAU, 1984).

A espécie *C. denticulata* é frequente em florestas tropicais, enquanto que *C. carbonaria* é encontrada em uma gama mais ampla de ambientes, incluindo florestas secas e áreas de vegetação florestal em cerrados. Entretanto, em várias localidades, essas espécies ocorrem em simpatria, especialmente em regiões de transição entre florestas e cerrado (AUFFENBERG, 1965; MEDEM et al., 1979; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; ZUG, 1993; MOSKOVITS, 1998; JEROZOLIMSKI, 2005).

O período reprodutivo é influenciado pelas estações do ano e ocorre, geralmente, a partir do mês de outubro. O período de desova se dá entre os meses de fevereiro e março. Essas épocas podem variar em cada região devido aos fatores climáticos. As posturas são realizadas, preferencialmente, após o período de chuvas, o que facilita a abertura do ninho (HIGHFIELD, 1996). A fêmea enterra os ovos em locais com baixa umidade e incidência de raios solares, não necessariamente em uma única postura. Os ovos ficam incubados por cerca de quatro meses, sendo que este período pode sofrer variação dependendo da temperatura de incubação. Os filhotes começam a se alimentar por volta de um mês de idade, durante esse período nutrem-se com a reserva vitelínica que mantêm no abdômen ao saírem do ovo, pois geralmente ainda estão enterrados. Na natureza os Testudines alimentam-se de frutas, flores, folhas, gramíneas e restos de animais. Os filhotes deste grupo alimentam-se frequentemente das fezes de adultos, processo que auxilia a composição de sua flora intestinal (HIGHFIELD, 1996).

A maioria das espécies de quelônios apresenta maturidade tardia, porém, a grande longevidade associada à alta taxa de sobrevivência de indivíduos adultos e a aparente ausência de senilidade fisiológica ou anatômica, permite que apresentem períodos reprodutivos prolongados (GIBBONS, 1987; CONGDON et al., 1993). Medem e colaboradores (1979) relatam que a maturidade sexual em *C. denticulata* e *C. carbonaria* é atingida aos cinco anos de idade; porém, há relatos na literatura de uma fêmea que depositou ovos pela primeira vez apenas aos 11 anos de idade (JEROZOLIMSKI, 2005).

Castaño-Mora e Lugo-Rugeles (1981) obtiveram para cada uma das 12 fêmeas de *C. carbonaria* e das sete fêmeas de *C. denticulata*, mantidas em cativeiro na Colômbia, a média de 11 ovos produzidos em cada um dos dois períodos reprodutivos consecutivos que

amostraram. Entretanto, em populações silvestres, sugere-se que a produção média de ovos por fêmea adulta seja menor, pois é provável que uma menor proporção das fêmeas seja fecundada a cada estação reprodutiva (JEROZOLIMSKI, 2005).

A forma, tamanho, coloração, número e disposição dos escudos que compõem o casco são características importantes na identificação genérica e específica dos Testudines (MEDEM 1976; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; MOLINA; ROCHA, 1996).

As espécies *C. carbonaria* e *C. denticulata* assemelham-se em certos aspectos, tais como: tamanho corporal, forma, dieta e comportamento. Geralmente podem ser identificadas no campo por meio da coloração das patas e pelas características morfológicas descritas na literatura (WILLIAMS, 1960; CASTANÕ-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; MOSKOVITS, 1998). O padrão dos escudos que compõem o casco dos quelônios de uma mesma espécie é bastante uniforme (PRITCHARD, 1979), mas variações nesse padrão já foram descritas e analisadas para um grande número de espécies, incluindo as espécies do presente estudo (ZANGERL; JOHNSON, 1957; PRITCHARD, 1979; SIQUEIRA et al., 2004).

1.3. Diferenciação morfológica e genética de *C. carbonaria* e *C. denticulata*

A Floresta Tropical Amazônica foi fragmentada em meados do Pleistoceno, abrindo um corredor central de colonização em habitats de floresta seca ou cerrado, sugerindo que flutuações climáticas e de vegetação desempenharam um importante papel na formação da biodiversidade da América do Sul, nas regiões mais próximas aos trópicos (VARGAS-RAMÍREZ; MARAN; FRITZ, 2010).

A Floresta Amazônica contínua permitiu o fluxo gênico entre as populações de *C. denticulata*, estabelecendo populações geneticamente homogêneas. Já, a espécie *C. carbonaria*, por preferir áreas abertas, como cerrado, evoluiu por vicariância, resultando em populações com estrutura genética distintas. Essa diversidade foi moldada pela dispersão ocorrida após a redução nas florestas tropicais e subsequente vicariância causada pela reexpansão florestal, levando à fragmentação de populações em ilhas de caatinga. Tais dados sugerem uma forte correlação entre o habitat e diferenciação filogeográfica nessas espécies (VARGAS-RAMÍREZ; MARAN; FRITZ, 2010). Dados semelhantes foram

encontrados para *Crotalus durissus*, por Quijada-Mascareñas et al. (2007) e Wüster et al. (2005), e são compatíveis com as flutuações na distribuição da floresta tropical Amazônica.

Poucos marcadores morfológicos citados na literatura para a diferenciação das espécies *C. carbonaria* e *C. denticulata* apresentam eficiência. Destes, destacam-se os da região cefálica, carapaça, plastrão e coloração. São relatados na literatura padrões morfológicos variados em *C. carbonaria*, sugerindo a presença de exemplares resultantes de interações entre ambas ou morfotipos distintos (SIQUEIRA et al., 2004).

A caracterização das espécies estudadas, por meio dos parâmetros morfológicos descritos na literatura, vem sendo questionada desde quando Williams (1960) examinou um grande número de espécimes, afirmando que características distintas entre elas deveriam ser revistas, pois nem sempre era possível uma correta identificação dos indivíduos encontrados em museus ou na natureza, tendo em vista que alguns espécimes de *C. carbonaria* apresentavam tamanhos e coloração distintos do padrão da espécie (PRITCHARD, 1979).

Em 1965, Auffenberg descreveu a espécie *Geochelone hesterna*, uma tartaruga fóssil do Mioceno encontrada na Colômbia, que apresentava características morfológicas intermediárias entre *C. carbonaria* e *C. denticulata*. Esta espécie é considerada ancestral de *C. carbonaria* e *C. denticulata*, cuja separação teria ocorrido com o desenvolvimento do cerrado e prados periféricos à bacia Amazônica no Pleioceno ou Pleistoceno, com as espécies se tornando distintas por isolamento geográfico, ficando a espécie *C. denticulata* restrita a florestas tropicais e *C. carbonaria* a cerrados e campos abertos.

Trabalhos com genética populacional de *C. carbonaria* e *C. denticulata* encontraram haplótipos de DNA mitocondrial de *C. denticulata* em quatro indivíduos de *C. carbonaria*, com coloração e tamanho diferentes do padrão da espécie. Essas características sugerem a presença desses haplótipos como resultado de um polimorfismo ancestral mantido na população durante a separação destas espécies, ou indício de um possível evento de hibridação, porém não confirmado (JEROZOLIMSKI, 2005; FARIAS et al., 2007). Eventos de hibridação introgressiva são causados por cruzamentos interespecíficos repetidos ou mesmo contínuos, causando assim uma infiltração de genes de uma espécie em outra, em decorrência da ausência de mecanismos de isolamento reprodutivo. A ocorrência destes eventos é maior em áreas de simpatria ou parapatria do que em áreas de alopatria

(TAYLOR; MCPHAIL, 2000; JEROZOLIMSKI, 2005) e, particularmente, em áreas onde uma espécie está se expandindo em direção a novas áreas (BALLARD; WHITLOCK, 2004; JEROZOLIMSKI, 2005). Esse processo pode estar associado a problemas ecológicos, como por exemplo, *C. carbonaria*, que, devido à substituição de seu habitat natural (cerrado) por monoculturas e pastagens, expandiu sua área de ocorrência para áreas mais próximas à Mata Atlântica. Essa expansão possibilitou que entrasse em simpatria com sua espécie irmã, *C. denticulata*, o que pode favorecer a ocorrência de processos de hibridação. Contudo, essa hipótese não foi confirmada pela literatura (ALLENDORF et al., 2001; LE et al., 2006).

As espécies *C. carbonaria* e *C. denticulata* são consideradas ameaçadas, segundo o CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*), podendo vir à extinção caso o comércio ilegal e a perda de habitat não sejam controladas. Em adição, a espécie *C. denticulata* é também considerada vulnerável pela lista vermelha da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), indicando risco de extinção na natureza (IUCN, 2004).

1.4. Análise da estrutura cromossômica de *C. carbonaria* e *C. denticulata*

1.4.1. Citogenética Clássica

Uma das possibilidades de elucidar as diferenças entre espécies se dá por meio do estudo dos cromossomos, com base no cariótipo e em padrões de bandamentos cromossômicos. No entanto, existem poucos dados na literatura sobre estudos citogenéticos em Testudines brasileiros, a maioria concentra-se em representantes da família Chelidae da América do Sul, Austrália e África (BULL; LEGLER, 1980; MC BEE et al., 1985).

Na década de 70, foram desenvolvidas novas técnicas de bandamento cromossômico. Dentre essas, a que permite localizar a heterocromatina constitutiva é a técnica de bandamento C, na qual os cromossomos espalhados na lâmina são mergulhados numa solução básica (hidróxido de bário) e, em seguida, expostos a uma solução salina à temperatura elevada. Durante esse procedimento, o DNA é fragmentado e, progressivamente eliminado do cromossomo; no entanto, o DNA da heterocromatina

constitutiva é menos extraído durante esse processo que o restante do DNA. A associação do DNA com as proteínas na heterocromatina é diferente e mais resistente às condições da técnica de bandeamento C do que a associação DNA - proteína da eucromatina, ocorrendo, assim, maior extração de DNA na eucromatina. Dessa forma, quando os cromossomos são corados, as regiões heterocromáticas ficam mais evidentes, formando blocos escuros denominados bandas C (c = constitutiva). O corante utilizado nessa técnica é o Giemsa, que cora sensivelmente os cromossomos, mesmo quando esses apresentam pouco DNA (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

Uma ferramenta importante que trouxe e continua trazendo contribuições substanciais nos estudos citotaxômicos são os marcadores citogenéticos. Com essas ferramentas se torna possível, em alguns casos, determinar a caracterização de populações, espécies e grupos supra-específicos, incluindo não somente número cromossômico e fórmula cariotípica, mas também sistemas de cromossomos sexuais diferenciados, cromossomos supranumerários, número e localização das regiões organizadoras de nucléolos (RON), distribuição da heterocromatina constitutiva, bandeamento G e coloração por fluorocromos base-específicos (ALMEIDA-TOLEDO, 1998).

Brown (1966) identificou dois tipos de heterocromatina: a *facultativa* que pode se comportar como heterocromatina condensada na intérfase, tendo replicação tardia e ausência de expressão gênica, ou como uma eucromatina típica (eucromatina heterocromatinizada facultativa) e a heterocromatina *constitutiva* que permanece condensada durante todo o ciclo celular e em todas as células do indivíduo. Os dois tipos de heterocromatina concentram-se em blocos, aparecendo em ambos os cromossomos homólogos na mesma posição e com o mesmo tamanho (NITTA, 1980; GUERRA, 1988).

O termo heterocromatina é utilizado, atualmente, em citogenética e biologia celular para designar a cromatina de regiões específicas dos cromossomos que permanecem condensados durante a intérfase. Devido a esta propriedade (nível de condensação), a heterocromatina apresenta um padrão de colorabilidade que permite distingui-la da cromatina não compacta (eucromatina) durante um mesmo período do ciclo celular. Alguma quantidade de heterocromatina sempre é encontrada em alguns ou todos os cromossomos de um eucarioto. Suas propriedades de coloração variam intra e interespecificamente, mostrando-se, dessa forma, importante nos estudos sobre a natureza

do DNA, identificação de polimorfismos, caracterização de espécies, populações, e em estudos evolutivos (SUMNER, 1990).

Devido ao aspecto de que regiões heterocromáticas permanecem condensadas durante o ciclo celular e que estudos moleculares mostraram serem estas regiões compostas por DNA altamente repetitivo, a heterocromatina tem sido descrita como sítios de genes inativos. No entanto, nem todas as regiões de DNA não transcrito e de genes inativos encontram-se como heterocromatina e não necessariamente há ausência de atividade transcricional nessas regiões.

A heterocromatina nos cromossomos ocorre em grandes blocos ou segmentos e estes podem estar intercalados por segmentos de eucromatina. Inversamente, quantidades pequenas de heterocromatina podem ocorrer na eucromatina (PIECZARKA; MATTEVI, 1998). O estudo da heterocromatina, dessa forma, pode representar uma importante ferramenta por meio da qual se detecta alterações complexas na estrutura cariotípica.

Após a descoberta da técnica de bandamento C, foi desenvolvida outra técnica que produz bandas claras e escuras em cada cromossomo. Essa técnica foi denominada bandamento G, porque se pensava que o corante Giemsa estava envolvido no mecanismo de determinação dessas bandas. Atualmente, sabe-se que as bandas G, ou segmentos que reagem positivamente à técnica de bandamento G (regiões escuras), representam os segmentos cromossômicos que se condensam mais cedo na prófase, enquanto o segmento negativo para bandamento G (regiões claras) é condensado mais tardiamente. As bandas G não evidenciam a heterocromatina, mas constitui em alguns grupos, um excelente meio de identificação cromossômica, permitindo detectar rearranjos cromossômicos e comparar cariótipos de espécies relacionadas (MURUGESAN et al., 2001).

Os bandamentos G e C permitem detectar variações estruturais como deleções, essas replicações, inversões, sendo possível localizar a região afetada do cromossomo. Essas variações não são detectadas com a coloração convencional, pois a mesma revela apenas a heterozigose cromossômica e em alguns casos a presença de constrições secundárias (GUERRA, 1988).

Outra técnica importante para estudos citogenéticos é a impregnação com íons prata, um método seletivo para a marcação de Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs), nucléolos interfásicos, regiões de constrições secundárias ou outras regiões com

sítios responsáveis pela transcrição de RNA ribossomal (rRNA). A grande limitação dessa técnica é o fato de marcar apenas as RONS que foram ativamente transcritas durante as interfases precedentes às metáfases analisadas, não possibilitando, muitas vezes, a demonstração do número real de RONS (SUMNER, 1972).

Os genes ribossomais estão presentes em inúmeras cópias e estão concentrados em um domínio nuclear ocupado pelos nucléolos. Embora genes extranucleolares e seus RNAs transcritos possam também ser localizados em territórios nucleares específicos, os nucléolos são particularmente bons modelos para correlacionar aspectos moleculares da expressão gênica com estruturas nucleares. Além das proteínas ribossomais, os nucléolos contêm um grande número de proteínas não ribossomais envolvidas em vários aspectos da biogênese ribossomal e manutenção da estrutura nucleolar (FEITOSA, 2008).

Cada unidade dos genes ribossomais consiste basicamente de uma região não transcrita, localizada no espaço intergênico e separada por espaços transcritos internos, onde se localizam os genes. O comprimento real do gene rRNA varia entre as espécies, e embora o 5,8S tenha geralmente o mesmo comprimento, as outras subunidades podem se apresentar menores. Ao contrário das variações em comprimento, existe uma considerável similaridade de sequências entre os genes ribossomais de diferentes organismos. Já, os espaços entre esses genes são mais variáveis. O número de cópias dos genes ribossomais também apresenta alta variabilidade entre espécimes como por exemplo: fungos e insetos apresentam em torno de 100 cópias de rRNA, enquanto plantas e anfíbios têm cerca de 10.000 cópias. O polimorfismo no número de cópias é frequente, e pode ocorrer no mesmo indivíduo ou entre indivíduos diferentes. Os genes de rRNA podem estar restritos a um único par de cromossomos homólogos, ou em vários cromossomos (HOWELL, 1982; FEITOSA, 2008). O número e a distribuição das RONS podem variar intra ou inter especificamente, auxiliando na caracterização cromossômica de diferentes espécies ou táxons (SCHEER et al., 1993).

Durante a mitose, a síntese de RNA é estagnada e, concomitantemente, o nucléolo tende a desaparecer. Assim, no estágio de prófase, o componente fibrilar denso desaparece e o componente granular é liberado no núcleo. Em algumas situações o conteúdo granular pode ficar associado aos cromossomos, especialmente na metáfase. Na telófase, novos nucléolos são formados em uma ou mais RONS, de forma que o componente fibrilar denso

surge adjacente ao centro fibrilar enquanto que o componente granular desaparece (DERENZINI, 2000). A natureza citoquímica do processo de coloração por íons prata ocorre em proteínas não histônicas associadas ao RNA recém-transcrito que se acumulam ao redor das RONS ou dos nucléolos. Estas proteínas são a C23 (37 Kda) encontrada no centro fibrilar do nucléolo interfásico e na RON metafásica, e a proteína B23 (100 Kda), localizada na periferia do nucléolo (HOWELL, BLACK, 1980).

Estas proteínas acídicas associadas às RONS podem ser localizadas nos cromossomos por meio da técnica de impregnação por íons prata (HOWELL, BLACK, 1980; TEIXEIRA et al., 1996; LO MUZIO et al., 1997) devido a reatividade dos seus grupos sulfídricos e carboxílicos que precipitam os íons de prata (WARNAKULASURIYA; JOHNSON, 1993). Os grânulos marcados por prata são visualizados como estruturas arredondadas de número variável, coradas em preto ou marrom no interior dos núcleos (FREITAS; ARAÚJO; ARAÚJO, 1993). A técnica foi descrita e denominada AgNOR, por Howell e Black, em 1980.

1.4.2. Citogenética Molecular

As técnicas de bandamentos cromossômicos desenvolvidas a partir de 1970, representaram um marco para a citogenética de mamíferos e outros vertebrados, tornando possível a identificação precisa de cada cromossomo pela sua diferenciação longitudinal e a detecção de regiões específicas como de heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras de nucléolos. Posteriormente, foram desenvolvidas as colorações com fluorocromos base-específicos, bandas de alta resolução e bandas de replicação dependente do uso de análogos de bases incorporada ao DNA durante o ciclo celular. Na década de 1980, a biologia molecular associada à citogenética, resultou no nascimento de uma nova área, a Citogenética Molecular. Os cromossomos puderam ser isolados de outros componentes celulares, ser individualizados em preparações puras e fracionados em seus componentes moleculares. Os fragmentos de moléculas de DNA puderam ser clonados e sequenciados.

A técnica de hibridação *in situ* (HIS) consiste, basicamente, no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA com uma sequência de nucleotídeos

complementar, visando verificar a existência e localização de sequências específicas. Para visualizar o segmento de DNA ou RNA hibridizado é necessário que ele esteja marcado com alguma molécula de fácil identificação, funcionando como uma sonda para detectar a sequência complementar de nucleotídeos, chamada sequência alvo. O híbrido sonda/alvo pode ser DNA/RNA, RNA/RNA ou DNA/RNA.

A HIS tem sido utilizada para localizar as mais diversas sequências de nucleotídeos, como genes de copia única, moléculas de RNA mensageiro ou DNA viral inserido no cromossomo. Essa técnica é uma das mais informativas e elegantes da citologia, sendo aplicada em áreas tão diversas quanto a biologia do desenvolvimento, a citotaxonomia, a citogenética clínica e o melhoramento genético.

A técnica baseia-se no fato de que o DNA é formado por duas fitas complementares, as quais podem ser facilmente separadas em fitas simples, ou desnaturadas, e posteriormente renaturadas, voltando ao estado de fita dupla. Se, durante a renaturação do DNA cromossômico, houver sonda disponível no meio em torno do cromossomo, as cópias da sonda competirão com as fitas do DNA cromossômico e poderão ser hibridizadas *in situ*, isto é, no sítio exato onde aquela sequência ocorre naturalmente.

A revolução recente dessa técnica foi o uso de sondas não-radioativas que possibilitou grande expansão nas áreas de citogenética clínica, evolutiva e de mapeamento gênico. A HIS permitiu, em muitos casos, a detecção de segmentos cromossômicos não identificáveis pelas técnicas de bandamento. Assim, por seu alto poder de resolução e facilidade de manipulação, a técnica permitiu a localização de milhares de genes em vários organismos.

A hibridização *in situ* fluorescente (HIS) representa uma tecnologia direta, rápida, de alta resolução e bastante eficaz para a detecção e mapeamento de segmentos-alvo de DNA, por meio da utilização de uma sonda que apresenta sequência complementar.

É importante ressaltar que no estudo dos cromossomos de répteis, dados de bandamento cromossômico clássico e molecular ainda não desempenham papel relevante na literatura, devido as dificuldades em se obter bons índices mitóticos e problemas na padronização das técnicas (GUERRA, 2004).

Trabalhar com citogenética de quelônios é um desafio, em virtude das dificuldades em se obter bons índices mitóticos e, também, pela falta de padronização das técnicas

citogenéticas clássicas e moleculares. Portanto, considerando-se a escassez de trabalhos sobre estudos citogenéticos em quelônios brasileiros e a importância biológica desses animais, no presente estudo foi realizada a análise citogenética de *C. carbonaria*, *C. denticulata* e *C. carbonaria**, um provável morfotipo de jabuti.

Tendo em vista os relatos de indivíduos morfologicamente distintos na espécie *C. carbonaria*, o presente estudo teve por objetivo confirmar a existência de um morfotipo de jabuti, em um grupo de animais de cativeiro, com base em dados morfológicos e citogenéticos.

Objetivos

2. Objetivos Gerais

- Caracterizar morfo e citogeneticamente as espécies de jabutis brasileiras, *C. carbonaria* e *C. denticulata*, além de um grupo morfológicamente distinto de *C. carbonaria* (*C. carbonaria**);
- Correlacionar os dados morfológicos e citogenéticos encontrados, para detectar diferenças entre esses grupos avaliados.

2.1. Objetivos específicos

- Caracterizar o dimorfismo sexual em *C. carbonaria*, *C. carbonaria** e *C. denticulata*;
- Caracterizar as diferenças morfológicas entre as espécies estudadas, viabilizando um melhor reconhecimento de ambas;
- Padronizar o protocolo de cultura para linfócitos das espécies de jabuti brasileiras;
- Padronizar os protocolos para técnicas de citogenética clássica, específicas para jabutis brasileiros, com o objetivo de implantá-las no estudo de outras espécies desse grupo por pesquisadores da área;
- Caracterizar o cariótipo de *C. carbonaria*, *C. carbonaria** e *C. denticulata*, com base em técnicas de citogenética clássica de bandamento (C, G, Ag-Nor) e molecular, por meio de hibridação *in situ* (HIS);
- Comparar o cariótipo dos três grupos analisados, no intuito de verificar diferenças em seus cromossomos, para que estes dados possam ser utilizados com fins taxonômicos;
- Correlacionar às diferenças cromossômicas e morfológicas dos três grupos estudados.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Amostras

As amostras foram coletadas no criatório “Reginaldo Uvo Leone” (Registro IBAMA nº. 167525), localizado na cidade de Tabapuã - SP (20° 59’ 47.4” S, 49° 07’ 16.6 ” W). O presente trabalho possui licença do IBAMA/RAN- 19514-1 e aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) UNESP/IBILCE (protocolo número 018/09). Os animais do criatório são provenientes de Zoológicos, Parques e de apreensões realizadas pela Polícia Ambiental, sendo em sua maioria, provenientes de populações naturais, porém sem procedência confirmada.

Os jabutis foram identificados como *C. carbonaria* ou *C. denticulata*, por meio das características descritas por Williams (1960), Castanõ-Mora e Lugo-Rugeles (1981), Pritchard e Trebbau (1984) e Moskovits, (1998), e os animais que não se enquadravam como nenhuma das espécies foram considerados *C. carbonaria**. Os animais foram identificados com base nas placas de aço numeradas utilizadas como marcação para controle dos indivíduos existentes no criatório.

Foram avaliados 90 animais separados em três grupos, sendo estes: *C. carbonaria*, *C. denticulata* e um grupo composto por animais descritos na literatura como *C. carbonaria*, mas que apresentam características diferenciadas, como tamanho e coloração. Por este motivo, estes animais foram denominados como *C. carbonaria**. Para cada grupo, foram avaliados 15 machos e 15 fêmeas, totalizando 30 espécimes por grupo.

3.2. Análise morfométrica

Foram realizadas aferições morfológicas, por meio do uso de paquímetro e fita métrica, para avaliar a presença de caracteres morfológicos sexualmente dimórficos em cada grupo, e comparando esses dados entre os mesmos, utilizando, além da massa e do tamanho corporal, características relacionadas à forma da carapaça e do plastrão. As características avaliadas foram utilizadas para o estabelecimento das diferenças morfológicas entre *C. carbonaria*, *C. carbonaria** e *C. denticulata*.

Apenas os animais que apresentaram comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) maior ou igual a 25 cm foram utilizados para as análises morfológicas, pois indivíduos que apresentam CCC abaixo de 25 cm não possuem características sexualmente dimórficas evidentes (JEROZOLIMSKI, 2005).

A massa corporal dos jabutis foi registrada com uma balança CAMRY[®], com capacidade para 100 kg. As medidas lineares e curvilíneas foram realizadas com uma trena acompanhando-se a superfície referente da carapaça ou do plastrão. O uso simultâneo de medidas lineares e curvilíneas permite uma melhor caracterização da forma do casco, já que carapaças e plastrões com o mesmo comprimento linear podem apresentar formas bem distintas (BONNET et al., 2001).

Para a determinação do comprimento e da largura da carapaça, plastrão e a altura do casco, utilizou-se uma trena e um dispositivo tipo paquímetro, construído com duas peças de canaleta completas (ENERBRAS[®] 361/2-E), com diferentes comprimentos (uma peça com 1 m, e a outra com 35 cm), formando um "L". As peças foram cortadas e coladas em um ângulo de 90°. Para a utilização do dispositivo, manuseavam-se as peças, permitindo a movimentação das mesmas, obtendo-se com as hastes, a distância entre os pontos a serem medidos utilizando-se de uma trena (BRITES, 2002, com modificações).

A nomenclatura das placas ou escudos córneos dos jabutis foram as mesmas adotadas por Pritchard e Trebbau (1984). Para cada jabuti foi registrada a massa corporal e 19 medidas do plastrão e carapaça. Para garantir a compreensão das medidas registradas, o Quadro 1 e a figura 2 apresentam a descrição detalhada dos parâmetros morfológicos avaliados.

Quadro 1. Descrição dos parâmetros morfológicos avaliados.

Medidas da carapaça
<p>Altura da carapaça (AC): Medida verticalmente, entre a extremidade superior da sutura entre o segundo e o terceiro escudos vertebrais até a extremidade inferior do escudo abdominal.</p> <p>Comprimento curvilíneo da carapaça (CCC): Medida ao longo da região mediana dos escudos vertebrais, partindo da extremidade anterior do primeiro par de escudos marginais até a extremidade posterior do escudo supra-caudal.</p> <p>Comprimento linear da carapaça (CLC): Distância entre a extremidade anterior e posterior da carapaça.</p> <p>Largura curvilínea da carapaça (LCC): Medida pela região dorsal, ao longo do eixo que passa pela extremidade posterior do segundo escudo vertebral, entre os pontos de inflexão do sexto par de escudos marginais, onde se curvam na direção do plastrão.</p> <p>Largura linear da carapaça (LLC): Medida da largura da carapaça na altura da região mediana, no sexto par de escudos marginais.</p>
Medidas do Plastrão
<p>Comprimento curvilíneo do plastrão (CCP): Medida ao longo da sutura médio-ventral do plastrão, entre a extremidade anterior dos escudos gulares e a extremidade posterior da sutura entre os escudos anais.</p> <p>Comprimento linear do plastrão (CLP): Medida entre a extremidade anterior dos escudos gulares até a extremidade posterior da sutura entre os escudos anais.</p> <p>Escudos gulares (EG): Primeiro par de escudos do plastrão.</p> <p>Escudos humerais (EH): Segundo par de escudos do plastrão, posterior aos escudos gulares.</p> <p>Escudos peitorais (EP): Terceiro par de escudos do plastrão, posterior aos escudos humerais.</p> <p>Escudos abdominais (EAB): Quarto par de escudos do plastrão, posterior aos escudos humerais.</p> <p>Escudos femorais (EF): Quinto par de escudos do plastrão, posterior aos escudos abdominais.</p> <p>Escudos anais (EAN): Último par de escudos do plastrão.</p> <p>Largura curvilínea do plastrão (LCP): Medida ao longo do escudo abdominal entre as suturas deste escudo com o sexto par de escudos marginais.</p> <p>Largura linear do plastrão (LLP): Medida entre as suturas dos escudos abdominais com o sexto par de escudos marginais.</p>
Medidas da abertura posterior, entre a carapaça e o plastrão
<p>Distância central dos escudos anais ao supra-caudal (CA-Sc): Medida da distância entre a extremidade posterior da sutura mediana dos escudos anais e a extremidade inferior do escudo supra-caudal, paralela ao eixo ântero-posterior.</p> <p>Distância da extremidade do escudo anal ao supra-caudal (EA-Sc): Medida da distância da extremidade posterior do escudo anal direito à extremidade inferior do escudo supra-caudal, paralela ao eixo ântero-posterior do jabuti.</p> <p>Distância entre as extremidades dos escudos anais (DEA): Medida da distância linear entre as extremidades posteriores dos escudos anais.</p> <p>Profundidade da abertura dos escudos anais (PEA): Medida da distância entre a extremidade posterior da sutura entre os escudos anais e a linha imaginária que conecta as extremidades destes escudos (linha de medida da DEA).</p>

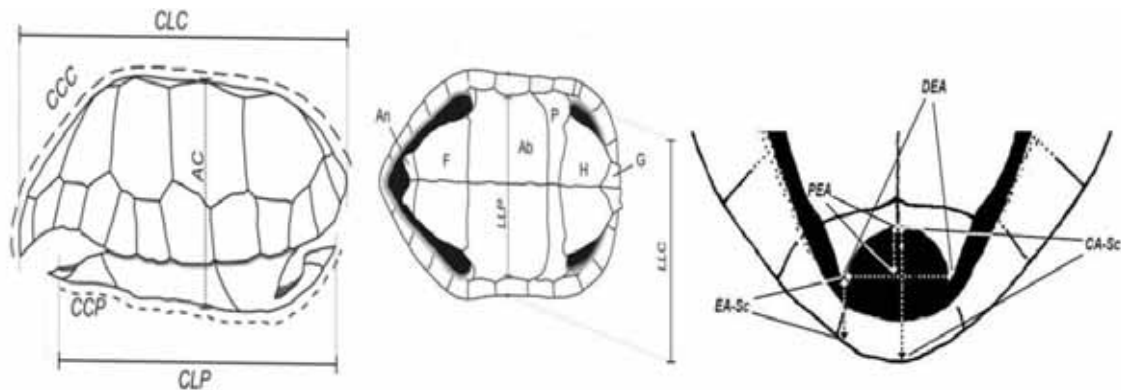


Figura 2. Imagem ilustrativa dos parâmetros morfológicos avaliados. Modificado de Jerzolinski (2005).

3.3. Padronização da cultura de células

Para a análise citogenética foi coletado sangue de dois casais de cada grupo, pela veia margino-costal, sendo colhidos de 3 a 5 mL de sangue total. As amostras foram identificadas e acondicionadas em tubos heparinizados e mantidas em refrigeração até o término das coletas, quando foram colocados em estufa de cultura, à 37° C, para ocorrer a sedimentação dos linfócitos.

Para garantir a assepsia das amostras o local de coleta foi higienizado com álcool 70%. Após o procedimento, os animais permaneceram sob observação por 5 horas, antes de serem devolvidos para os seus respectivos recintos. Todos os animais utilizados para as aferições morfológicas e para as coletas de sangue tiveram suas identificações individuais registradas.

Duas horas após a coleta, foi verificada a sedimentação do sangue, pela formação de duas fases distintas: a superior, amarelada, que constitui o plasma, e a inferior vermelha, com as hemácias sedimentadas. Entre essas camadas observou-se uma delgada camada esbranquiçada que corresponde à deposição dos leucócitos, a qual foi utilizada para a montagem da cultura de linfócitos.

Em uma câmara de fluxo laminar, 2 mL da camada correspondente a deposição de leucócitos, juntamente com hemácias, foram transferidas para um tubo Falcon (15mL) estéril e identificado, contendo 7,5 mL de meio de cultura (MEM), 1,5 mL de soro fetal bovino (CULTILAB) e 375 µL de fitohemaglutina (CULTILAB), para estimular a divisão dos linfócitos. O tempo de incubação foi de 72 horas e a temperatura 37° C.

3.4. Bloqueio

Após 70 horas de incubação, adicionou-se 0,1 mL de colchicina por um período de duas horas, inibindo a formação das fibras do fuso. Tal inibição facilita a obtenção de células metafásicas.

3.5. Hipotonização e fixação

O agente hipotônico utilizado foi (cloreto de potássio, KCL – 0,075M), o que facilitou o espalhamento dos cromossomos nas lâminas, e o fixador (metanol – ácido acético, na proporção de 3:1) preservou as estruturas analisadas.

Estas etapas foram realizadas, por meio dos seguintes protocolos:

3.6. Preparo das lâminas

- As lâminas previamente lavadas foram estocadas em cuba com água destilada e mantidas em geladeira;
- Ressuspendeu-se levemente o material com pipeta Pasteur de ponta fina e pingou-se de três a quatro gotas, em regiões diferentes de uma lâmina já codificada, de uma altura de aproximadamente 90 cm;
- Flambou-se rapidamente em lamparina a álcool;
- Enxugou-se a parte posterior da lâmina com papel absorvente e inclinar a lâmina para secar;
- Envelheceu-se as lâminas em estufa a 50 - 60° C “*over night*”, ou deixá-las em temperatura ambiente por sete dias.

3.7. Coloração usual com Giemsa

- Colocou-se as lâminas em cuba de vidro com berço e realizou-se a hidrólise em HCL 1N, a 60° C por 7 minutos;

- Interrompeu-se a hidrólise mergulhando as lâminas em outra cuba com água destilada gelada;
- Lavou-se em água corrente por 10 minutos;
- Cobriram-se as lâminas com tampão fosfato por 30 segundos, e deixou-se escorrer;
- Corar com Giemsa tamponado (pH 6,8) a 6% , por 5 minutos;
- Lavou-se em água destilada corrente;
- Escorreu-se e secou-se com papel de filtro ou secador;
- As lâminas prontas foram mantidas em geladeira, para conservar as marcações e coloração por mais tempo.

3.8. Bandamento C (SUMNER, 1972 com modificações)

- As lâminas tinham de sete dias a dois meses, ou foram envelhecidas previamente em estufa a 60° C "over night". Seguiu-se o seguinte protocolo:
- Mergulhou-se a lâmina em HCL 0,2N, por 5 minutos;
- Lavou-se em água deionizada gelada e secar;
- Mergulhou-se a lâmina em uma cuba contendo solução de Ba (OH)₂ aquecido a 37° C e recém-filtrado, por 10 minutos;
- Mergulhou-se a lâmina, por 30 segundos em ácido acético glacial a 3%;
- Deram-se dois banhos em água deionizada gelada, 5 minutos cada. Secou-se ao ar livre ou com secador;
- Incubou-se em 2xSSC à temperatura ambiente por 10 minutos;
- Incubou-se em 2xSSC a 60° C por 1 hora;
- Lavou-se em água deionizada gelada e secou-se;
- Mergulharam-se em álcool 70% (duas cubas) por 5 minutos cada vez;
- Mergulharam-se em álcool 95% (duas cubas), por 5 minutos cada vez;
- Corou-se com solução tamponada de Giemsa a 6%, por 4 minutos;
- Lavou-se em água deionizada e secar.

3.9. Bandamento G (SEABRIGHT, 1971 com modificações)

- Os melhores resultados desta técnica foram obtidos com lâminas de 5 a 10 dias envelhecidas “*over night*”, em estufa a 60° C;
- Montaram-se cinco boréis: 1 com tripsina, 2 com tampão Sorensen, 1 com Giemsa tamponada a 6% e 1 com água deionizada;
- Pesou-se 12 mg de tripsina em 1 borel e diluir com 50 mL de tampão Sorensen. Prepararam-se dois boréis com 50 mL de tampão Sorensen em cada;
- Diluem-se três mL de Giemsa (Solução Mãe), em 47 mL de tampão Sorensen. Com exceção da solução de Giemsa, as demais soluções foram preparadas pela manhã e usadas ao longo do dia;
- Colocou-se a lâmina por 20 segundos em solução de tripsina;
- Deu-se um banho rápido no tampão Sorensen;
- Passou-se a lâmina para o próximo borel de tampão e deixou-se 2 minutos;
- Guardou-se a solução de tripsina na geladeira até a próxima utilização. Deixou-se a lâmina no Giemsa durante 4 minutos, agitando periodicamente;
- Lavou-se em água deionizada e secou-se.

3.10. Impregnação por íons prata (Ag-NOR) (HOWELL; BLACK, 1980 com modificações)

- Pipetou-se uma gota de solução reveladora e uma gota de solução aquosa de nitrato de prata em cada metade da lâmina;
- Misturaram-se as soluções assoprando com pipeta Pasteur e cobrir com lamínula;
- Incubou-se em estufa a 60°C, por 8 minutos ou até que a solução adquira uma coloração castanho-dourada;
- Lavou-se em água corrente;
- Corou-se em solução tamponada de Giemsa a 6%, por 4 minutos;
- Lavou-se em água corrente e secar.

3.11. Hibridação *in situ* (HIS) (LEITCH et al., 1994)

1ª Etapa: Tratamento das lâminas e hibridação *in situ*

- Colocou-se 50 µL de RNase diluída em 2x SSC (1:100) em cada lâmina e levou-se à estufa a 37°C por 1 hora;
- Lavaram-se as lâminas em 2x SSC, por 10 minutos, a temperatura ambiente no agitador;
- Descartou-se o 2x SSC e colocou-se álcool etílico 70%, por 5 minutos no agitador;
- Descartou-se o álcool 70% e colocou-se em álcool 100%, por 5 minutos no agitador;
- Descartou-se o álcool 100% e deixou-se as lâminas secando-se, por 1 a 3 horas;
- Neste intervalo preparou-se a mistura de hibridação (30 µL por lâmina);
- Desnaturou-se a mistura de hibridação (HIS) a 70°C, por 10 minutos, em banho-maria;
- Incubou-se no gelo por, no mínimo 5 minutos e, no máximo 2 horas, para que o DNA (sonda) não renaturase no tubo;
- Colocou-se 30 µL da mistura de HIS em cada lâmina, cobriu-se com lamínulas plásticas e levou-se para o termociclador a 90°C por 10 minutos, 48°C por 10 minutos; 38° C por 5 minutos e 37°C por 10 minutos;
- Transferiu-se as lâminas para a câmara úmida a 37 °C durante a noite;
- Retirou-se as soluções de 2x SSC, 0,1x SSC e 4x SSC 0,2% *Tween* da geladeira e colocou-se na bancada para os banhos pós - hibridação no dia seguinte.

2ª Etapa: Banhos pós - hibridação (estringência de 80-85%)

- Ligou-se o banho-maria e ajustou-se para 42° C. Colocou-se as soluções para aquecer e preparou-se a formamida 20% em 0,1x SSC;
- Retirou-se as lâminas da estufa e colocou-se em um jarro de Coplin pré - aquecido (cerca de 42° C). Agitou-se em um *shaker* por 5 minutos;

- Descartou-se 2x SSC e, na mesma cubeta, colocou-se formamida 20% a 42°C, por 10 minutos em agitação;
- Descartou-se a formamida em vidro apropriado e colocou-se na cubeta 0,1x SSC a 42°C, por 5 minutos em agitação;
- Descartou-se o 0,1x SSC e, na mesma cubeta, colocou-se o 2x SSC a 42°C, por 5 minutos em agitação;
- Descartou-se o 2x SSC e colocou-se o 4x SSC e 0,2% de *tween*, a 42°C, por 5 minutos em agitação;
- Descartou-se o 4x SSC 0,2% *tween* e colocou-se o 4x SSC 0,2% *tween*, por 5 minutos no agitador a temperatura ambiente. Colocou-se lamínula;
- Tirou-se as lâminas da estufa, lavou-se em 6x SSC à temperatura ambiente, por 10 minutos, em agitação. Retirou-se a lamínula de plástico;
- Descartou-se o 6x SSC na e, na mesma cubeta, colocou-se 6x SSC a 42°C, por 10 minutos em agitação;
- Descartou-se a solução de 6x SSC e colocou-se na mesma cubeta 6x SSC a 42°C, por 3 minutos, sem agitar;
- Descartou-se o 6x SSC e, na mesma cubeta, colocou-se o 4x SSC/*Tween*, a temperatura ambiente, por 5 minutos, em agitação.

3ª Etapa: Detecção da hibridação (sistema biotina/avidina ou digoxigenina)

- Antes de terminar o último banho pós - hibridação, retirou-se o BSA 5% do *freezer*. Após o último banho, mantiveram-se as lâminas dentro do jarro de Coplin até que o BSA estivesse descongelado. Em seguida, retirou-se a lâmina do jarro, bateu-se cuidadosamente no papel de filtro para escorrer o 4x SSC e, com ela molhada, pingou-se 50 µL de BSA 5% e cobriu-se com lamínula plástica. Deixou-se de 5 a 10 minutos em temperatura ambiente;
- Retirou-se a lamínula cuidadosamente, bateu-se a lâmina em um papel de filtro para escorrer o BSA e colocou-se a solução de detecção, cobriu-se com lamínula plástica e incubou-se a 37°C por 1 hora em câmara úmida;

- Lavou-se as lamínulas em 4x SSC 0,2% *Tween*, por 10 minutos, a temperatura ambiente no agitador, retirou-se a lamínula no primeiro minuto;
- Jogou-se o 4x SSC 0,2% *Tween* na pia e repetiu-se a mesma lavagem;
- Retirou-se as lâminas do 4x SSC 0,2% *Tween*, bateu-se cuidadosamente no papel de filtro para escorrer o 4x SSC e colocou-se 25 µL de meio de montagem, cobriu-se com lamínula de vidro e retirou-se o excesso entre um pedaço de papel de filtro. Observou-se em microscópio de epifluorescência.

Nick Translation

- Retirou-se todos os reagentes do *freezer* e colocá-los no gelo. Colocou-se os microtubos da reação também no gelo. As enzimas degradam se estiverem acima de 16°C; Assim que todos os reagentes descongelaram:
 - Colocou-se 5 µL de dNTP (10x), 1 µg de DNA (sonda) DNAr 28S de anfíbio (*Xenopus laevis*) e H₂O destilada ultra pura, até completar 45 µL de solução;
 - Após adicionar cada reagente, agitou-se levemente até homogeneizar a solução. As enzimas (DNAse e DNA polimerase) foram estocadas em glicerol, e os componentes não se misturam sozinhos na temperatura da reação (16°C). Após agitar, centrifugou-se por 5 segundos (*spin*);
 - Incubou-se a 16°C por 2 horas no termociclador;
 - Ao final, precipitou-se a sonda marcada com acetato de sódio 3M (1:10, v:v) e 2 volumes de etanol 100%, gelado. Para cada 45 µL de solução de reação contendo o DNA, colocou-se 4,5 µL de acetato e 100 µL de etanol;
 - Homogeneizou-se levemente e colocou-se no *freezer* por pelo menos, 2 horas;
 - Centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos, retirou-se o sobrenadante e deixou-se o *pellet* secar;
 - Lavou-se com álcool 70%, centrifugou-se novamente e deixou-se o *pellet* secou-se;
 - Adicionou-se 50 µL de TE e deixou-se na geladeira *overnight*;
 - No dia seguinte estocou-se no *freezer*.

3.12. Análise Cromossômica ao microscópio

A análise das metáfases obtidas a partir de culturas de linfócitos foi realizada ao microscópio de luz, acoplado a um analisador de imagens (AXIOCAM® ICc 3).

Inicialmente, as metáfases foram localizadas utilizando objetivas de 10x ou 20x e a análise foi realizada em objetiva de 100x. As metáfases escolhidas apresentavam cromossomos espalhados sem sobreposição. Os cromossomos foram classificados como metacêntricos, submetacêntricos, acrocêntricos ou microcromossomos, baseando-se em sua morfologia e posição do centrômero (LEVAN et al., 1964).

3.13. Análise estatística

Para explorar a presença de caracteres morfológicos sexualmente dimórficos e de diferenças morfológicas entre os grupos analisados, os valores encontrados para as medidas registradas foram inicialmente submetidos à análise estatística descritiva. Foram então realizadas duas análises: uma para cada grupo, comparando os sexos e uma para cada sexo, comparando os grupos. Utilizou-se o *Test t* para dados paramétricos e *Mann Whitney* para dados não paramétricos. As variáveis foram consideradas paramétricas quando apresentavam normalidade segundo os histogramas do teste de *Shapiro-Wilk* e quando o valor da maior variância dividido pelo menor foi menor ou igual a quatro (ZAR, 1996).

Para as análises de variância foi utilizado o teste ANOVA *one way*, para dados paramétricos, e o teste *Kruskal Wallis*, para dados não paramétricos. No teste ANOVA *one way*, foi realizado o procedimento de *Tukey* para identificar as medidas que, tomadas duas a duas, diferem estatisticamente entre si. O método de *Tukey* protege os testes de um aumento no nível de significância devido ao grande número de comparações efetuadas (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

Para testar a variação interespecífica de tamanho e forma foi utilizada uma matriz de correlação para a análise de componentes principais (ACP) (MORA et al., 2003).

Conforme Cadima e Jolliffe (1996), a separação das variações em componentes principais (CP) está relacionada ao tamanho e a forma. Vários trabalhos sugerem que o

primeiro CP relaciona-se com tamanho, e o segundo com a forma dos organismos estudados.

Foi utilizada a metodologia de análise multivariada para os dados morfológicos por meio das técnicas de ACP e, posteriormente, os valores dos vetores de todos os indivíduos de cada sexo foram utilizados para comparações, por meio do ANOVA *one way*, entre os três grupos avaliados.

Todos os testes estatísticos foram realizados com o programa *Statistica*, versão 8.0 e em todas as análises o nível de significância (p) adotado foi de 5%.

Resultados

4. Resultados

4.1. Análise morfológica de *C. carbonaria*, *C. carbonaria** e *C. denticulata*

Os espécimes de *C. carbonaria* apresentaram as menores médias de peso e CLC, quando comparado com os outros dois grupos. Em *C. carbonaria*, os maiores animais encontrados para cada sexo, foram um macho de 10 kg e CLC = 35,6 cm, e a maior fêmea tinha 8,2 kg e CLC = 35,2 cm. O grupo de *C. carbonaria** apresentou valores médios de peso e CLC próximos ao encontrado para *C. denticulata*, sendo os maiores para cada sexo: um macho de 17 kg e CLC = 48 cm, e uma fêmea de 20 kg e CLC = 50 cm. A espécie *C. denticulata* apresentou os maiores valores médios de peso e CLC, sendo os maiores para cada sexo: um macho de 34 kg e CLC = 61 cm, e uma fêmea de 17,5 kg e CLC = 47 cm.

A análise dos componentes principais (ACP) realizada com todos os indivíduos avaliados (90), de ambos os sexos, permitiu a separação dos mesmos em função dos componentes principais (CP) 1 e 2, indicando a existência de características sexualmente dimórficas (Figura 3). Dessa forma, para as análises posteriores comparamos as espécies sexo a sexo.

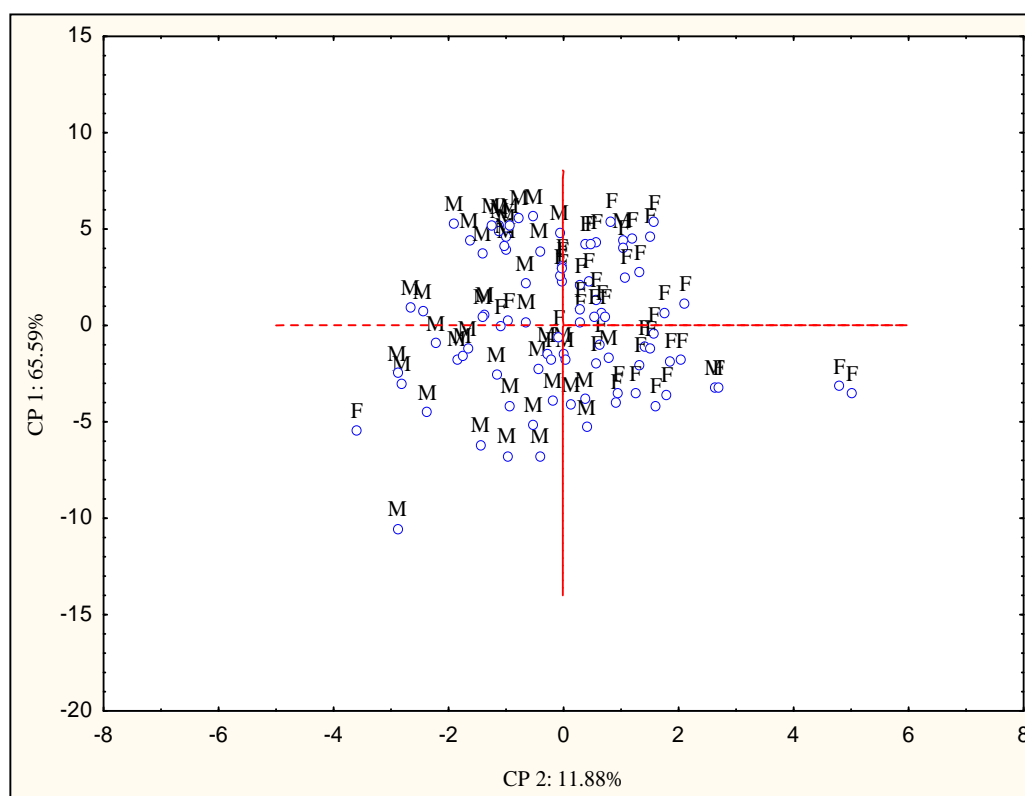


Figura 3. Análise dos componentes principais de todos os indivíduos avaliados (90). *Chelonoidis carbonaria*, *Chelonoidis carbonaria** e *Chelonoidis denticulata* (15 indivíduos/sexo/grupo), M- Machos, F- Fêmeas, CP- Componente principal.

O CP1 da análise realizada com todos os indivíduos, sem separação por sexo, foi composto por características relacionadas ao tamanho e massa, explicando 65,59% do dimorfismo sexual observado. Já o CP2, foi responsável por 11,88% do dimorfismo observado, sendo composto por características relacionadas à forma, principalmente das regiões entre as placas anais e supra caudais, associadas a aspectos reprodutivos.

Após esta primeira avaliação, foi realizada ACP de machos e fêmeas separadamente, no intuito de verificar diferenças morfológicas entre os grupos. A ACP dos machos revelou a presença de dois CP, e estes explicaram 82,11% da variância encontrada nos três grupos, separando-os em função do CP1 e CP2 (Figura 4).

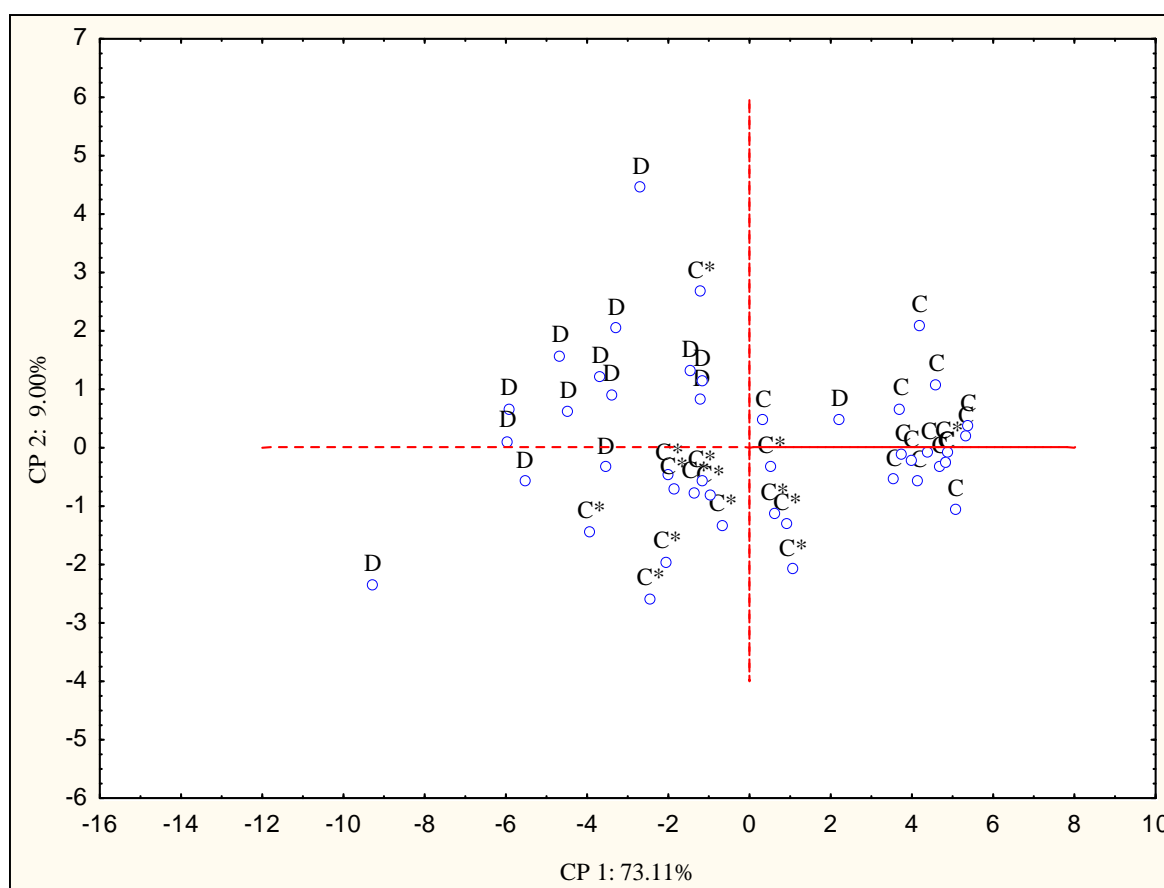


Figura 4. Análise dos componentes principais de todos os machos avaliados (45). C- *Chelonoidis carbonaria*, C*- *Chelonoidis carbonaria**, D- *Chelonoidis denticulata* (15 indivíduos/grupo), CP- Componente principal.

O CP1 explicou 73,11% da variância encontrada e foi composto pelas variáveis CLC, CCC, LLC, LCC, CLP, CCP, LLP, LCP, AC, P, EG, EH, EP, EAB, EF, EAN, CA-

Sc, e PEA (ver Quadro 1). Já o CP2 foi responsável por 9% da variância encontrada entre os grupos, sendo composto pelas variáveis EA-Sc e DEA.

Foi realizado o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do método *a posteriori* de Tukey para os CP1 (F= 54,0691; p= 0,000) e CP 2 (F= 7,5469; p= 0,001) dos machos, havendo diferenças significantes para CP1 entre os três grupos avaliados. Quando analisado o CP2, apenas *C. carbonaria** e *C. denticulata* apresentaram diferenças significantes; porém, *C. carbonaria* apresentou médias próximas às de *C. carbonaria**, conforme demonstrado nas Figuras 5 (A e B) e na Tabela 1.

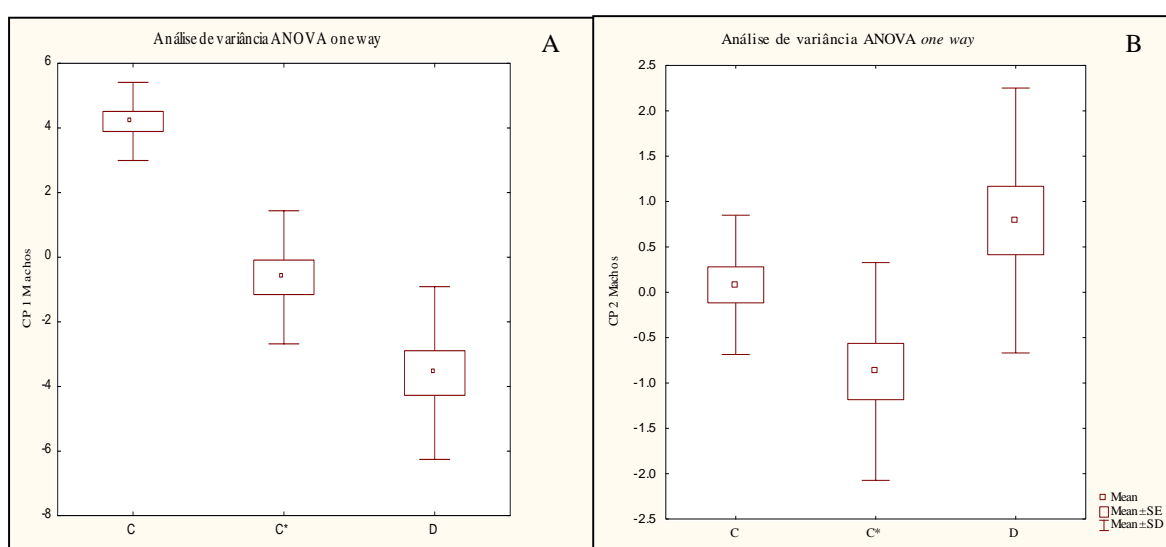


Figura 5. Análise de variância ANOVA *one way* de todos os machos avaliados. A- CP1. B- CP2. CP- Componente principal. C- *Chelonoidis carbonaria*. C*- *Chelonoidis carbonaria**. D- *Chelonoidis denticulata*. (15 indivíduos/grupo).

A ACP das fêmeas revelou a presença de três CP, e estes explicaram 82,95% da variância encontrada nos três grupos. Porém o CP3, por ser responsável por apenas 7,43% da variância, não demonstrou ser um bom marcador morfológico para a diferenciação dos grupos estudados, sendo por isso desconsiderado da análise. Os CP1 e 2 foram responsáveis pela separação das fêmeas dos três grupos, e explicaram 75,52% da variância encontrada (Figura 6).

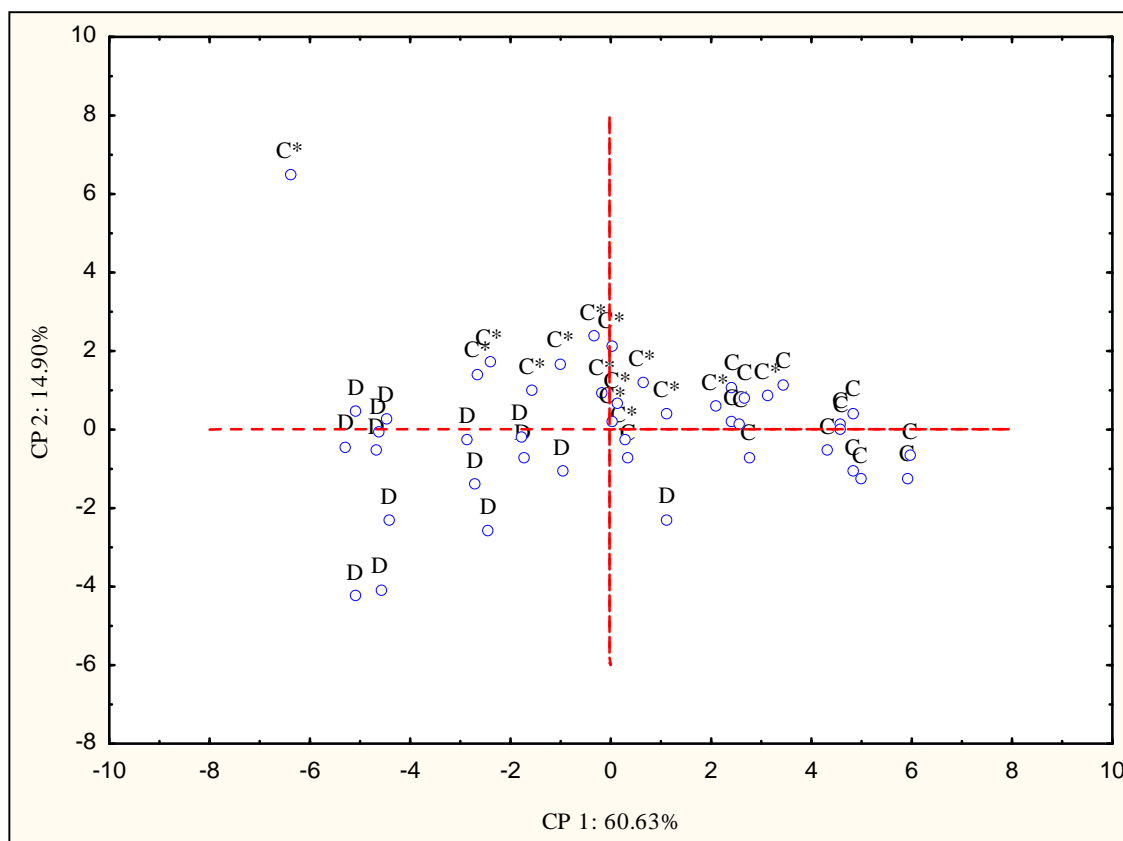


Figura 6. Análise de componentes principais de todas as fêmeas avaliadas (45). C- *Chelonoidis carbonaria*, C*- *Chelonoidis carbonaria**, D- *Chelonoidis denticulata* (15 indivíduos/grupo). CP- Componente principal.

O CP1 explicou 60,62% da variância e foi composto pelas variáveis CLC, CCC, LLC, LCC, CLP, CCP, LLP, LCP, AC, P, EH, EP, EAB. Já o CP2, foi responsável por 14,89% da variância encontrada, sendo composto pelas variáveis: EA-Sc, DEA, e PEA.

O teste estatístico ANOVA *one way* para CP1 ($F= 52,1755$; $p= 0,000$) e CP2 ($F= 15,7131$; $p= 0,000$) realizado nas fêmeas, e seguido do método *a posteriori* de Tukey, revelou diferenças significantes para CP1 entre todos os grupos analisados. Para a análise de variância referente ao CP2, apenas *C. carbonaria* com *C. carbonaria** e *C. denticulata* com *C. carbonaria** apresentaram diferenças significantes, conforme demonstrado na Figura 7 (A e B) e na Tabela 1.

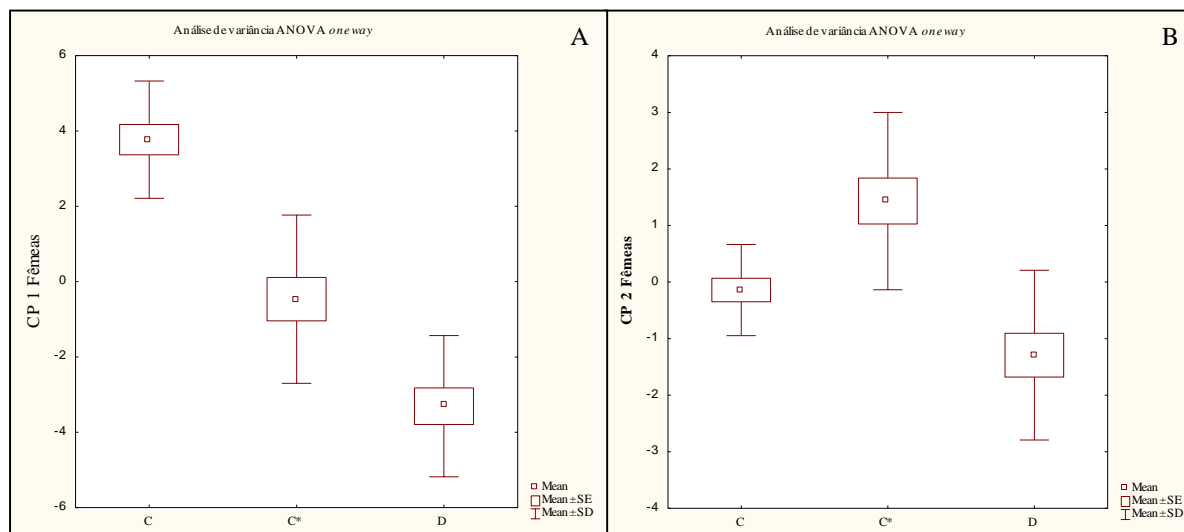


Figura 7. Análise de variância ANOVA *one way* de todas as fêmeas avaliadas. A- Componente principal 1. B- Componente principal 2. CP- Componente principal. C- *Chelonoidis carbonaria* (n=15), C*- *Chelonoidis carbonaria** (n= 15), D- *Chelonoidis denticulata* (n= 15).

A Tabela 1 apresenta as médias dos autovalores encontrados na ACP para os CP1 e 2 dos 45 machos e 45 fêmeas avaliados (15/grupo), e que foram utilizados para a análise de variância referentes as Figuras 6 e 7.

Tabela 1 - Valores utilizados na Análise de Variância (ANOVA) - relativos aos dados obtidos após a ACP para o primeiro e segundo CP dos 45 casais avaliados (15 casais/grupo).

Espécie	Médias dos machos			Médias das fêmeas		
	n	CP 1	CP 2	n	CP 1	CP 2
<i>Chelonoidis carbonaria</i>	15	4.203739	0.081868	15	3.770784	-0.141114
<i>Chelonoidis carbonaria*</i>	15	-0.621032	-0.873445	15	-0.465302	1.432729
<i>Chelonoidis denticulata</i>	15	-3.58271	0.791577	15	-3.030548	-1.29162

As comparações realizadas entre machos e fêmeas nos três grupos avaliados estão compiladas na Tabela 2. Destacam-se aqui as diferenças encontradas no padrão de dimorfismo entre os grupos, onde a espécie *C. carbonaria* apresentou 11 características sexualmente dimórficas, e as fêmeas alcançaram tamanho corpóreo maior que os machos. O grupo *C. carbonaria** apresentou 11 características sexualmente dimórficas, porém, neste grupo os machos apresentaram maior tamanho corporal. A espécie *C. denticulata* apresentou 13 características sexualmente dimórficas, e os machos mostraram-se maiores que as fêmeas em relação ao tamanho corporal.

Tabela 2- Medidas dos indivíduos de *Chelonoideis carbonaria*, *Chelonoideis carbonaria** e *Chelonoideis denticulata*. Para machos e fêmeas, estão representadas, médias, desvio padrão e valor de p (n= 15 casais por grupo).

CM	<i>Chelonoideis carbonaria</i>			<i>Chelonoideis carbonaria</i> *			<i>Chelonoideis denticulata</i>		
	Machos	Fêmeas	p*	Machos	Fêmeas	p*	Machos	Fêmeas	p*
	Média ± DP	Média ± DP		Média ± DP	Média ± DP		Média ± DP	Média ± DP	
CLC	28,20 ± 2,60	29,55 ± 2,90	NS	40,46 ± 4,83	38,16 ± 4,55	NS	47,05 ± 6,05	41,43 ± 3,71	0,002
CCC	39,92 ± 3,79	39,72 ± 4,46	NS	55,97 ± 8,43	51,26 ± 7,34	0,005	4,08 ± 0,13	3,94 ± 0,08	0,001
LLC	17,02 ± 1,75	19,18 ± 1,89	0,003	23,89 ± 3,03	23,98 ± 1,96	NS	3,26 ± 0,15	3,34 ± 0,07	0,045
LCC	34,16 ± 4,03	37,24 ± 6,63	0,002	47,90 ± 5,97	48,44 ± 5,39	NS	51,05 ± 7,14	18,92 ± 4,35	NS
CLP	23,02 ± 2,19	23,12 ± 2,68	NS	31,92 ± 3,59	30,41 ± 3,38	0,025	40,83 ± 5,32	35,69 ± 3,28	0,001
CCP	25,19 ± 2,69	23,70 ± 3,52	NS	35,86 ± 4,36	31,93 ± 3,89	0,007	42,95 ± 5,46	38,70 ± 5,99	0,004
LLP	16,18 ± 1,63	17,96 ± 2,21	0,011	22,26 ± 3,49	21,37 ± 2,00	NS	24,80 ± 3,23	25,20 ± 2,16	NS
LCP	18,42 ± 1,68	19,00 ± 2,34	NS	26,58 ± 4,24	23,12 ± 2,28	0,005	28,96 ± 4,06	27,56 ± 2,55	NS
AC	13,28 ± 1,32	15,00 ± 1,92	0,003	18,12 ± 2,32	18,70 ± 2,64	NS	21,28 ± 2,46	19,99 ± 1,66	NS
P	4,00 ± 1,83	4,78 ± 1,47	0,019	11,57 ± 3,34	10,27 ± 3,60	NS	15,72 ± 6,46	13,54 ± 3,37	NS
EG	3,87 ± 0,54	3,72 ± 0,48	NS	5,32 ± 0,75	4,74 ± 1,03	0,013	5,88 ± 1,09	4,32 ± 0,78	0,001
EH	4,26 ± 0,60	4,18 ± 0,59	NS	5,62 ± 1,13	5,49 ± 0,52	NS	10,54 ± 1,22	8,98 ± 1,08	0,001
EP	1,33 ± 0,31	1,74 ± 0,26	0,001	1,76 ± 0,43	1,83 ± 0,60	NS	2,21 ± 0,55	2,60 ± 0,46	0,022
EAB	8,27 ± 0,96	8,58 ± 0,75	NS	11,10 ± 2,48	11,10 ± 1,15	NS	13,16 ± 1,94	11,96 ± 1,05	0,033
EF	5,25 ± 1,08	5,21 ± 0,85	NS	7,60 ± 0,98	6,54 ± 0,89	0,002	7,21 ± 1,60	5,99 ± 1,82	NS
EAN	1,44 ± 0,55	1,00 ± 0,28	0,001	2,47 ± 0,92	1,22 ± 0,31	0,001	3,60 ± 0,98	2,69 ± 1,59	0,001
CA-SC	3,70 ± 0,88	6,06 ± 0,98	0,001	1,61 ± 0,314	1,85 ± 0,16	0,001	7,42 ± 1,34	7,42 ± 1,04	NS
EA-SC	1,54 ± 0,73	3,05 ± 1,05	0,001	1,48 ± 1,05	2,55 ± 1,00	0,001	2,86 ± 1,22	4,73 ± 1,41	0,001
DEA	7,46 ± 1,01	5,60 ± 0,86	0,001	9,58 ± 1,67	6,66 ± 1,84	0,001	8,23 ± 2,16	5,70 ± 1,94	0,001
PEA	1,67 ± 0,39	2,18 ± 0,58	0,004	1,98 ± 0,74	2,93 ± 0,61	0,001	3,04 ± 1,22	2,15 ± 0,88	0,046

p- Valor de significância; *Utilizou-se o *T*est *t* para dados paramétricos e *Mann Whitney* para dados não paramétricos; n= 15 casais/grupo; NS- Não significante; DP- Desvio padrão; CM- Características morfológicas; Comprimento linear da carapaça (CLC); Comprimento curvilíneo da carapaça (CCC); Largura linear da carapaça (LLC); Largura curvilínea da carapaça (LCC); Comprimento linear do plastrão (CLP); Comprimento curvilíneo do plastrão (CCP); Largura linear do plastrão (LLP); Largura curvilínea do plastrão (LCP); Altura da carapaça (AC); Peso (P); Escudos gulares (EG); Escudos humerais (EH); Escudos abdominais (EAB); Escudos femorais (EF); Escudos anais (EAN); Distância central dos escudos anais ao supra-caudal (CA-SC); Distância da extremidade do escudo anal ao supra-caudal (EA-SC); Distância entre as extremidades dos escudos anais (DEA); Profundidade da abertura dos escudos anais (PEA).

Outro padrão distinto entre os grupos foi a coloração das escamas dérmicas e cor dos olhos. Os padrões de cada grupo estão descritos na Tabela 3 e ilustrados na Figura 8.

Tabela 3. Padrão de coloração da cabeça, escamas das patas e olhos dos animais avaliados.

Espécies	<i>Chelonoidis carbonaria</i>	<i>Chelonoidis denticulata</i>	<i>Chelonoidis carbonaria*</i>
Cor da Cabeça	Vermelho	Amarelo	Laranja
Cor das patas	Vermelho	Amarelo	Laranja
Cor dos olhos	Preto	Preto	Amarelo

*Chelonoidis carbonaria** animais considerados *Chelonoidis carbonaria*, mas que apresentam características diferenciadas dos padrões de tamanho e coloração para espécie.



Figura 8. Padrão de coloração da cabeça, escamas das patas e olhos dos animais avaliados.

Para a análise de variância, comparando cada sexo entre os três grupos avaliados, foram encontradas diferenças significantes para a maioria dos caracteres. Destaca-se aqui o grande número de características morfológicas que apresentam diferenças entre os grupos. A tabela 4 refere-se à análise de variância entre os espécimes e as características morfométricas avaliadas.

Tabela 4. Análise de variância entre todas as características morfológicas avaliadas nos três grupos.

CM	C/C* ♂	C/D ♂	D/C* ♂	p Teste	C/C* ♀	C/D ♀	D/C* ♀	p* Teste
CLC	0.002	0.000	0.090	0.000	0.000	0.000	0.057	0.000
CCC	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
LLC	0.000	0.000	0.457	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCC	0.000	0.000	0.872	0.000	0.000	0.000	0.539	0.000
CLP	0.005	0.000	0.019	0.000	0.001	0.000	0.048	0.000
CCP	0.004	0.000	0.041	0.000	0.001	0.000	0.058	0.000
LLP	0.002	0.000	0.254	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCP	0.000	0.000	0.588	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AC	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.228	0.000
P	0.000	0.000	0.358	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000
EG	0.001	0.000	0.862	0.000	0.003	0.077	0.950	0.003
EH	0.065	0.000	0.001	0.000	0.012	0.000	0.004	0.000
EP	0.037	0.000	0.212	0.008	1.000	0.000	0.001	0.000
EAB	0.008	0.000	0.145	0.000	0.000	0.000	0.480	0.000
EF	0.000	0.001	1.000	0.000	0.004	0.018	1.000	0.002
EAN	0.014	0.000	0.037	0.000	0.512	0.000	0.000	0.000
CA-SC	0.037	0.000	0.010	0.000	0.559	0.002	0.003	0.002
EA-SC	1.000	0.007	0.004	0.001	1.000	0.003	0.000	0.000
DEA	0.000	0.129	0.149	0.000	0.135	0.239	1.000	0.088
PEA	0.519	0.000	0.012	0.000	0.016	0.990	0.011	0.005

C- *Chelonoidis carbonaria*; D- *Chelonoidis denticulata*; C*- animais considerados *Chelonoidis carbonaria*, mas que apresentam características diferenciadas dos padrões típicos da espécie, como tamanho e coloração; p- Valor de significância; p*- Utilizou-se ANOVA *one way* para dados paramétricos e *Kruskal Wallis* para dados não paramétricos; Valores em negrito- não significante; CM- Características morfológicas; Comprimento linear da carapaça (CLC); Comprimento curvilíneo da carapaça (CCC); Largura linear da carapaça (LLC); Largura curvilínea da carapaça (LCC); Comprimento linear do plastrão (CLP); Comprimento curvilíneo do plastrão (CCP); Largura linear do plastrão (LLP); Largura curvilínea do plastrão (LCP); Altura da carapaça (AC); Peso (P); Escudos gulares (EG); Escudos humerais (EH); Escudos peitorais (EP); Escudos abdominais (EAB); Escudos femorais (EF); Escudos anais (EAN); Distância central dos escudos anais ao supra-caudal (CA-Sc); Distância da extremidade do escudo anal ao supra-caudal (EA-Sc); Distância entre as extremidades dos escudos anais (DEA); Profundidade da abertura dos escudos anais (PEA).

O grupo *C. carbonaria** apresentou médias de CLC de 40,46 cm para os machos, e 38,16 cm para as fêmeas. Esses dados diferem das maiores médias de *C. carbonaria* (23,2 cm) e *C. denticulata* (37,8 cm) disponíveis na literatura, apontando *C. carbonaria** como morfológicamente mais próxima à *C. denticulata* que de *C. carbonaria* (Tabela 5). Vale ressaltar que não há dados disponíveis na literatura para *C. carbonaria**, tendo em vista que o presente estudo é o primeiro a sugerir este grupo morfológicamente distinto, como uma morfoespécie de *C. carbonaria*, avaliando os mesmos separadamente e comparativamente com *C. carbonaria* e *C. denticulata*.

A média do CLC encontrada para os indivíduos adultos de *C. carbonaria* do presente estudo, foi de 28,8 cm, sendo o valor de 35,6 cm a maior medida encontrada. Estes valores estão abaixo daqueles encontrados no Estado do Pará por Jerolimski (2005), tanto

para a média do CLC (32,2 cm), quanto para o maior registro (40,8 cm). Destaca-se aqui o fato de que os dados encontrados por este autor são os maiores citados na literatura. Estudos semelhantes foram realizados em outras localidades no Brasil, como no estado de Roraima (MOSKOVITS, 1988) e Tocantins (CLEMENTE-CARVALHO, comunicação pessoal) além de dados provenientes da Colômbia (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981), Guiana Francesa (FRETEY, 1977) e Venezuela (PRITCHARD; TREBBAU, 1984). Para essas localidades, a média do comprimento linear da carapaça de indivíduos adultos variou de 25,2 a 32,2 cm, e os maiores registros variaram de 35,0 a 40,6 cm (Tabela 5).

Tabela 5. Dados referentes ao comprimento linear da carapaça (CLC) de indivíduos adultos de *Chelonoidis carbonaria* em diferentes localidades.

País / Localidade	<i>Chelonoidis carbonaria</i>		CLC	
	Fonte	n	médio	máximo
Brasil/ Diversas	Presente estudo	90	28,8	35,6
Brasil / Aldeia A'Ukre (PA)	Jerozolinski (2005)	130	32,2	40,8
Brasil / Ilha de Maracá (RR)	Moskovits (1988)	138	31,9	40,6
Brasil / Luis Eduardo Magalhães (TO)	Clemente-Carvalho (com. pessoal)	42	27,0	36,6
Brasil / Pantanal de Poconé (MT)	Boulhosa (com. pessoal)	48	30,6	40,1
Colômbia / Diversas	Castañó-Mora e Lugo-Rugeles (1981)	30	29,7	36,6
Guiana Francesa / Diversas	Fretey (1977)	10	26,6	35,0
Venezuela / Diversas	Pritchard e Trebbau (1984)	51	29,5	39,6

Adaptado de Jerozolinski (2005).

As médias registradas para CLC de indivíduos adultos de *C. denticulata* foram de 47,05 cm para os machos e 41,43 cm para as fêmeas. Esses dados são maiores que os descritos na literatura para a espécie para ambos os sexos no Brasil por Moskovits (1988) e Jerozolinski (2005), Colômbia (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981), Guiana Francesa (FRETEY, 1977) e Venezuela (PRITCHARD; TREBBAU, 1984), que variaram de 31,6 a 39,4 cm para machos e de 29,7 a 36,1 cm para fêmeas (Tabela 6).

Tabela 6. Dados referentes ao comprimento linear da carapaça (CLC) de indivíduos adultos de *Chelonoidis denticulata* em diferentes localidades.

País/localidade	Fonte	n	CLC médio	CLC máximo
Brasil/ Diversas	Presente estudo	30	44,2	61,0
Brasil / Aldeia A'Ukre (PA)	Jerozolinski (2005)	213	30,4	39,0
Brasil / Ilha de Maracá (RR)	Moskovits (1988)	27	34,5	40,6
Colômbia / Diversas	Castaño-Mora e Lugo-Rugeles (1981)	30	37,8	44,2
Guiana Francesa / Diversas	Fretey (1977)	11	31,6	34,3
Venezuela / Diversas	Pritchard e Trebbau (1984)	26	31,6	39,4

Adaptado de Jerozolinski (2005).

4.2. Análise citogenética de *C. carbonaria*, *C. carbonaria** e *C. denticulata*

A coloração convencional por Giemsa revelou um número diplóide $2n= 52$ cromossomos, em machos e fêmeas de *C. carbonaria*, *C. carbonaria** e *C. denticulata*. Nas espécies avaliadas os cromossomos foram distribuídos em três grupos (A, B, C), com base no tamanho e na posição dos centrômeros. O grupo A foi composto por 28 cromossomos (3 pares metacêntricos, 1 par acrocêntrico e 10 pares submetacêntricos); o grupo B por 7 pares de cromossomos acrocêntricos e o grupo C por 5 pares de microcromossomos (Figuras 9, 10 e 11 A e B).

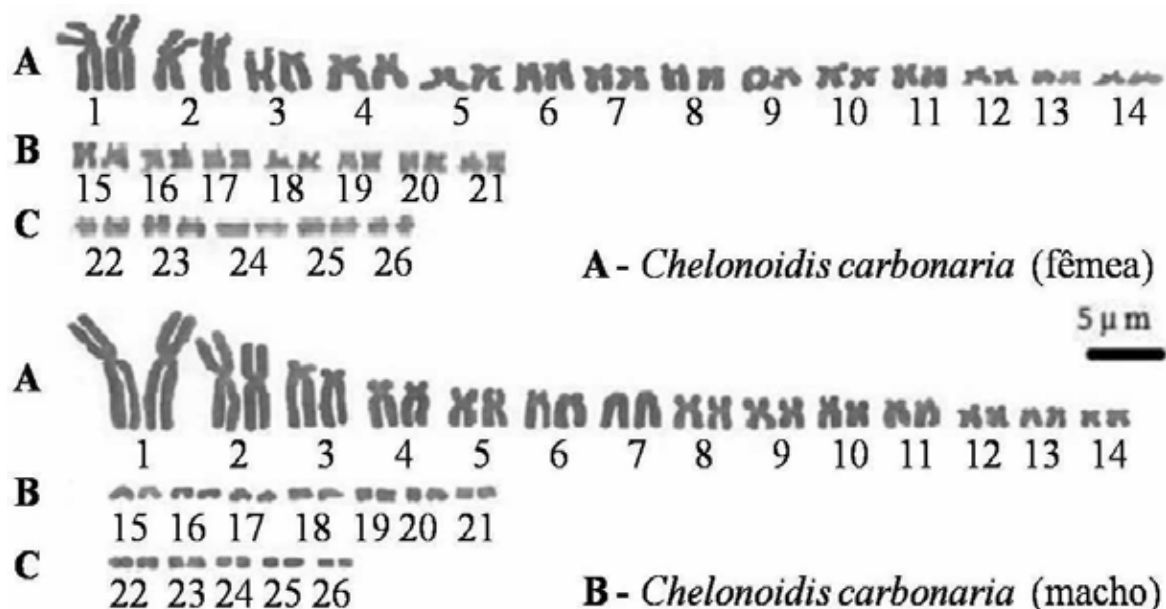


Figura 9. Coloração convencional: Giemsa. *Chelonoidis carbonaria*. A- Cariograma de Fêmea. B - Cariograma de Macho. Barra 5 µm.

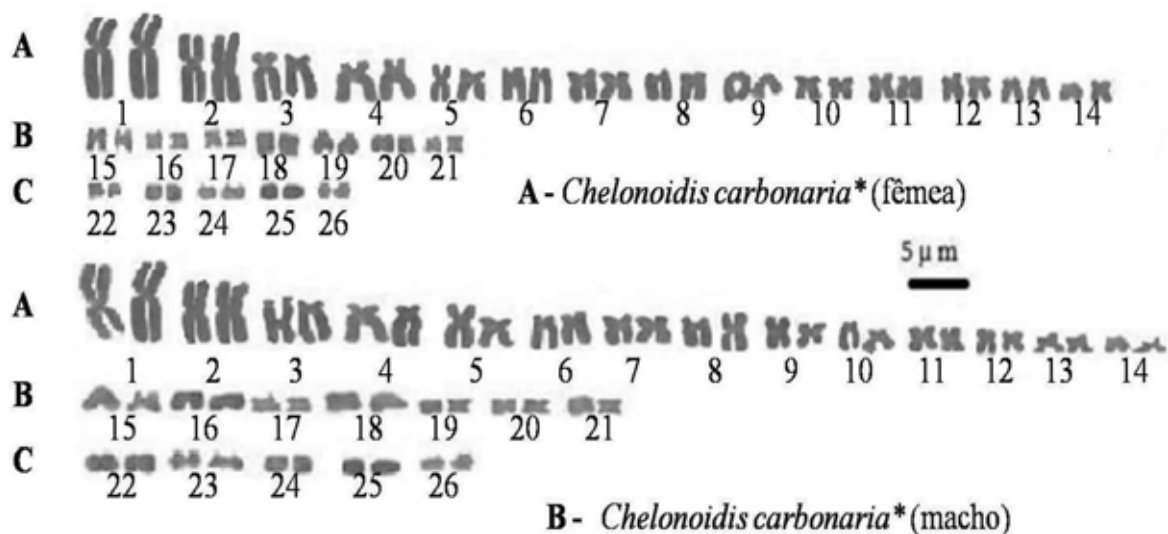


Figura 10. Coloração convencional: Giemsa. *Chelonoidis carbonaria**. **A-** Cariograma de Fêmea. **B -** Cariograma de Macho. Barra 5 µm.

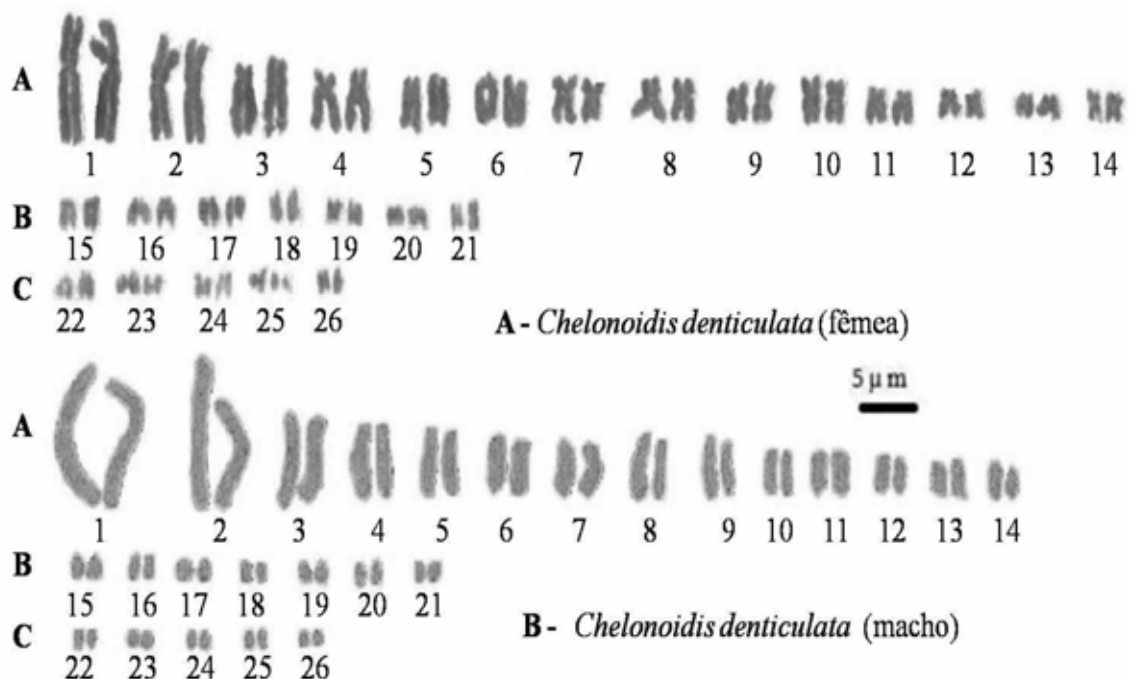


Figura11. Coloração convencional: Giemsa. *Chelonoidis denticulata*. **A-** Cariograma de Fêmea. **B -** Cariograma de Macho. Barra 5 µm.

O bandamento G foi realizado para facilitar o pareamento dos macrocromossomos, e detectar possíveis rearranjos. Esses dados seriam utilizados para comparar o cariótipo dos grupos avaliados, servindo como ferramenta citotaxonômica, porém, não foi observado um padrão constante nas metáfases analisadas (Figuras 12, 13 e 14 A e B).

Na espécie *Chelonoidis carbonaria*, a técnica de bandamento C das fêmeas revelou a presença de heterocromatina constitutiva em dois microcromossomos e na região centromérica de dois macrocromossomos. Nos machos apenas dois microcromossomos apresentaram marcação específica (Figura 12 C e D). Já na espécie *Chelonoidis denticulata* e no grupo *Chelonoidis carbonaria**, não foi observado a presença de blocos heterocromáticos evidentes, indicando que esses encontram-se distribuídos ao longo dos cromossomos, não possibilitando, dessa forma, sua visualização (Figuras 13 e 14 C e D).

Em todos os grupos avaliados, o bandamento das regiões organizadoras nucleolares com íons prata (Ag-NOR) revelou nos machos, marcações no décimo par de macrocromossomos acrocêntricos, evidenciando a região telomérica do braço curto, e nas fêmeas, em apenas um único macrocromossomo acrocêntrico desse mesmo par (Figuras 12, 13 e 14 E e F).

A técnica de hibridação *in situ* foi realizada para verificar o número real de RONS, pois a técnica de impregnação por íons prata tem afinidade por proteínas acídicas associadas às RONS, marcando apenas as regiões ativas da interfase anterior das células analisadas. Os resultados da hibridação *in situ* revelaram duas RONS em machos e fêmeas dos três grupos de jabutis avaliados (Figuras 12, 13 e 14, em destaque)

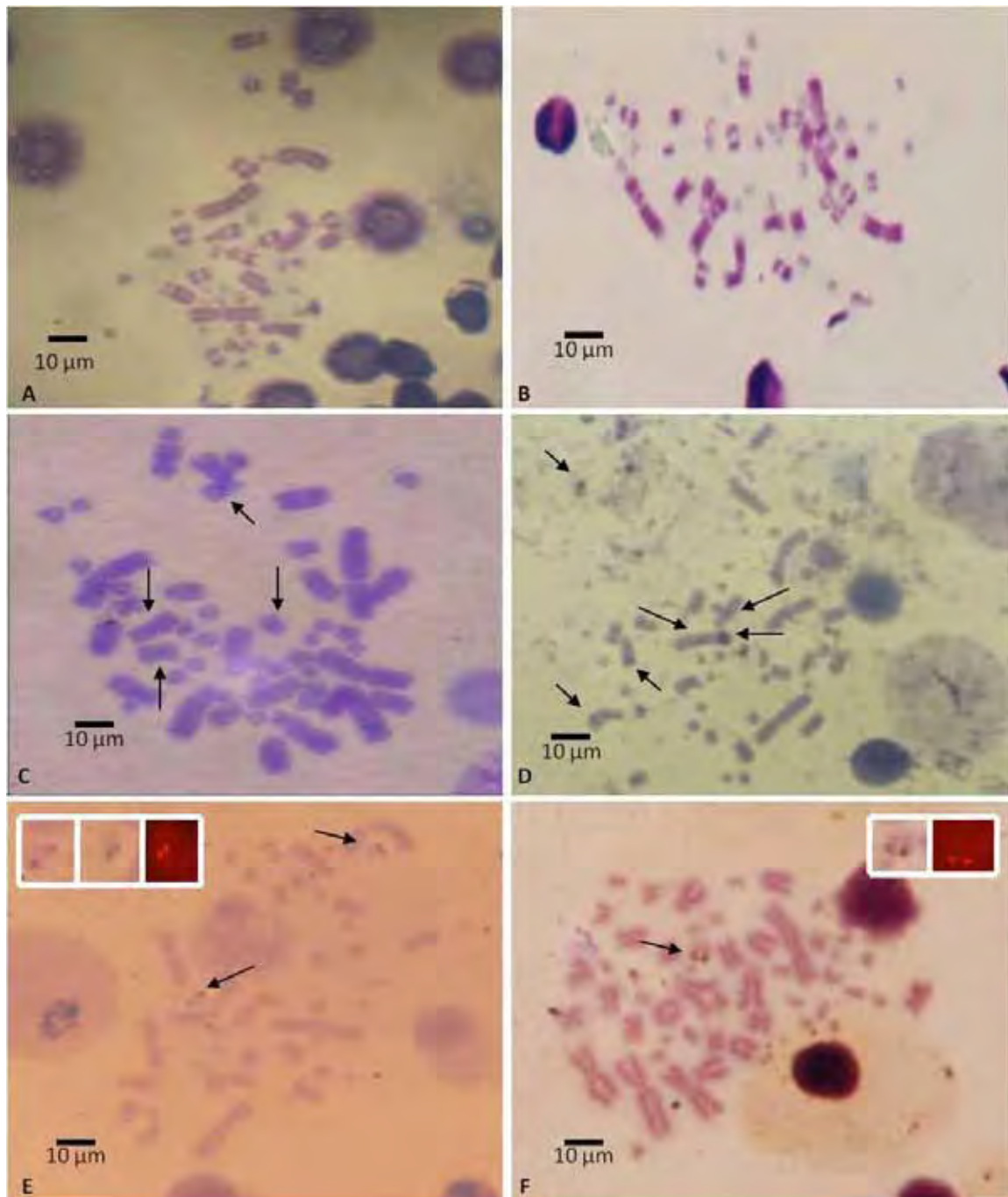


Figura 12. Metáfases de *Chelonoidis carbonaria* submetidas às técnicas de bandamento cromossômico. **A** e **B** - Bandamento G; **C** e **D**- Bandamento C; **E** e **F**- Bandamento Ag-NOR. Fêmeas: **A**, **C** e **E**. Machos: **B**, **D** e **F**. As setas em **E** e **F** indicam as RONS. Nos detalhes estão destacados os cromossomos portadores das regiões organizadoras nucleolares reveladas pela impregnação por íons prata (Ag-NOR) e os núcleos interfásicos com os dois sítios de DNAr 28S revelados pela técnica de hibridação *in situ*. Barra = 10 µm.

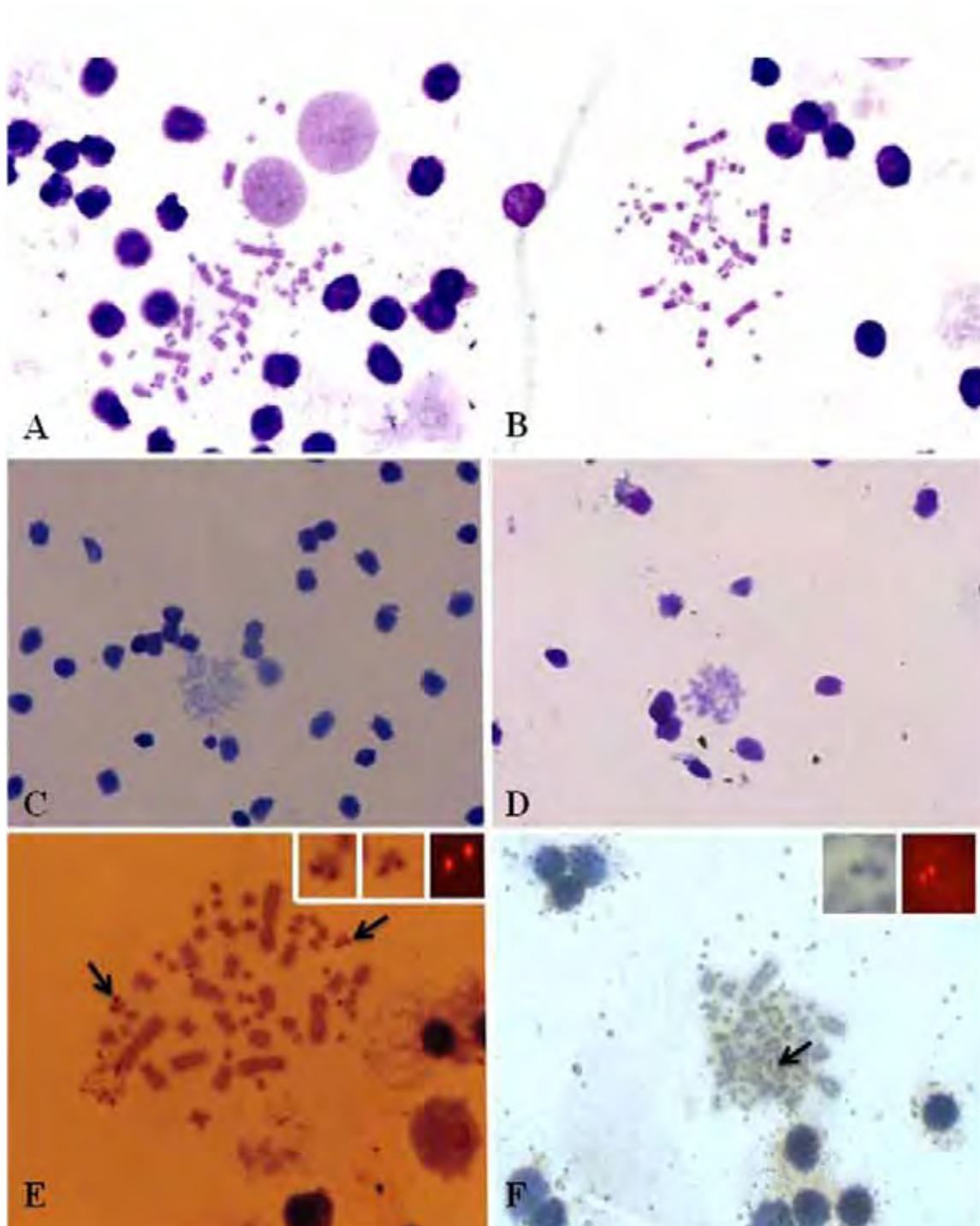


Figura 13. Metáfases de *Chelonoidis carbonaria** submetidas às técnicas de bandamento cromossômico. A e B - Bandamento G; C e D- Bandamento C; E e F- Bandamento Ag-NOR. Fêmeas: A, C e E. Machos: B, D e F. As setas em E e F indicam as RONS. Nos detalhes estão destacados os cromossomos portadores das regiões organizadoras nucleolares reveladas pela impregnação por íons prata (Ag-NOR) e os núcleos interfásicos com os dois sítios de DNAr 28S revelados pela técnica de hibridação *in situ*. Barra = 10 μ m.

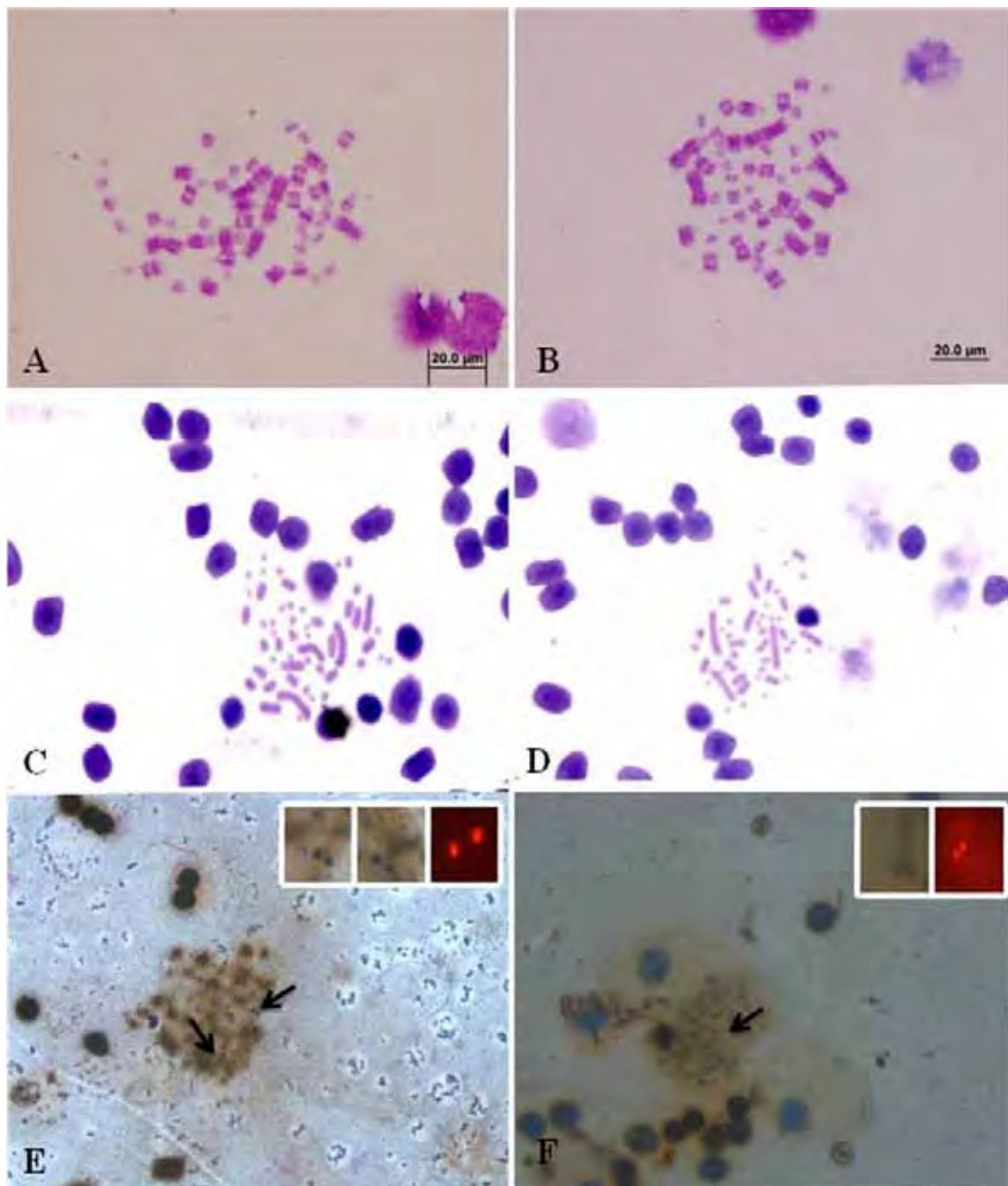


Figura 14. Metáfases de *Chelonoidis denticulata* submetidas às técnicas de bandamento cromossômico. **A e B** - Bandamento G; **C e D**- Bandamento C; **E e F**- Bandamento Ag-NOR. Fêmeas: **A, C e E**. Machos: **B, D e F**. As setas em E e F indicam as RONS. Nos detalhes estão destacados os cromossomos portadores das regiões organizadoras nucleolares reveladas pela impregnação por íons prata (Ag-NOR) e os núcleos interfásicos com os dois sítios de DNAr 28S revelados pela técnica de hibridação *in situ*. Barra = 10 µm.

Discussão

5. Discussão

5.1. Análise morfológica de *C. carbonaria*, *C. carbonaria** e *C. denticulata*.

As características que compuseram os CP1 referiam-se ao tamanho e a massa, já o CP2 foi composto por características relacionadas à forma. Tal padrão na distribuição das características que compõem os CP1 e 2, encontrado no presente estudo, concorda com o sugerido por Cadima e Jolliffe (1996). Esses dados indicam que as principais diferenças entre os grupos se deve ao tamanho e peso (aproximadamente 66%), seguido por diferenças relacionadas a forma (aproximadamente 12%). Vale ressaltar que as características referentes ao CP2, estão relacionadas a aspectos reprodutivos, o que em parte, explica a baixa variação em relação às características do CP1, pois características relacionadas com a reprodução tendem a ser mais conservadas entre grupos evolutivamente próximos.

A ACP referente a todos os machos avaliados, revelou diferenças significantes entre os três grupos em função dos CP1 e 2. O grupo *C. carbonaria**, apesar de ser considerado *C. carbonaria* na literatura, apresentou-se mais próximo a *C. denticulata*, em relação a essa característica. O mesmo pôde ser observado na ACP das fêmeas, embasando a hipótese de que *C. carbonaria**, corresponde a um morfotipo de *C. carbonaria*.

A análise de variância referente ao CP1 revelou diferenças significantes em todos os grupos (machos e fêmeas), tais diferenças foram referentes ao tamanho e à massa nesses grupos. O CP2 dos machos apresentou diferenças apenas entre *C. carbonaria** e *C. denticulata*. Os grupos *C. carbonaria* e *C. carbonaria** apresentaram médias muito próximas para o CP2, talvez em função destes grupos estarem ainda em processo de diferenciação. A avaliação das fêmeas revelou diferenças significantes para o CP2 entre *C. carbonaria* e *C. carbonaria**, e entre *C. carbonaria** e *C. denticulata*. Em relação ao CP2 das fêmeas, este apresentou médias muito diferentes entre *C. carbonaria* e *C. carbonaria**, diferindo do padrão encontrado para os machos. Esse dado pode estar relacionado a diferentes pressões seletivas sobre os caracteres sexualmente dimórficos nas fêmeas, indicando um possível processo de isolamento reprodutivo em função da diferenciação das regiões entre as placas anais e supra-caudal nas fêmeas de *C. carbonaria**.

Os dados encontrados para *C. carbonaria* não apontam diferenças significantes em relação ao CLC de machos e fêmeas; porém, as fêmeas apresentaram peso superior aos machos. Estes dados discordam dos da literatura para o CLC na espécie, que indicam que machos adultos atingem tamanhos superiores ao das fêmeas (LEGLER, 1963; CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; PRITCHARD; TREBBAU 1984; MOSKOVITS, 1988).

Os dados encontrados para *C. carbonaria** não mostraram diferença significativa entre machos e fêmeas para CLC ou peso, porém não há dados na literatura sobre este grupo, tendo em vista que o presente trabalho é o primeiro a sugerir um morfotipo na espécie *C. carbonaria*. Os resultados obtidos para *C. denticulata* concordam com os registros de outras localidades para populações silvestres (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; RODRIGUEZ-BAYONA; RYLANDER, 1984; MOSKOVITS, 1988), indicando que os machos adultos atingem tamanhos superiores aos alcançados por fêmeas.

Diferenças entre os sexos, relacionadas ao formato e ao tamanho da abertura entre os escudos anais e supra-caudal, já foram sugeridas para ambas as espécies (LEGLER, 1963; CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; MOSKOVITS, 1985); entretanto, apenas Jerozolimski (2005) havia quantificado e comparado estatisticamente parâmetros relacionados a essas diferenças. Os maiores valores de CA-Sc nas fêmeas em relação aos machos, sugerido na literatura para *C. denticulata* (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; MOSKOVITS, 1985; JEROZOLIMSKI, 2005) não foram encontrados neste estudo. Os dados encontrados para esta mesma característica em *C. carbonaria* concordam com os dados disponíveis na literatura (LEGLER, 1963; CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; MOSKOVITS, 1985; JEROZOLIMSKI, 2005), indicando maiores valores de CA-Sc nas fêmeas. Em todos os grupos avaliados, as fêmeas apresentaram valores maiores que os machos para EA-Sc, e todos os machos apresentaram maior DEA, concordando com a literatura (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; MOSKOVITS, 1988; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; JEROZOLIMSKI, 2005).

A espécie *C. denticulata* apresentou maior PEA em machos; no entanto, em *C. carbonaria* e *C. carbonaria** as fêmeas apresentaram os maiores valores. Na literatura é sugerido maior valor de PEA nos machos do gênero *Chelonoidis*, porém; no presente

estudo, isso não foi confirmado para *C. carbonaria* e *C. carbonaria** (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; JEROZOLIMSKI, 2005).

Apenas as fêmeas de *C. carbonaria* apresentaram diferença significativa quanto à AC em relação aos machos, o que pode estar relacionado à capacidade reprodutiva, já que carapaças mais altas teriam um maior volume interno para o armazenamento de ovos. Esta relação foi sugerida também para as três espécies europeias de jabutis do gênero *Testudo* (WILLEMSSEN; HAILEY, 2003). A espécie *C. denticulata* e o grupo *C. carbonaria**, não apresentaram esta relação de maior AC nas fêmeas, talvez devido ao fato de alcançarem maior tamanho, o que reduziria, em parte, a necessidade de uma carapaça mais alta em função da reprodução.

Os valores referentes à DEA foram significativamente maiores em machos para todos os grupos avaliados, indicando relação com as diferenças no tamanho da cauda, entre os sexos, pois jabutis machos apresentam cauda mais longa do que as fêmeas (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; ERNST; BARBOUR, 1989), e necessitam de maior espaço lateral entre os escudos anais, para moverem a cauda quando procuram pela cloaca da fêmea durante a cópula. Esses movimentos são possíveis graças ao espaço entre as extremidades posteriores dos escudos anais. Este dado foi confirmado no presente estudo para os três grupos analisados. Bonnet et al. (2001) e Willemsen e Hailey (2003) encontraram padrões semelhantes, em que machos apresentaram valores de DEA maiores do que os das fêmeas para quatro espécies de jabutis do gênero *Testudo* (*T. horsfieldii*, *T. graeca*, *T. marginata* e *T. hermanni*), sugerindo uma relação entre essas características morfológicas.

Todas as fêmeas avaliadas apresentaram maiores EA-SC e CA-SC em relação aos machos. Essa característica está relacionada a aspectos reprodutivos, tendo em vista que uma maior abertura nessa região facilita a passagem dos ovos e a cópula. O formato da abertura posterior entre o plastrão e a carapaça reflete a atuação de pressões seletivas agindo em direções opostas: por um lado, predadores de jabutis podem ter exercido uma pressão de seleção no sentido de limitar o tamanho máximo desta abertura, garantindo, assim, proteção à região caudal; já o formato e o tamanho mínimo desta abertura devem ter sido influenciados por funções reprodutivas, como a passagem dos ovos e cópula (PRITCHARD; TREBBAU, 1984).

Além das diferenças morfológicas acima citadas, foi observado um padrão de coloração das escamas dérmicas da cabeça, patas e cor do olho característico para cada grupo avaliado. Porém, o único dado disponível na literatura citado como característica espécie-específica corresponde à coloração amarela das patas de *C. denticulata*. Para a espécie *C. carbonaria* é citado na literatura uma gama mais ampla de padrões de coloração, talvez relacionada à presença de morfotipos (PRITCHARD; TREBBAU, 1984).

Os dados referentes à análise de variância entre os grupos evidenciaram as diferenças morfológicas entre os grupos avaliados, deixando clara a separação de *C. carbonaria* e *C. carbonaria**. As maiores diferenças se deram entre as espécies *C. carbonaria* e *C. denticulata*, diferindo de alguns dados da literatura, que apontam as espécies como tendo médias de tamanho corpóreo próximas (JEROZOLIMSKI, 2005). O maior número de diferenças não significantes se deram entre o grupo *C. carbonaria** e a espécie *C. denticulata*, indicando que estas são morfologicamente próximas.

Além das diferenças intra-específicas citadas anteriormente, foram detectadas diferenças para cada um dos sexos entre as espécies, relacionadas principalmente ao formato e tamanho da abertura entre os escudos anais e supra-caudal. Machos de cada uma das espécies parecem apresentar estratégias evolutivas diferentes que garantem o sucesso da cópula, permitindo a movimentação da cauda e o depósito de esperma na cloaca das fêmeas (JEROZOLIMSKI, 2005). Em machos de *C. denticulata*, a movimentação da cauda seria predominantemente lateral, já que o espaço entre a extremidade posterior da sutura mediana dos escudos anais e o escudo supra-caudal é menor que o espaço entre as extremidades posteriores dos escudos anais, diferindo de *C. carbonaria*. Essas diferenças podem estar relacionadas ao comportamento de cópula das duas espécies. Castaño-Mora e Lugo-Rugeles (1981) descreveram que, durante a cópula, machos de *C. denticulata* ficam em posição mais vertical do que machos de *C. carbonaria*; deste modo, a cauda de machos de *C. denticulata* provavelmente ficaria mais próxima da região cloacal da fêmea. O fato de que machos de *C. carbonaria* apresentam a cauda proporcionalmente mais longa do que machos de *C. denticulata* pode estar também relacionado a esta diferença (BELL, 1825; CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981).

Foram encontradas diferenças entre os sexos de *C. carbonaria* e *C. carbonaria** em 11 das 20 variáveis registradas, enquanto que em *C. denticulata* foram detectadas

diferenças em 13 variáveis. O dimorfismo sexual mais acentuado nesta espécie sugere que a seleção sexual deve ter sido mais intensa em sua história evolutiva. Este resultado difere daqueles obtidos por Moskovits (1988) e Jerozolimski (2005), que indicaram *C. carbonaria* como a espécie com dimorfismo sexual mais acentuado. Na espécie *C. carbonaria*, as fêmeas são maiores que os machos em nove das 11 características sexualmente dimórficas encontradas, padrão inverso do grupo *C. carbonaria**, em que os machos são maiores que as fêmeas em oito das 11 características sexualmente dimórficas. Esse padrão foi semelhante ao encontrado para *C. denticulata*, em que os machos são maiores que as fêmeas em nove das 13 características sexualmente dimórficas da espécie.

Algumas possíveis explicações em relação às diferenças no padrão de dimorfismo, considerando tanto as características da história de vida, quanto às diferenças ecológicas de cada espécie e de cada um dos sexos, são apresentadas a seguir.

A evolução do dimorfismo sexual está relacionada à atuação de diferentes pressões seletivas, que determinam padrões distintos de tamanho, forma, coloração ou mesmo de características comportamentais, entre machos e fêmeas (ANDERSON; VITT, 1990).

Entre as possíveis causas da presença de dimorfismo sexual no tamanho corpóreo estão: diferenças e limitações de requerimentos ecológicos e fisiológicos entre os sexos; taxas de mortalidade; tamanhos máximos atingidos por machos e fêmeas e maior sucesso reprodutivo em função do tamanho (ANDERSON; VITT, 1990).

A seleção sexual é um dos mecanismos frequentemente citados na evolução do dimorfismo sexual, podendo resultar da competição intra-sexual por parceiros, normalmente na forma de combate entre machos, ou na escolha por parceiros (intersexual) (TRIVERS, 1972). Apesar de combates serem aparentemente raros em populações silvestres, comportamentos agressivos, como os observados entre indivíduos das duas espécies mantidas em cativeiro (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; PRITCHARD; TREBBAU, 1984), podem ter evoluído durante períodos em que as populações destas espécies teriam maiores densidades populacionais, e a competição por fêmeas era maior que a observada atualmente (JEROZOLIMSK, 2005). São abundantes as evidências da ocorrência das duas formas de seleção sexual em quelônios (LOVICH, 1996). Entretanto, outras pressões seletivas como, por exemplo, a seleção natural para

maximização da fecundidade, podem também atuar na evolução de caracteres sexualmente dimórficos (BONNET et al., 2001; WILLEMSSEN; HAILEY, 2003).

Tendo em vista que padrões de dimorfismo entre espécies estão relacionados à atuação de diferentes pressões seletivas, tanto ecológicas como reprodutivas, é de se esperar que indivíduos de uma mesma espécie apresentem padrões de dimorfismo sexual semelhantes; porém, isto não foi observado no presente estudo para *C. carbonaria* e *C. carbonaria**. Esses dados sugerem que *C. carbonaria* e *C. carbonaria** sofreram pressões seletivas diferentes ao longo de sua história evolutiva, provavelmente habitando ambientes diferentes. O grupo *C. carbonaria** apresentou um padrão de dimorfismo semelhante a *C. denticulata*, sugerindo que ambas sofreram pressões seletivas e habitaram ambientes semelhantes ao longo da sua história evolutiva; porém, devido à indisponibilidade de dados referentes à distribuição geográfica de *C. carbonaria**, não foi possível confirmar essa hipótese. Tendo em vista que o grupo *C. carbonaria** é considerado atualmente como *C. carbonaria*, os dados encontrados confirmam a existência de um grupo morfologicamente distinto dentro do gênero *Chelonoidis*.

Os dados encontrados para massa corporal e medidas de carapaça e plastrão, apontam *C. denticulata* como a maior espécie, seguida de *C. carbonaria** e *C. carbonaria*. Estes achados são concordantes com a literatura para o gênero; porém, diferem do proposto por Jerozolimski (2005), que encontrou indivíduos adultos de *C. denticulata* com média de massa corporal e carapaças menores que de *C. carbonaria*. Uma possível explicação é que a área de estudo deste autor corresponde ao território da aldeia *A'Ukre*, onde a população indígena têm a cultura de se alimentar de ambas espécies, o que pode ter influenciado na estrutura etária e no tamanho médio dos espécimes avaliados. Além disso, a população avaliada de *C. carbonaria*, pode corresponder à populações de *C. carbonaria**, o que explicaria as médias próximas entre os grupos avaliados por esse autor e o presente estudo.

Os resultados obtidos no presente estudo para *C. carbonaria*, diferem dos registros de outras localidades para populações silvestres da espécie (LEGLER, 1963; CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; MOSKOVITS, 1988), em que machos atingem tamanho superior ao alcançado por fêmeas. O maior tamanho corpóreo alcançado pelos machos pode ser resultado da ação de outros agentes

seletivos, que não apenas o combate na disputa por fêmeas; mas também, a preferência das mesmas por machos maiores (NIBLICK et al., 1994).

Existem relatos na literatura de populações de *C. carbonaria* com médias de CLC muito próximas de *C. denticulata* (FRETEY, 1977; CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; MOSKOVITS, 1988; JEROZOLIMSKI, 2005), diferindo dos dados encontrados no presente estudo, no qual essa diferença foi bastante acentuada. Os indivíduos de *C. carbonaria* avaliados apresentaram média de CLC de 28,20 cm para os machos e 29,55 cm para as fêmeas; enquanto que *C. denticulata* apresentou médias de 47,05 cm para os machos e 41,43 cm para as fêmeas. Tais dados sugerem que algumas das populações de *C. carbonaria*, citadas na literatura como próximas a *C. denticulata* em relação a tamanho, correspondam na realidade populações de *C. carbonaria**

Em populações de *Chrysemys scripta* e de *Testudo hermanni*, há relatos de variações no comprimento da carapaça e na massa corporal de até três vezes, em função de características relacionadas ao ambiente, tais como temperatura, disponibilidade de alimento e taxas de mortalidade. Entretanto, é difícil avaliar a influência desses eventos na estrutura etária de populações adultas de *C. carbonaria* e *C. denticulata*, tendo em vista a forte influência antropogênica na estrutura etária dessas populações, dada por meio da predação desses animais para consumo, principalmente por populações indígenas (GIBBONS et al., 1979; WILLEMSSEN; HAILEY, 2001; JEROZOLIMSKI, 2005).

Indivíduos de *C. carbonaria*, especialmente grandes, provavelmente não representativos do tamanho dos indivíduos adultos de suas respectivas populações, já foram relatados na literatura (WILLEMSSEN; HAILEY, 1999). Os indígenas da tribo Kayapó eventualmente encontram jabutis excepcionalmente grandes, chamados na língua local de *kapran-ti*, o que significa literalmente jabuti-grande (WILLEMSSEN; HAILEY, 1999; JEROZOLIMSKI, 2005).

Embora tenha ocorrido a escolha por indivíduos maiores que 25 cm de CLC para o estudo, poucos espécimes encontrados no local da coleta apresentavam medidas abaixo desta. Stickel (1950) encontrou dados semelhantes em populações naturais de *Terrapene c. carolina* em uma região de florestas no Vale do Rio Patuxent (Maryland, EUA), onde indivíduos jovens representavam menos de 10% dos indivíduos amostrados, proporção

semelhante à registrada por Jerozolimski (2005), para *C. carbonaria* e *C. denticulata* no território da aldeia *A'Ukre*. Tendo em vista que os animais utilizados no presente estudo são, em sua maioria, provenientes de populações naturais, os dados encontrados refletem os dados sugeridos na literatura. Estes dados se devem, provavelmente, ao fato de que animais de tamanho reduzido se abrigam sob a serapilheira e emaranhados de cipós com mais facilidade que os indivíduos adultos, levando a uma amostragem tendenciosa. Outros fatores que podem estar atuando nesse padrão são a baixa taxa de natalidade e/ou elevada mortalidade, principalmente em áreas onde ocorre consumo de carne desses animais (JEROZOLIMSKI, 2005). O impacto da caça influencia diretamente na redução do tamanho corpóreo médio de populações que apresentam alta longevidade, fato esse associado à maior remoção de indivíduos adultos da população (LAMBERT, 1984; HART, 2000; LUISELLI, 2003). Nascimento (1997) registrou para a comunidade da aldeia *A'Ukre*, que o tamanho dos jabutis em regiões próximas à áreas foi significativamente menor (média de 2,8 kg) do que o dos capturados em áreas distantes (média de 5,0 kg), sugerindo a influencia direta da caça no tamanho corpóreo de populações de jabutis.

Diversos trabalhos sugerem a existência de híbridos entre *C. carbonaria* e *C. denticulata*. Porém, no caso de grandes grupos distintos do padrão de *C. carbonaria*, como observado em *C. carbonaria**, inferimos que a existência destes se deve a variações em nível de populações e não a eventos de hibridação. Esses grupos podem até mesmo corresponder a uma nova espécie. Vargas-Ramírez e colaboradores (2010) também relataram a existência de populações de *C. carbonaria* morfologicamente divergentes, apresentando-se mais próximas a *C. denticulata* em morfologia e coloração, tais dados reforçam a hipótese proposta pelo presente estudo.

Ives e colaboradores (2008), estudando a espécie asiática *Indotestudo forstenii*, sugeriram que as diferenças de caracteres morfológicos em populações de quelônios, podem ser resultado de linhagens evolutivas distintas. Entretanto, não encontraram correlação com divergência genética, dificultando a interpretação desses dados, pois não se sabe ao certo até onde variações dentro de uma determinada espécie corresponde a variações regionais, ou a um grupo já diferenciado.

Em vista das diferenças morfológicas significativas encontradas no presente estudo, assumimos a existência de morfotipos de *C. carbonaria*, que podem representar populações

ou espécies já diferenciadas, ou em processo avançado de diferenciação. Estas diferenças morfológicas encontradas reforçam a hipótese proposta pelo presente trabalho de que não se pode considerar *C. carbonaria** como *C. carbonaria*. Nossos dados reforçam a urgência em se estudar este morfotipo encontrado, principalmente quanto a sua distribuição geográfica e *status* de conservação, caso seja confirmado que o mesmo representa uma nova espécie de jabuti brasileira.

Esses dados obtidos são de grande utilidade para fins taxonômicos e de conservação, tendo em vista que apesar de *C. carbonaria* não estar inclusa na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (IUCN, 2008) esta afirmação parte da premissa que não há subdivisões genéticas ou morfotipos na espécie. Porém, não se sabe ao certo o *status* de conservação e distribuição geográfica do morfotipo encontrado, tendo em vista que existem diferenças regionais em relação ao *status* de conservação de *C. carbonaria*. Na Colômbia, por exemplo, a espécie é listada como criticamente ameaçada (CASTAÑO-MOURA, 2002).

As características morfológicas foram avaliadas com o objetivo de caracterizar as diferenças entre as espécies avaliadas, além de verificar quais são as características sexualmente dimórficas entre os grupos avaliados. Os resultados contribuíram para o conhecimento da biologia dos quelônios terrestres brasileiros, fornecendo dados para futuros estudos genéticos e taxonômicos, contribuindo dessa forma, com a preservação desse importante e pouco estudado grupo de vertebrados.

5.2. Análise citogenética de *C. carbonaria*, *C. carbonaria e *C. denticulata***

O número diplóide de cromossomos $2n= 52$ foi observado em outros membros da família Testudinidae, como em *C. donosobarrosi*, *C. chilensis*, *C. elephantopus* e *C. gigantea*, em membros da família Pelomedusidae e em membros do gênero *Sacalia* e *Mauremys*, família Bataguridae (BENIRSCHKE et al., 1976; BICKHAM, 1971; BICKHAM; BAKER, 1975; FORBES, 1966; GOLDESTEIN; LIN, 1982; SAMPAIO et al., 1971). Esses dados refletem o carácter conservado do cariótipo da família Testudines.

O gênero *Chelonoidis* é um dos poucos gêneros de quelônios em que se sugerem variação cromossômica intragenérica. Sampaio e colaboradores (1971) reportaram

diferenças na posição do centrômero do cromossomo 12 de *C. carbonaria* e *C. denticulata*, que é um dos menores macrocromossomos, na primeira espécie esse cromossomo apresentou-se metacêntrico e, na segunda, acrocêntrico. Entretanto, Bickham e Baker (1976), reavaliaram o cariótipo de *C. carbonaria* e *C. denticulata*, e observaram que não havia diferenças na morfologia cromossômica entre essas espécies. Nossos dados concordam com o observado por Bickham e Baker (1976), pois nenhuma diferença cromossômica foi observada entre os grupos avaliados. Esse conflito entre os autores reflete as dificuldades metodológicas encontradas nas análises citogenéticas em quelônios, devido ao grande número de microcromossomos e ao fato de ser extremamente difícil obter metáfases com um mesmo grau de condensação dos cromossomos e sem sobreposições.

O cariótipo dos grupos avaliados assemelha-se em número e morfologia com o cariótipo do gênero *Sacalia* e *Mauremys* (Bataguridae), que compreende uma família sugerida na literatura como basal em relação aos Testudinidae. Como o cariótipo primitivo dos Batagurídeos parece ser restrito ao Velho Mundo, a extrema similaridade com o cariótipo dos *Chelonoidis* brasileiros sugere que os mesmos possuem linhagens comuns no Velho Mundo (BICKHAM; BAKER, 1975).

Nossos dados confirmam que algumas espécies da família Testudinidae, apresentam um número relativamente menor de microcromossomos, em relação à família Trionychidae (MATSUDA et al. 2005; NOLETO et al. 2006; ROHILLA et al. 2006). Os mecanismos envolvidos na alteração numérica dos microcromossomos ao longo da evolução dos Testudines podem ser a perda numérica, translocação de microcromossomos para cromossomos acrocêntricos e formação de cromossomos metacêntricos (BICKHAM, 1975).

A técnica de bandamento G foi utilizada no pareamento dos cromossomos de algumas espécies, como *Hydromedusa tectifera*, *Chelonia mydas*, *Podocnemis vogli* e *Platemys platycephala*. Em todas essas espécies avaliadas, a técnica não mostrou sensibilidade e reprodutibilidade suficientes para permitir a diferenciação entre grupos próximos, com base no padrão de bandamento, não sendo, portanto, um bom marcador citotaxonomico para quelônios (BICKHAM et al., 1980; HAIDUK, BICKHAM, 1982; MORITZ, 1984; NOLETO et al., 2006; ORTIZ et al., 2005). As dificuldades técnicas podem se dar devido ao tipo de cultura, em que nem sempre é possível obter metáfases sem

citoplasma sobreposto, o que dificulta a ação da tripsina, responsável pela degradação do cromossomo e formação das bandas G. Dessa forma, devido a pouca reprodutibilidade da técnica e a inconstância dos padrões de bandamento encontrados, não foi possível utilizá-la como caracter taxonômico para as espécies estudadas.

A heterocromatina, evidenciada pela técnica de bandeamento C, constitui parte importante do genoma de eucariotos, por possuir funções como segregação cromossômica, organização nuclear e regulação da expressão gênica (GREWAL; JIA, 2007). O padrão de distribuição da heterocromatina encontrado em *Chelonoidis carbonaria** e *C. denticulata*, com ausência de blocos heterocromáticos evidentes ou difusos, já foi observado em outros grupos de vertebrados, como em peixes da família Pimelodidae, e para a maioria dos Siluriformes (LEGRANDE, 1981; FENOCCHIO; BERTOLLO, 1992; SWARÇA et al., 2001; TRECO et al., 2008). Essa característica peculiar da cromatina, compartilhada por *Chelonoidis carbonaria** e *C. denticulata* é resultante de mecanismos epigenéticos como remodelamento da cromatina e metilação do DNA, que auxiliam na compactação e organização do genoma em domínios cromáticos. Diversas atividades gênicas são dependentes do estado de condensação da cromatina, que pode mudar em resposta a sinais celulares e atividade gênica, respondendo inclusive a mudanças ambientais (GREWAL; JIA, 2007). Tais fenômenos podem explicar as variações na quantidade e na distribuição da heterocromatina constitutiva. Essas alterações são consideradas importantes na evolução de alguns grupos de vertebrados, permitindo a diferenciação de espécies e populações, além de serem ferramentas úteis para estudos de relações filogenéticas (ANDREATA et al., 2006; TRECO et al., 2008).

Esse dado difere *Chelonoidis carbonaria** e *C. denticulata* de *Chelonoidis carbonaria*, que apresenta blocos heterocromáticos evidentes. Porém, análises citogenéticas mais sensíveis devem ser empregadas para verificar possíveis variações, já que a citogenética convencional foi pouco elucidativa. Em machos de *C. carbonaria*, o bandamento C revelou uma marcação na região centromérica do par cromossômico 1 e 2, e em dois pares de microcromossomos, como observado em *Pelodiscus sinensis* (BICKHAM; BAKER, 1975). Variações heterocromáticas intragenéricas são raramente descritas na literatura em quelônios.

Não foi observada a presença de cromossomos sexuais nos grupos do presente estudo, porém em algumas espécies de quelônios, como *Chelodina longicollis*, a presença de uma banda larga de heterocromatina constitutiva em um dos pares de microcromossomos, revelou os cromossomos sexuais, confirmado posteriormente por citogenética molecular (EZAZ et al., 2006; YAMADA et al., 2005).

No gênero *Chelonoidis*, as RONS estão localizadas na região telomérica de um pequeno par cromossômico metacêntrico, e não há constrições secundárias visíveis, enquanto em *Gopherus*, as mesmas estão localizadas na região intersticial de um braço longo de um cromossomo médio subtelocêntrico, que possui constrição secundária visível (MARTINEZ et al., 2009). Esses resultados indicam que apesar de não existir diferenças cromossômicas numéricas na família Testudinidae, a estrutura dos cromossomos pode diferir em relação à morfologia e localização das RONS. Essa baixa taxa de variação encontrada se deve ao fato de que os quelônios apresentam um cariótipo altamente conservado.

O método para obtenção de cromossomos mitóticos, padronizado no presente estudo, mostrou-se eficaz, resultando em suspensões com um bom índice metafásico e cromossomos pouco condensados, facilitando as análises citogenéticas. De forma geral, a obtenção de cromossomos metafásicos em quelônios não é tida como fácil, pois além das dificuldades em se obter bons índices mitóticos, a presença de um grande número de microcromossomos dificulta o pareamento dos pares homólogos e o reconhecimento de padrões de bandamento cromossômico.

Conclusões

6. Conclusões

- A caracterização morfológica realizada neste estudo permitiu a diferenciação morfológica entre os grupos avaliados, podendo ser utilizada como ferramenta na avaliação de unidades taxonômicas regionais em jabutis brasileiros;
- Na espécie *Chelonoidis carbonaria*, as fêmeas alcançam maior tamanho, enquanto que em *C. carbonaria** e *C. denticulata*, os machos são maiores que as fêmeas. O grupo *C. carbonaria** demonstrou-se mais próximo morfológicamente de *C. denticulata* que de *C. carbonaria*;
- Apesar da imprecisão em relação à localidade de origem dos animais avaliados, há forte evidência de que *C. carbonaria* e *C. carbonaria** são grupos morfológicamente distintos;
- O bandamento C revelou diferenças entre os grupos *C. denticulata* e *C. carbonaria** de *C. carbonaria*, em relação à presença de blocos heterocromáticos, presentes apenas em *C. carbonaria*. Entretanto, as demais técnicas de citogenética clássica (coloração por Giemsa, bandamento G e impregnação por íons prata) e molecular (hibridação *in situ* com sondas de DNAr 28S) não revelaram diferenças na estrutura cromossômica entre os grupos avaliados;
- Com base nos dados morfológicos avaliados, é possível sugerir que o morfotipo *C. carbonaria** corresponda a uma nova espécie de jabuti. Entretanto, se faz necessário uma avaliação morfológica, genética e geográfica mais abrangente no Brasil, com o objetivo de avaliar o *status* de conservação e a áreas de ocorrência deste morfotipo.

Referências

7. Referências

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 1998. Cytogenetic markers in Neotropical freshwater fishes. *In: MALABARBA, L.R., REIS, R.E., VARI, R.P., LUCENA, R.P., LUCENA, Z.M.S., LUCENA, C.A.S. Phylogeny and classification of neotropical fishes.* Editora da Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, Brasil, p.583-588, 1998.

ALLENDORF, F.W., LEARY, R.F., SPRUELL, P., WENBURG, J.K. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends in Ecology and Evolution**, v.16, p.613-622, 2001.

ANDERSON, R.A., VITT, L. J. Sexual selection versus alternative causes of sexual dimorphism in teiid lizards. **Oecologia**, v.84, p.145-157, 1990.

ANDREATA, A.A., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. Karyological characterization of four Neotropical fish species of the genus *Hisonotus* (Teleostei, Loricariidae, Hypoptopomatinae) from distinct Brazilian river basins. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.62-66, 2006.

AUFFENBERG, W. Checklist of fossil land tortoises (Testudinidae). Bulletin of the Florida State Museum. **Biological Sciences**, v.18, p.22-251, 1974.

AUFFENBERG, W. Sex and species discrimination in two sympatric South American tortoises. **Copeia**, v.3, p.335-342, 1965.

BALLARD, J.W.O., WITLOCK, M.C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v.13, p.729-744, 2004.

BELL, T. **A Monograph of the Testudinata**, London, 1825.

BENIRSCHKE, R.J., QUINN, A.D, SEKULOVICH, R.E. Chromosomal studies in *Geochelone* (Testudinidae–Reptilia). **Chromosome**, v.12, p.14-16, 1976.

BICKHAM, J.W. A cytosystematic study of turtles in the genera *Clemmys*, *Mauremys* and *Sacalia*. **Herpetologica**, v.31, p.198-204, 1975.

BICKHAM, J.W., BAKER, R.J. Karyotypes of some neotropical turtles. **Copeia**, v.4, p.1-6, 1976.

BICKHAM, J.W., BJORNDAL, K.A., HAIDUK, M.W., RAINEY, W.E. The karyotype and chromosomal banding patterns of the green turtle (*Chelonia mydas*). **Copeia**, v.3, p.540-543, 1980.

BONNET, X.F., LAGARDE, B.T., HENEN, J., CORBIN, K.A., NAGY, G., NAULLEAU, K., BALHOUL, O., BUONGIORNO-NARDELLI, M., AMALDI, F. Autoradiographic detection of molecular hybrids between rRNA and DNA in tissue sections. **Nature**, v.225, p.946-947, 2001.

BRITES, V.L.C. **Hematologia, bioquímica do sangue, parasitologia, microbiologia, algas epizoárias e histopatologia de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudinata, Chelidae), expostos a diferentes influências antrópicas no rio Uberabinha, Minas Gerais.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, p.196, 2002.

BULL, J.J., LEGLER, J.M. Karyotypes of side-necked turtles (Testudines: Pleurodira). **Canadian Journal of Zoology**, v.58, p.828-841, 1980.

CADIMA, J., JOLLIFFE, I.T. Size and shape-related principal component analysis. **Biometrics**, v.52, p.710-716, 1996.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações.** Porto Alegre: Artmed, 2003.

CASTAÑO-MORA, O.V. **Libro rojo de reptiles de Colombia.** Instituto de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Conservación Internacional - Colombia, Bogotá, 2002.

CASTAÑO-MORA, O.V., LUGO-RUGELES, M. Estudio comparativo del comportamiento dos especies de morrocoy: *Geochelone carbonaria* y *Geochelone denticulata*, aspectos comparables de su morfología externa. **Cespedesia**, v.10, p.55-122, 1981.

CONGDON, J.D., DUNHAM, A.E., VAN LOBEN SEALS, R.C. Delayed sexual maturity and demographics of Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*): implications for conservation and management of long-lived organisms. **Conservation Biology**, v.7, p.826-833, 1993.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, v.31, p.117-120, 2000.

ERNEST, C.H., BARBOUR, R.W. **Turtles of the World**. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press, p.29-30, 182-183, 209-210, 1989.

EZAZ, T., VALENZUELA, N., MIURA, I., GEORGES, A., BURKE, R.L., GRAVES, J.A.M. An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: Chelidae) with genetic sex determination. **Chromosome Research**, v.14, p.139-150, 2006.

FARIAS, I.P., JEROZOLIMSKI, A., MELO, A., VIANAL, M.N., MARTINS, M., MONJÉLO, L.A.S. Population genetics of the Amazonian tortoises, *Chelonoidis denticulata* and *C. carbonaria* (Cryptodira: Testudinidae) in an area of sympatry. **Amphibia-Reptilia**, v.28, p.357-365, 2007.

FEITOSA, L.L. **Alismatales sensu stricto: Análise citogenética com técnica convencional, bandamento e sítio de DNAr 45S**, Tese apresentada a Universidade Federal de Pernambuco - Brasil, p.24-34, 2008.

FENOCCHIO, A.S., BERTOLLO, L.A.C. Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. **Cytobios**, v.69, p.41-46, 1992.

FORBES, W.C Jr. A cytological study of the Chelonia. Unpublished PhD Dissertation, University Connecticut, Storrs, 1996.

FREITAS, R.A., ARAÚJO, V.C., ARAÚJO, N.S. Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR) in adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma of the salivary glands. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v.250, p.213-217, 1993.

FRETEY, J. **Les chéloniens de Guyane française**. 1. Etude préliminaire. Univ. Paris, 1977.

GAFFNEY, E.S., MEYLAN, P.A. A phylogeny of turtles, in MJ Benton (ed.), **The Phylogeny and Classification of the Tetrapods**, v.1, p.157-219, 1998.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K., PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. 1. Ed. São Paulo: Livraria Varela Ltda, p.69-71, 123-132, 1994.

GIBBONS, J.W. Why do turtles live so long? **BioScience**, v.37, p.262-269, 1987.

GIBBONS, J.W., KEATON, G.H., SCHUBAUER, J.P., GREENE, J.L., BENNETT, D.H., MCAILIFFE, J.R., SHARITZ, R.R. Unusual population size structure in freshwater turtles on barrier islands. **Georgia Journal of Science**, v.37, p.155-159, 1979.

GOLDSTEIN, S., LIN, C.C. Somatic cell hybrids between cultured fibroblast from the Galapagos tortoise and the golden hamster. **Exp Cell Res**, v.73, p.266-269, 1972.

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

GREWAL, S.I.S., JIA S. Heterochromatin revised. **Nature Review**, v.8, p.35-46, 2007.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro-RJ, p.142, 1988.

GUERRA, M. **FISH: conceitos e aplicações na Citogenética**. Sociedade Brasileira de Genética, v.1, p.184, 2004.

HADUK, M.W., BICKHAM, J.W. Chromosomal homologies and evolution of testudinoid turtles with emphasis on the systematic placement of *Platysternon*. **Copeia**, v.1, p.60-66, 1982.

HART, J.A. Impact and Sustainability of Indigenous Hunting in the Ituri Forest, Congo-Zaire: A Comparison of Unhunted and Hunted Duiker Populations. p.106-153 in ROBINSON, J.G., BENNETT, E.L, editors. **Hunting for Sustainability in Tropical Forests**. Columbia University Press, New York, 2000.

HIGHFIELD, A.C. **Encyclopedia of Keeping and Breeding Tortoises and Freshwater Turtles**. London ,Carapace Press, v.1, p.173-184, 1996.

HOWELL, W.M. Visualization of ribosomal gene activity: Silver stains proteins with RNA-r transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**, v.62, p.361-367, 1982.

HOWELL, W.M., BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal develop: step method. **Experimentia**, v.36, p.104-105, 1980.

IUCN, International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (2008) **IUCN red list of threatened species**. <http://www.iucnredlist.org>. Ultimo acesso em 18 de janeiro de 2011.

IUCN. **Red List of Threatened Species**. www.iucnredlist.org. IUCN. Red List of Threatened Species. <<http://www.iucnredlist.org>>, 2004.

IVES, I., SPINKS, P.Q, SHAFFER, H.B. Morphological and genetic variation in the endangered Sulawesi tortoise *Indotestudo forstenii*: evidence of distinct lineages?. **Conservation Genetics**, v.9, p.709-713, 2008.

JACKSON, D.C., RAUER, E.M., FELDMAN, R.A., REESE, S.A. Avenues of extrapulmonary oxygen uptake in western Painted Turtles (*Chrysemys picta bellii*) at 10uC. **Comparative Biochemistry and Physiology** , v.139, p.221-227, 2004.

JEROZOLIMSKI, A. **Ecologia de populações silvestres dos jabutis *Geochelone denticulata* e *G. carbonaria* (Cryptodira: Testudinidae) no território da aldeia A`Ukre sul do Pará**. Instituto de Biociências Departamento de Ecologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2005.

LAMBERT, M. R. K. Threats to Mediterranean (West Palaearctic) tortoises and their effects on wild populations: an overview. **Amphibia-Reptilia**, v.5, p.5-15, 1984.

LE, M; CHRISTOPHER, J., RAXWORTHY, W., MCCORD, M., LISA, M. A molecular phylogeny of tortoises (Testudines: Testudinidae) based on mitochondrial and nuclear genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.2, p.517-531, 2006.

LEGLER, J.M. Tortoises (*Geochelone carbonaria*) in Panama: Distribution and Variation. **The American Midland Naturalist**, v.70, p.490-505, 1963.

LEICH, A.R., SCHWARZACHER, D., JAKSON, I.J., LEITCH, I.J. *In Situ Hybridization: A Practical Guide*. Royal Microscopical Society, p.19-108, 1994.

LEVAN, A., FREDGA, K; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v.50, p.201-220, 1964.

LO MUZIO, L. et al. Morphometric study of nucleolar organizer regions (AgNOR) in HPV-Associated precancerous lesions and microinvasive carcinoma of the oral cavity. **Oral Oncology**, v.33, p.247-259, 1997.

LOVICH, J. E. Possible demographic and ecologic consequences of sex ratio manipulation in turtles. **Chelonian Conservation Biology**, v.2, p.114-117, 1996.

LUISELLI, L. Comparative abundance and population structure of sympatric Afrotropical tortoises in six rainforest areas: the differential effects of "traditional veneration" and of "subsistence hunting" by local people. **Acta Oecologia**, v.24, p.157-163, 2003.

MADER, D.R. **Reptile Medicine and Surgery**, W.B. Saunders Company, p.68-69, 1996.

MARTINEZ, P.A., BOERIS, J.M., SÁNCHEZ, J., PASTORI, M.C., BOLZÁN, A.D., LEDESMA, M.A. Karyotypic characterization of *Trachemys dorbigni* (Testudines: Emydidae) and *Chelonoidis (Geochelone) donosobarrosi* (Testudines: Testudinidae), two species of Cryptodiram turtles from Argentina. **Genetica**, v.137, p.277-283, 2009.

MATSUDA, Y. et al. Highly conserved linkage between birds and turtles: Bird and turtle chromosomes are precise counterparts of each other. **Chromosome Research**, v.13, p.601-615, 2005.

MC BEE, K., BICKHAM, J.W., RHODIN, A.G.J., MITTERMEIER, R.A. Karyotypic variation in the genus *Platemys* (Testudines: Pleurodira). **Copeia**, v.2, p.445-449, 1985.

MEDEM, F. Recomendaciones Respecto a contar el Escamado y tomar las Dimensiones de Nidos, Huevos y Ejemplares de los Crocodylia e Testudines. **Lozania**, v.20, p.1-17, 1976.

MEDEM, F., CASTAÑO-MORA, O.V., LUGO-RUGUELES, M. Contribución al conocimiento sobre la reproducción y el crecimiento de los “morrocoyes” (*Geochelone carbonaria* y *G. denticulata*; Testudines, Testudinidae). **Caldasia**, Bogotá, v.12, p.497-511, 1979.

MOLINA, F.B., ROCHA, M.B. Identificação, caracterização e distribuição dos quelônios da Amazônia Brasileira. Apostila da aula ministrada no mini-curso “**Metodologia de Pesquisa e Classificação de Quelônios**”, realizado durante o “XI Encontro sobre Quelônios da Amazônia”, organizado em agosto de 1996, em Belém (PA), pelo CENAQUA/IBAMA, 1996.

MORA, M., OLIVARES, A.L., VASSALO, A.L. Size, shape and structural versatility of the skull of the subterranean rodent *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha): functional and morphological analysis. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.78, p.85-96, 2003.

MORITZ, C. The evolution of a highly variable sex chromosome in *Gehyra purpurascens* (Gekkonidae). **Chromosoma**, v.90, p.90-111, 1984.

MOSKOVITS, D. K. Sexual Dimorphism and Population Estimates of the Two Amazonian Tortoises (*Geochelone carbonaria* and *G. denticulata*) in Northwestern Brazil. **Herpetologica**. v.44, p.209-217, 1988.

MOSKOVITS, D.K. **The behavior and ecology of two Amazonian tortoises, *Geochelone carbonaria* and *Geochelone denticulata*, in northwestern Brazil**. PhD thesis, University of Chicago, Chicago, p.328, 1985.

MOSKOVITS, D.K. Population and ecology of the tortoises *Geochelone carbonaria* and *G. denticulata* on the Ilha de Maracá. Maracá. **The Biodiversity and Environment of an Amazonian Rainforest**, p.263-284, 1998.

MURUGESAN, R., CHANDRA, N., SANTHIYA, S.T., GOPINATH, P.M., MARIMUTHU, K.M. Nucleolar behavior in a few legumes. **Caryologia**, Florence, v.1, p.17-21, 2001.

NASCIMENTO, H.S.D. **Efeitos da Caça de Subsistência de Vertebrados Terrestres por Comunidades Indígenas: Um Estudo de Caso dos Kayapó de A'ukre, Amazônia Oriental**. Monografia. Universidade Estadual Paulista/UNESP, Rio Claro, 1997.

NIBLICK, H.A., ROSTAL, C., CLASSEN, T. Role of male-male interactions and female choice in the mating system of the desert tortoise, *Gopherus agassizii*. **Herpetological Monographs**, v.8, p.124-132, 1994.

NITTA, H. **Estudo das técnicas de identificação dos cromossomos metafásicos humanos**. Universidade Federal do Paraná, Brasil, p.88-125, 1980.

NOLETO, R.B., KANTEK, D.L.Z., SWARÇA, A.C., DIAS, A.L., FENOCCHIO, A.S., CESTARI, M.M. Karyotypic characterization of *Hydromedusa tectifera* (Testudines, Pleurodira). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.263-266, 2006.

ORTIZ, M.L., RODRÍGUEZ, P.A., BUENO, M.L. Caracterización citogenética de la tortuga sabanera *Podocnemis vogli* (Reptilia: Testudinata: Podocnemididae). **Acta Biológica Colombiana**, v.10, p.19-33, 2005.

PIECZARKA, J.C., MATTEVI, M.S. **Heterocromatina constitutiva**. Série Monografias, Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, Brasil, v.7, p.185-225, 1998.

POUGH, F.H., HEISER, J.B., MCFARLAND, W.N. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, p.386-409, 1993.

POUGH, F.H., ANDREWS, R.M., CADLE, J.E., CRUMP, M.L., SAVITZKY, A.H., Wells, K.D. **Herpetology**. Prentice-Hall, Newark, NJ, 2001.

POUGH, F.H.; ANDREWS, M.R.; SAVITKY, H.A.; WELLS, D.K. **Herpetology**. 2. ed. Prentice Hall, Inc. New Jersey, 2002.

POUGH, F.H., JANIS, C. M., HEISER, J. B. **A Vida dos Vertebrados**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, p.409-477, 2003.

PRITCHARD, P.C.H. **Encyclopedia of Turtle**, ed. T. F. H. Publication Ltda., p.179-183, 752-755, 1979.

PRITCHARD, P.C.H., TREBBAU, P. **The Turtles of Venezuela**, Fundación de Internados Rurales (Venezuela), Society for the study of Amphibians and Reptiles, p.111-117, 1984.

QUIJADA-MASCAREÑAS, J.A., FERGUSON, K.E., POOK, C.E., DA GRAÇA, S.M., THORPE, R.S., WÜSTER, W. Amazonian biogeography: the neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus* complex) as an example. **Journal of Biogeography**, v.34, p.1296-1312, 2007.

RIDLEY, M. **Evolução**. Porto Alegre: Ed. Artmed, p.752, 2006.

RODRIGUEZ-BAYONA, L.O., RYLANDER, M.K. Notes on the Biology of the Tortoise *Geochelone denticulata*, L. in Peru. **Amphibia-Reptilia**, v.5, p.323-327, 1984.

ROHILLA, M.S., RAO, R.J., TIWARI, P.K. Use of peripheral blood lymphocyte culture in the karyological analysis of Indian freshwater turtles, *Lissemys punctata* and *Geoclemys hamiltoni*. **Curr Sci**, v.90, p.1130-1134, 2006.

SAMPAIO, M.M., BARROS, R.M., AYRES, M., CUNHA, O.R. A Karyological study of two species of tortoises from the Amazon region of Brazil. **Cytologia**, v.36, p.199-204, 1971.

SCHEER, U., THIRY, M., GOESSENS, G. Structure, function and assembly of the nucleolus. **Trends in Cell Biology**, v.3, p.236-240, 1993.

SEABRIGHT, M. Rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**, v.11, p.971-972, 1971.

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

SIQUEIRA, C.A.F., SOUZA-SILVA, J.A., MORAL, F.A.F. **Análise de Marcadores Morfológicos Efetivos na Diferenciação de Espécies de *Geochelone* (Fitzinger, 1835) no Criadouro UNIVAP**. Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica. São José dos Campos. Anais de Trabalhos Completos do VIII Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica. ISBN. São José dos Campos: Editora da UNIVAP, v.1, p.124-126, 2004.

SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J. **Fundamentos da Genética**, 2. ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. p.122, 2001.

SOUZA, F.L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa**, v.3, p.15-27, 2004.

STICKEL, L.F. Populations and Home Range Relationships of the Box Turtle, *Terrapene c. carolina* (Linnaeus). **Ecological Monographs**, v.20, p.351-378, 1950.

STORER, I.S., et al. **Zoologia Geral**. Companhia Editora Nacional, São Paulo: 6.ed, 2000.

STUART, B.L, PARHAM, J.F. Molecular phylogeny of the critically endangered Indochinese box turtle (*Cuora galbinifrons*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.31, p.164-177, 2004.

SUMNER, A.T. **Chromosome Banding**. Unwin Hyman Ltd., London, UK, 1990.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.75, p.304-306, 1972.

SWARÇA, A.C., CESTARI, M.M., GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A.L. Cytogenetic characterization of the large South American Siluriform fish species *Zungaro zungaro* (Pisces, Pimelodidae). **Chromosome Science**, v.5, p.51-55, 2001.

TAYLOR, E.B, MACPHAIL, J.D. Historical contingency and ecological determinism interact to prime speciation in sticklebacks, *Gasterosteus*. **Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences**, v.267, p.2375-2384, 2000.

TEIXEIRA, G. et al. Argyrophilic nucleolar organizer region staining is useful in predicting recurrence-free interval in oral tongue and floor of mouth squamous cell carcinoma. **American Journal of Surgery**, v.172, p.684-6883, 1996.

TRECO, F.R., MALABARBA, L.R., GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A.L. Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.6, p.87-92, 2008.

TRIVERS, R.L. Parental investment and sexual selection. p.139-179 in B. Campbell, editor. **Sexual selection and the descent of man**. Aldine Publishing Company, Chicago, 1972.

TURTLE TAXONOMIC WORKING GROUP (BICKHAM, J.W., PARHAM, J.F., PHILIPPEN, H.D., RODIN, A.G.J., SHAFFER, H.B., SPINKS, P.Q., VAN DUK, P.P.) Turtle taxonomy: methodology, recommendations, and guidelines. **Chelonian Research Monographs**, v.4, p.73-84, 2007.

TURTLE TAXONOMY WORKING GROUP (RHODIN, A.G.J., VAN DIJK, P.P., IVERSON, J.B., Shaffer, H.B.). Turtles of the World, 2010 Update: Annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. **Chelonian Research Monographs**, v.5, p.85-164. Available at: <http://www.iucn-tftsg.org/checklist/>, 2010.

VARGAS-RAMÍREZ, M., MARAN, J., FRITZ, U. Red- and yellow-footed tortoises, *Chelonoidis carbonaria* and *C. denticulata* (Reptilia: Testudines: Testudinidae), in South American savannahs and forests: do their phylogeographies reflect distinct habitats?. **Organisms Diversity & Evolution**, v.10, p.161-172, 2010.

WARNAKULASURIYA, K.A.A.S., JOHNSON, N.W. Nucleolar organizer region (NOR) distribution as a diagnostic marker in oral keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.22, p.77-81, 1993.

WILLEMSSEN, R.E., HAILEY, A. Sexual dimorphism of body size and shell shape in European tortoises. **Journal of Zoology (London)**, v.260, p.353-365, 2003.

WILLEMSSEN, R.E., HAILEY, A. Variation in adult survival rate of the tortoise *Testudo hermanni* in Greece: implications for evolution of body size. **Journal of Zoology (London)**, v.255, p.43-53, 2001.

WILLEMSSEN, R.E., HAILEY, A. Variation of adult body size of the tortoise *Testudo hermanni* in Greece: proximate and ultimate causes. **Journal of Zoology (London)**, v.248, p.379-396, 1999.

WILLIAMS, E.E. Two Species of Tortoises in Northern South America. **Breviora**. Museum of Comparative Zoology - Cambridge, Mass, 1960.

WÜSTER, W., FERGUSON, J.E., QUIJADA-MASCAREÑAS, J.A., POOK, C.E., SALOMÃO, M.G., THORPE, R.S. Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Molecular Ecology**, v.14, p.1095-1108, 2005.

YAMADA, K., NISHIDA-UMEHARA, MATSUDA, Y. Molecular and cytogenetic characterization of site – specific repetitive DNA sequences in the Chinese soft - shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*, Trionychidae). **Chromosome Research**, v.13, p.33-46, 2005.

ZANGERL, R., JOHNSON, R.G. The nature of shield abnormalities in the turtle shell. **Fieldiana Geology**, v.29, p.341-362, 1957.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**, Terceira edição. Prentice-Hall International, INC, London, 1996.

ZUG, G.R. **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. Academic Press, New York, NY, 1993.

Apêndices

8. Apêndices

A. Artigo – Contribution to the blood sampling in Testudinidae and Chelidae.

Contribution to the blood sampling in Testudinidae and Chelidae

T Lucena-Silva^{*}, MIA Silva, LPR Venancio, CES Zago, VAG Moscheta, ABL Vidotto, IC Ribeiro, LD Vizotto, CR Bonini-Domingos and MTV Azeredo-Oliveira.

*Corresponding author: Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Centro de Estudos de Quelônios - São José do Rio Preto, SP, Brazil, Rua Cristóvão Colombo, 2265; Jd. Nazareth; CEP: 15054-000; (17) 3221-2392; lucenabio@hotmail.com

Abstract

Superficial blood vessels are the most appropriate sites for reptile blood sampling. We describe a simple method for obtaining blood from Testudines and Chelidae, utilizing the margin-costal vein and cervical venous sinus. Additionally, we discuss advantages over previously described techniques. The sampling sites utilized in the study proved to be easy to access with less complication than other sites previously used by the authors or in the peer reviewed literature. The quantity of blood obtained was sufficient for most applications including genetic analysis and clinical pathology diagnostics. We concluded that the margin-costal vein and the cervical venous sinus are the most suitable sites for blood collection in Testudinidae and Chelidae, respectively

Keywords

Margin-costal vein, cervical venous sinus, blood sampling, Testudinidae, Chelidae.

An easy sampling technique is essential for obtaining blood from chelonians for a variety of purposes such as genetics and clinical pathology diagnostics. Genetics population studies require a substantial number of individuals, and the classical methods of biochemical, cytogenetic, or DNA analysis use materials from, spleen, liver, muscle, kidney, intestine or cell cultures of heart and skin fibroblast¹, all of this methods involving killing or surgery. These methods are generally not feasible in endangered species, because of the risk and number of animals available. Under such conditions, the application of simple blood sampling methods becomes necessary. Thus, we have optimized a less harmful, sterile and efficient blood sampling method for Testudines and Chelidae.

A variety of blood sample sites have been described in chelonians, including heart, veins (jugular, brachial, ventral, coccygeal or scapular), brachial artery, orbital sinus, subcarapacial venipuncture site and trimmed toe-nails.^{2,3,4,5,6,7,8,9} Some sampling methods have disadvantages, has higher risk of infection.¹⁰ The orbital sinus has been used for collecting small volumes of blood through capillary tubes,¹¹ however, this method results in the dilution of blood sample with extra cellular fluids and secretions, which may alter the composition of plasma, affect the volume of cellular components and result in incorrect interpretation of biochemical data. Since lymphatic systems are well developed in chelonian forelimbs, tail and subcarapacial vein,¹² obtaining blood samples from such places may result in hemodilution with lymph.¹³

Most of the published techniques have been applied in long-tailed species such as *Graptemys geographica*, *Trachemys scripta* and marine turtle species.^{6,9,14,15} However, the tail is very short in some species, like in the *Chelonoidis* and *Phrynops* genus. This characteristic may cause some practical problems in the blood sampling when utilizing the tail vein, such as sample contamination, due to difficult to hold firmly animals with recommended device such as those described for *Trachemys scripta*.¹¹ In addition, the amount of blood obtained from such sites is very low, and sometimes not enough for lymphocyte separation and culture.

We collected blood samples from 20 adults of *Chelonoidis carbonaria* and *C. denticulata* (Testudinidae), and 20 adults of *Phrynops geoffroanus* and *P. hilarii* (Chelidae) for cytogenetic evaluation. The animals were from the “Reginaldo Uvo Leone” breeding

farm in Tabapuã, São Paulo, Brazil (20°59' 47.4"S, 49°07' 16.6"W). This place works with wild and exotic reptiles, amphibians and birds with commercial purpose.

The animal care procedures followed in this study were authorized by the Ethics Committee in Animal Experiments (ECAE) of the Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) (Protocol n° 5517/2008), and approved by IBAMA/SISBIO (2838725/n° 16488-1 and n°16488-2). In both species the sampling site were first cleaned with distilled water and ethanol 70%. For the Testudinidae, the margin-costal vein, laterally located to the longitudinal axis of the animal, can be easily accessed with a 5 mL syringe equipped with 18G, ½ inch needle (BD®). An insertion of 5 mm is necessary, and need to access close to the inguinal scutes (Figure 1A). Some adjustment in angle, insertion and positions of the needle may be necessary.

In Chelidae, the cervical venous sinus is located in the middle axis of the cranium base, and can be easily accessed with a 5mL syringe equipped with a 21G, ¼ inch needle (BD®), the correct insertion of needle requires a 90° angle downward, right before the cranium base, and a 2 mm deep insertion is necessary. However, this correct access depends on the size of the animal. The syringe was withdrawn slowly to create a vacuum for easy sampling. Both blood sampling methods are showed in details in the Figure. 1 A and B.

The margin – costal and cervical venous sinus are located in the peripheral part of the body, hence, there is no chance of injury to vital organs, and sufficient amount of blood can easily be withdrawn from animals of any size.

The volume of blood take of each healthy animal should correspond to 1% of their weight. After blood collection the skin was again swabbed with ethanol 70% to prevent microbial infection, and the turtles were left in plastic boxes for observation for four hours. None of the animals used in this study showed any health problems related to the blood sampling.

Our procedure on this species allows collecting enough blood for several studies, and appeared more appropriate, effective and easy with several advantages.

The methods demonstrated appear to be less painful and stressful, does not require anesthesia and provides sterile conditions. This method can be adopted for several other turtles, facilitating the study of this important vertebrate group.

We gratefully acknowledge to Reginaldo Uvo Leone, for taking samples. We are also gratefully to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), for the financial support.

References

1. Mader, D. R. (2000): Normal hematology of Reptiles. In: *Veterinary hematology*, p. 1126- 1132. Feldman, B. F., Zinkl, J. G., Jain, N. C., Eds, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
2. Dessauer, H. (1970): Blood chemistry of Reptiles physiological and evolutionary aspects. In: *Biology of the Reptilia*, p. 1-72. Gans, C., Parsons, T.S., Eds, Academic Press, New York.
3. Stephens, G.A., Creekmore, J.S. (1983): Blood collection by cardiac puncture in conscious turtles. *Copeia* 1983: 522-523.
4. Avery, H.W., Vitt, L.J. (1984): How to get blood from a turtle. *Copeia* 1984: 209-210.
5. Jacobson, E.R. (1987): Reptiles small animal practice. In: *Veterinary clinics of North America*, p. 1203-1225. Harkness, J., Ed, Saunders, Philadelphia.
6. Ulsh, B.A., Congdon, J.D., Hinton, T.G., Whicker, F.W., Bedford, J.S. (2000): Culture methods for turtle lymphocyte. *Met. Cell Sci.* 22: 285-297.
7. Hernandez-Divers, S.M., Hernandez-Divers, J.S., Wyneken, J. (2002): Angiographic, anatomic, and clinical technique descriptions of a subcarapacial venipuncture site for chelonians. *J. Herp. Med. Surg.* 12: 32-37.
8. Rogers, K.D., Booth, D.T. (2004): A method of sampling blood from Australian freshwater turtles. *Wildl. Res.* 31: 93-95.
9. Gregory, B.C.V., Gabriel, B.D. (2006): An improved blood sampling technique for hatchling Emydid turtles. *Herpetol. Rev.* 37: 318-319.

10. Nicole, I.S., Alleman, R.A., Harr K.E. (2007): Circulating inflammatory cells. In: *Infectious diseases and pathology of reptiles*, p. 167-169. Jacobson, E.R., Ed, CRC Press, New York.
11. Nagy, K., Medica, P.A. (1986): Physiological ecology of desert tortoises in southern Nevada. *Herpetologica* 42: 73-92.
12. Ottaviani, G., Tazzi, A. (1977): The lymphatic system. In: *Biology of the Reptilia*, p. 315- 462. Gans, C., Parsons, T.S., Eds, Academic Press, New York.
13. Rohilla, M.S., Tiwari, P.K. (2008): Simple method of blood sampling from Indian freshwater turtles for genetic studies. *Acta Herpetol.* 3: 65-69.
14. Wibbels, T., Hanson, J., Balazs, G., Hillis-Starr, Z.M., Phillips, B. (1998): Blood sampling techniques for hatchling cheloniid sea turtles. *Herpetol. Rev.* 29: 218-220.
15. Bennett, J.M. (1986): A method for sampling blood from hatchling loggerhead turtles. *Herpetol. Rev.* 17: 43.



Figure 1. A. Position and blood sampling site (margin costal vein) for *Chelonoidis carbonaria* (Testudinidae) (Inset: enlarged view to locate the exact position). B. Position and blood sampling site (cervical venous sinus) for *Phrynops geoffroanus* (Chelidae) (Inset: enlarged view to locate the exact position).

B. Artigo – Simple method for Brazilian Testudinidae peripheral blood lymphocyte culture.**Simple method for Brazilian Testudinidae peripheral blood lymphocyte culture****Running title:** Method for peripheral blood lymphocyte culture

*Lucena-Silva T, Silva MIA, Venancio LPR, Zago CES, Moscheta VAG, Vidotto ABL, Ribeiro IC, Vizotto LD, Santos JR, Bonini-Domingos CR and Azeredo-Oliveira MTV.

*Corresponding author: Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Centro de Estudos de Quelônios - Rua Cristóvão Colombo, 2265; Jd. Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brazil, CEP: 15054-000; (17) 3221-2392; lucenabio@hotmail.com

Abstract

A simple, efficient and economic method has been optimized for in vitro peripheral blood lymphocytes culture from Brazilian tortoise, *Chelonoidis carbonaria* (Testudinidae), based in parameters like: culture media, mitogen concentration, mitotic index, culture volume, incubation time and mitotic arrest. Peripheral blood samples were obtained from the margin-costal vein. Samples of four couples were used and tests were made in order to stabilize the optimal conditions. The most optimal condition for good mitotic index was obtained when the lymphocytes were cultured at 37° C in a MEM medium (7.5 mL), with Phytohaemagglutinin (PHA-P) as mitogen (0.375 mL), streptomycin/penicillin (0.1 mL) and incubated for a period of 72 hours. The mitotic arrest was made for 2 hours with colchicina (0.1 mL), after 70 h of setting the culture. After the mitotic arrest, the cells were hipotonized with KCl (0.075 M) for 2 hours and fixed with methanol/acetic acid (3:1). The non-banded mitotic chromosomes were characterized by Giemsa staining. The diploid chromosome number of *Chelonoidis carbonaria* was 52 in females and males. Sexual chromosomes were not observed. The present report is a successful attempt to *in vitro* culture of peripheral blood lymphocytes for the mitotic chromosomes preparation of Brazilian tortoises.

Key Words: Testudinidae, *Chelonoidis carbonaria*, lymphocyte culture, cytogenetic.

Introduction

Cytogenetic characterization is an important parameter for the organism's identification in their natural habitat. The first level of genome analysis involves karyotyping of mitotic chromosomes to know the organism's genome organization at the cytological level (Singh et al., 1970; Gormam, 1973). The classical methods of chromosome preparation described involves sacrifice or surgery of the studied specimens, often being unsafe for survival of the animal, traumatic and unethical, because requires the inoculation *in vivo* with colchicine solution. After sacrifice, cells can be obtained from the spleen, lung, kidney (Medrano et al., 1987) or spinal cord (Kamesaki, 1989). These cells are cultured and stimulated in order to obtain metaphases. (Bickham and Carr, 1983; Medrano et al., 1987; Kamezaki, 1989; Kamezaki, 1990; Bickham, 1975; Killebrew, 1975; Bickham and Baker, 1976 and Bickham et al., 1980).

These methods are generally not feasible in endangered species, because of the risk and number of animals available. In such cases, karyotype analysis from cultured blood lymphocytes without animal sacrificing is most desirable and useful. Few reports are available for lymphocyte cultures of tortoises (Maecha, 1998, Ortiz; Rodriguez, 2003; Ulsh et al., 2001), but these methods previously described do not show satisfactory results, because of cell's differential adaptability, variation in preferred body temperature, lymphocyte population and immunological responses against mitogen stimulation.

The *Chelonoidis* genus (Fitzinger, 1835) is currently represented by four species in South America: *Chelonoidis carbonaria*, *Chelonoidis denticulata*, *Chelonoidis chilensis* and *Chelonoidis nigra*. The specie *C. carbonaria* is considered endangered according to the *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES, 2004), which may come to extinction if illegal trade and habitat loss are not controlled. *Chelonoidis carbonaria* occurs in dry forests and areas of forest vegetation in savannas.

This study is aimed to determine the variables required to obtain a good mitotic index for *Chelonoidis carbonaria*, and also generate information about the karyotypic characteristics of this specie, providing the basis for future research in cytogenetics of this specie.

Material and Methods

Experiments were carried out on 8 adult individuals of *Chelonoidis carbonaria* from the “Reginaldo Uvo Leone” breeding farm in Tabapuã, São Paulo, Brazil (20°59' 47.4"S, 49°07' 16.6"W). The animal care procedures followed in this study were authorized by the Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) of the Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP/IBILCE (n° 018/09) and approved by IBAMA/SISBIO (n° 19514-1).

A total of 20 experiments was carried in the Centro de Estudos de Quelônios, located in the Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, in order to evaluate the needed variables to obtain a good mitotic index, such volume of culture media, phytohaemagglutinin concentration, fetal bovine serum and lymphocytes layer volume. We also evaluate the incubation time, mitotic arrest and hipotonization time (data not showed).

The margin-costal vein, laterally located to the longitudinal axis of the animal was used as blood sampling site, and were first cleaned with distilled water and ethanol 70%. About 5 mL of blood was collected from each animal. The samples was immediately transferred to sterilized tubes containing heparin and stored at 37°C for 2 hours. After blood collection the skin was again swabbed with ethanol (70%) to prevent microbial infection.

The animals were left on observation in order to recovery before be released. Cell types such as red blood cells and lymphocytes were differentiated in centrifuge tube according to their density. The upper layer lymphocytes were transferred to a sterilized centrifuge tube, and incubated at 37°C for complete separation of lymphocytes.

In a 15 ml falcon tube, 7.5 ml of MEM culture medium was taken. All other components were added serially (see Table 1). These steps were carried out in sterile condition under laminar flow hood to avoid microbial contamination. The total volume used per sample follows in the Table 1.

The culture was incubated in an incubator set at 37°C, and shaken gently every morning to break the cell clumps. After 70 hours of incubation, colchicina was added to a final concentration of 0.1 mL and the culture was harvested after 2 hours for good mitotic count (Ulsh et al., 2001, adapted).

Apêndice B – Simple method for Brazilian Testudinidae peripheral blood lymphocyte culture

The culture was centrifuged at 900 rpm for 5 min. After discarding the supernatant, the cell pellet was resuspended in the hypotonic solution (1 mL of pre-warmed 0.075 M KCl) and incubated, at 37°C, for 2 hour. At the end of hypotonic treatment, a few drops of fixative solution (one part glacial acetic acid and three parts absolute methanol) was added to the hypotonic solution to prefix the cells, followed by centrifugation at 900 rpm for 5 min. Again, after discarding the supernatant, the cell pellet was resuspended in 1 ml freshly prepared glacial acetic acid-methanol following gentle agitation. The last step (fixation) was repeated twice for proper fixation. The cells were finally suspended in 0.5 ml fixative solution for chromosome preparation.

Chromosome were prepared by splash technique (Ulsh et al., 2000), stained with Giemsa 6% prepared in Sorenson's buffer (Ulsh et al. 2001), air-dried and mainted in refrigeration for proper conservation. Chromosomes from at least 20 metaphase plates were counted and the best mitotic plates were photographed under light microscopy equipped with an image analyzer (AXIOCAM® ICc 3).

Chromosomes were identified according to Bickham (1975) and arranged in three groups: Group A, consisting of large size macrochromosomes, Group B consisting of medium size macrochromosomes and Group C, including all the microchromosomes whose centromeric positions was not clearly identifiable.

Results and discussion

In this study, the best conditions to obtaining mitotic index were: MEM culture media (7.5 mL/sample) combined with Phytohaemagglutinin (0.375 µL/sample); fetal bovine serum (1.5 mL/sample) and 2 mL of lymphocytes layer. It was incubated in laminar flow chamber at 37°C. After 70 hours, we applied 0.1 mL of colchicine, for 2 hours, and then, was used a potassium chloride solution (KCl 0.075M) for 2 hours. Methanol - Acetic acid 3:1 was used as fixer solution. The mitotic cells were collected after 72 hours.

With the method above described, metaphases plates were identified with good distribution and number, allowing the identification of sets of chromosomes. The non-banded mitotic chromosomes were characterized by Giemsa staining. *Chelonoidis carbonaria* revealed a diploid number of $2n = 52$ chromosomes, in both sexes, divided into

Apêndice B – Simple method for Brazilian Testudinidae peripheral blood lymphocyte culture

three groups (A, B, C). Group A was composed of 28 chromosomes (3 metacentric pairs, one acrocentric and 10 submetacentric pairs), group B consisted of seven pairs of acrocentric chromosomes, and group C showed five pairs of microchromosomes (Figure. 1 - A, B). Sexual chromosomes were not observed.

The optimized conditions in this study have yielded good mitotic index of about 10 - 15 metaphase per slide. Our method showed better results for Testudinids than those methods described for mammals, including humans and also for other reptiles, resulting in good mitotic index (Ulsh et al., 2001, Ciofi et al., 2002). The culture technique we have optimized can be applied to other turtle species also with certain modifications in essential parameters like incubation temperature, incubation period, serum concentration and mitogen.

The diploid chromosome number $2n= 52$ was observed in other members of Testudinidae family as *C. denticulata*, *C. donosobarrosi*, *C. chilensis*, *C. elephantopus* and *C. gigantea* and also in Pelomedusidae, and Bataguridae family members (Benirschke et al., 1976; Bickham, 1975, Bickham and Baker, 1975; Forbes, 1966; Goldestein, Lin, 1982, Sampaio et al., 1971). Our data confirm that some species of the Testudinidae family, have a relatively smaller number of microchromosomes in relation to family Trionychidae (Matsuda et al., 2005; Noletto et al., 2006; Rohilla et al., 2006). The mechanisms responsible for reducing the loss microchromosomes can be numerical, translocation of microchromosomes for acrocentric chromosomes and formation of metacentric chromosomes during the evolution of Testudines (Bickham, 1975).

A simple, efficient and economic method has been optimized for in vitro culture of peripheral blood lymphocytes from Brazilian tortoise, *Chelonoidis carbonaria* (Testudinidae), through the analysis of parameters like culture media, mitogen concentration, mitotic index, culture volume, incubation time, duration of culture and mitotic arrest. The present report is a successful attempt to in vitro culture of peripheral blood lymphocytes for the preparation of mitotic chromosomes for this specie, and is significant because reveals a viable and economic protocol for Brazilian tortoises cell culture, particularly for a moderately equipped laboratory, without harming the animal. This data may be useful for more accurate comparative cytogenetic studies regarding the karyotypic evolution in this group.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Process - 2009/0446-9), Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP - Process - 01098/07) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), for the financial support, and we are also gratefully to Reginaldo Uvo Leone, for taking samples.

References

Benirschke RJ, Quinn AD and SEKULOVICH RE (1976). Chromosomal studies in *Geochelone* (Testudinidae–Reptilia). *Chromosome*. 12:14-16.

Bickham JW (1975). A cytosystematic study of turtles in the genera *Clemmys*, *Mauremys* and *Sacalia*. *Herpetologica*. 31:198-204.

Bickham JW (1980). The karyotype and chromosomal banding patterns of the green turtle (*Chelonia Mydas*). *Copeia*. 540-543.

Bickham JW and Baker RJ (1976). Chromosome homology and evolution of emydid turtles. *Chromosoma*. 54: 201-219.

Bickham JW and Carr JL (1983). Taxonomy and phylogeny of the higher categories of cryptodiran turtles based on a cladistic analysis of chromosomal data. *Copeia*. 4: 918-932.

Ciofi C, Milinkovitch CM, Gibbs JP, et al. (2002). Microsatellite analysis of genetic divergence among populations of giant Galapagos tortoises. *Mol Eco*. 11:2265-2283.

Cuchens MA and Clem LW (1979). Phylogeny of lymphocytes heterogeneity. III. Mitogenic response of reptilian lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol*. 3:287-297.

Forbes WC Jr (1996). A cytological study of the *Chelonia*. Unpublished PhD Dissertation, University Connecticut, Storrs, 1996.

Goldstein S and Lin CC (1972). Somatic cell hybrids between cultured fibroblast from the Galapagos tortoise and the golden hamster. *Exp Cell Res*. 73:266-269.

Apêndice B – Simple method for Brazilian Testudinidae peripheral blood lymphocyte culture

Gorman GC (1973). The chromosomes of the Reptilia, a cytotaxonomic interpretation. In *Cytotaxonomy of Vertebrate Evolution* (eds Chiarelli AB and Capanna E) *Academic Press*, London. 349-424.

IUCN. Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org. IUCN. <<http://www.iucnredlist.org>>, 2004.

Kamesaki N (1989). Karyotypes of the loggerhead turtle, *C. caretta*, from Japan. *Zool Sci.* 6:421-422.

Kamesaki N (1990). Karyotype of the Haswkbill Turtle, *Eretmochelys imbricata*, from Japan, with notes on a method for preparation of Chromosomes from liver cells. *Japanese J. of Herpetol.* 13:111-113.

Killebrew FC (1975). Mitotic chromosomes of turtles: the Pelomedusidae. *J Herpetol.* 9:281-285.

Maecha S (1998). Caracterización citogenética de *Rhinoclemmys diademata* (Mertens, 1954) (Testudina: Emididae). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Trabajo de Grado, Bogotá, Colombia.

Matsuda Y et al (2005). Highly conserved linkage between birds and turtles: Bird and turtle chromosomes are precise counterparts of each other. *Chromosome Research.* 13:601-615.

Medrano LM, Dorizzi F, Romblot, et al. (1987). Karyotype of the sea turtle *Demochelys coriacea* (Vandelli, 1761). *Amphibia- Reptilia.* 8:171-178.

Noletto RB, Kantek DLZ, Swarça AC et al. (2006). Karyotypic characterization of *Hydromedusa tectifera* (Testudines, Pleurodira). *Genetics and Molecular Biology.* 29:263-266.

Apêndice B – Simple method for Brazilian Testudinidae peripheral blood lymphocyte culture

Ortiz M and Rodríguez P (2003). Estudio citogenético de la tortuga “sabanera” (*Podocnemis vogli*. Müller, 1953) (Testudinata: Podocnemidae). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Trabajo de Grado. Bogotá, Colombia.

Rohilla MS, Rao RJ and Tiwari PK (2006). Use of peripheral blood lymphocyte culture in the karyological analysis of Indian freshwater turtles, *Lissemys punctata* and *Geoclemys hamiltoni*. *Curr Sci.* 90:1130-1134.

Sampaio MM, Barros RM, Ayres M et al. (1971). A Karyological study of two species of tortoises from the Amazon region of Brazil. *Cytologia.* 36:199-204.

Singh L, Sharma T and Ray-Chaudhuri SP (1970). Chromosome numbers and sex chromosomes in few Indian species of amphibia and reptiles. *Mammal. Chromosome Newsl.* 11:91-94.

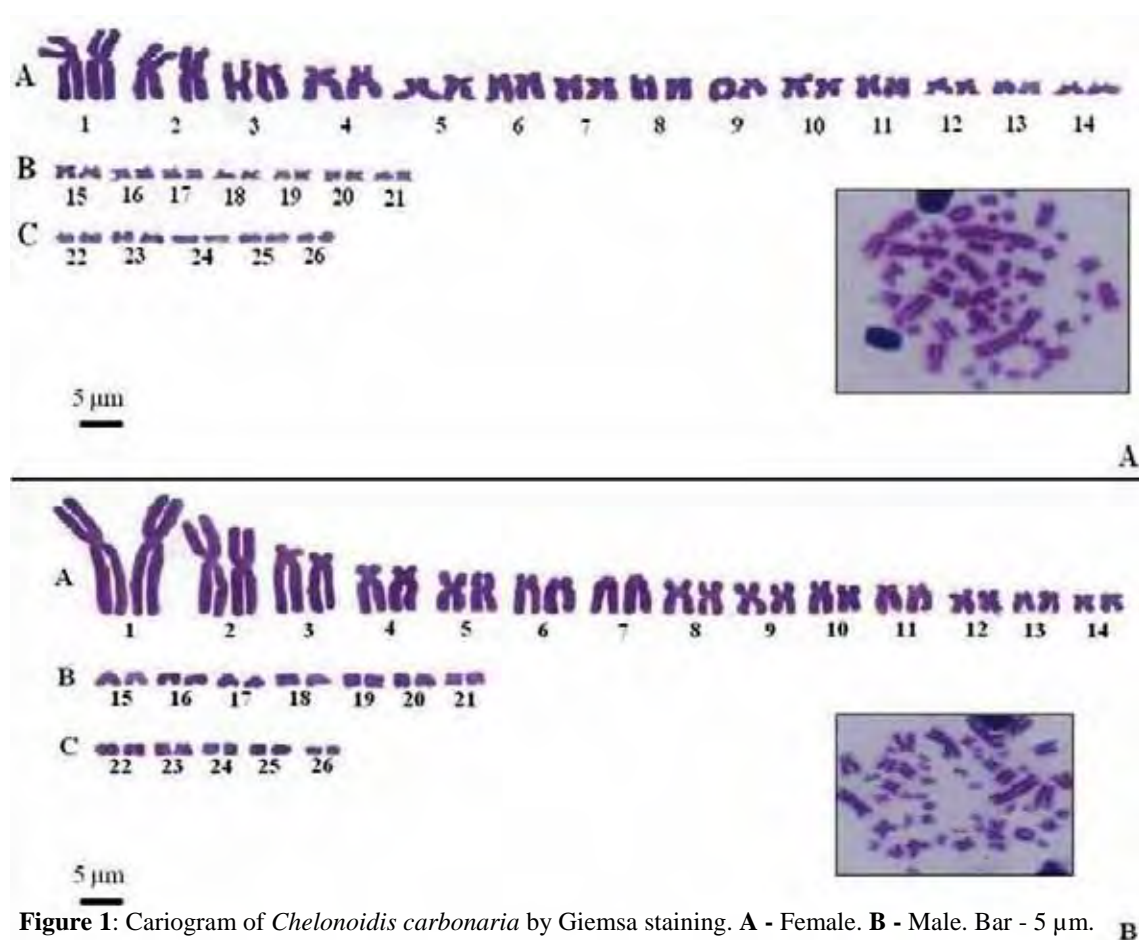
Ulsh BA, Congdon JD, Hinton TG, et al. (2001). Culture methods for turtle lymphocyte. *Methods Cell Sci.* 22:285-297.

Ulsh BA, Muhlman-Diaz M, Whicker FW, et al. (2000). Chromosome translocations in turtles: A biomarker in a sentinel animal for ecological dosimetry. *Radiat Res.* 153: 752-759.

Apêndice B – Simple method for Brazilian Testudinidae peripheral blood lymphocyte culture

Table 1. Components of short-term culture of peripheral blood lymphocytes of *Chelonoidis carbonaria*.

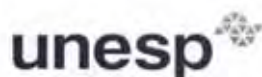
Component	Culture volume
MEM (E) with NaHCO ₃ (CULTILAB)	7.5 mL
Penicillin-Streptomycin (10.000 U.I. / ml-10 mg/mL)	0.1 mL
Phytohaemagglutinin (PHA-P) (CULTILAB)	0.375 mL
Fetal calf serum (CULTILAB)	1.5 mL
Lymphocytes with serum (separated from 5mL whole blood)	2 mL
Colchicine (16µg/ml)	0.1 mL

**Figure 1:** Karyogram of *Chelonoidis carbonaria* by Giemsa staining. **A** - Female. **B** - Male. Bar - 5 µm.

Anexos

9. Anexos

A. Comissão de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL IBILCE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Estudo Morfológico e Citogenético em duas espécies de jabutis do gênero *Chelonoidis* (Testudines)" (protocolo no. 018/09 CEEA), sob responsabilidade de Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado "ad referendum" da Comissão de Ética em Experimentação Animal, em 24/08/09.

CERTIFICATE

UNESP / IBILCE Ethical Committee for Animal Research (CEEA) hereby certify that the scientific investigation entitled "Estudo Morfológico e Citogenético em duas espécies de jabutis do gênero *Chelonoidis* (Testudines)" (protocol n. 018/09 CEEA), on Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira responsibility, is in accordance with Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and it was approved by the Committee of this Institute, on agosto 24th, 2009.

São José do Rio Preto, Agosto 24th, 2009.

Prof. Dra. Rejane Majra Góes
Presidente da CEEA

B. Autorização para Atividades com Finalidade Científicas – IBAMA/RAN



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 19514-1	Data da Emissão: 04/06/2009 11:26	Data de Validade: 04/06/2010
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2463454	Nome: Tiago Lucena da Silva	CPF: 329.812.378-10
Título do Projeto: Estudo Morfológico e Citogenético em duas espécies de jabutis do gênero <i>Chelonoidis</i> (Testudines)		
Nome da Instituição : UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO		CNPJ: 48.031.918/0011-04

Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicos que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exige o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição <i>in situ</i> .
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Carlos Eduardo Saranz zago	Pesquisador	246 376 238-12	21233397 ssp-SP	Brasileira
2	Maria Isabel Alonso da Silva	Pesquisadora	074 584 676-90	8 836 693 SSSPMG-MG	Brasileira
3	Larissa Paola Rodrigues Venancio	Pesquisadora	326 516 068-80	32285625-5 SSP-SP	Brasileira
4	Claudia Regina Bonini Domingos	Coordenadora da Pesquisa	042 642 088-39	7609225 SSP-SP	Brasileira
5	Maria Tercia Viola de Azeredo Oliveira	Orientadora da Pesquisa	018 731 028-95	7842186 X ssp-SP	Brasileira
6	Ilato Cristiano Ribeiro	Pesquisador	358 534 388-08	40109487X SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	TABAPUA	SP	Crnaoouro * Reginaldo Uvo Leone *	Fora de UC

Atividades X Taxons

#	Atividade	Taxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas <i>ex situ</i>	<i>Chelonoidis carbonaria</i> , <i>Chelonoidis denticulata</i>
2	Observação e gravação de imagens ou som	<i>Chelonoidis carbonaria</i> , <i>Chelonoidis denticulata</i>

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Escama, Sangue
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Captura manual
3	Método de marcação (Répteis)	Foto-identificação, Pintura de escamas

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do ibama/sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 15845274



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 19514-1	Data da Emissão: 04/06/2009 11:26	Data de Validade: 04/06/2010
-----------------	-----------------------------------	------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2463454	Nome: Tiago Lucena da Silva	CPF: 329.812.378-10
Título do Projeto: Estudo Morfológico e Citogenético em duas espécies de jabutis do gênero Chelonoidis (Testudines)		
Nome da Instituição : UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO		CNPJ: 48.031.918/0011-04

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO	Universidade Pública

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 15845274



Página 2/3

