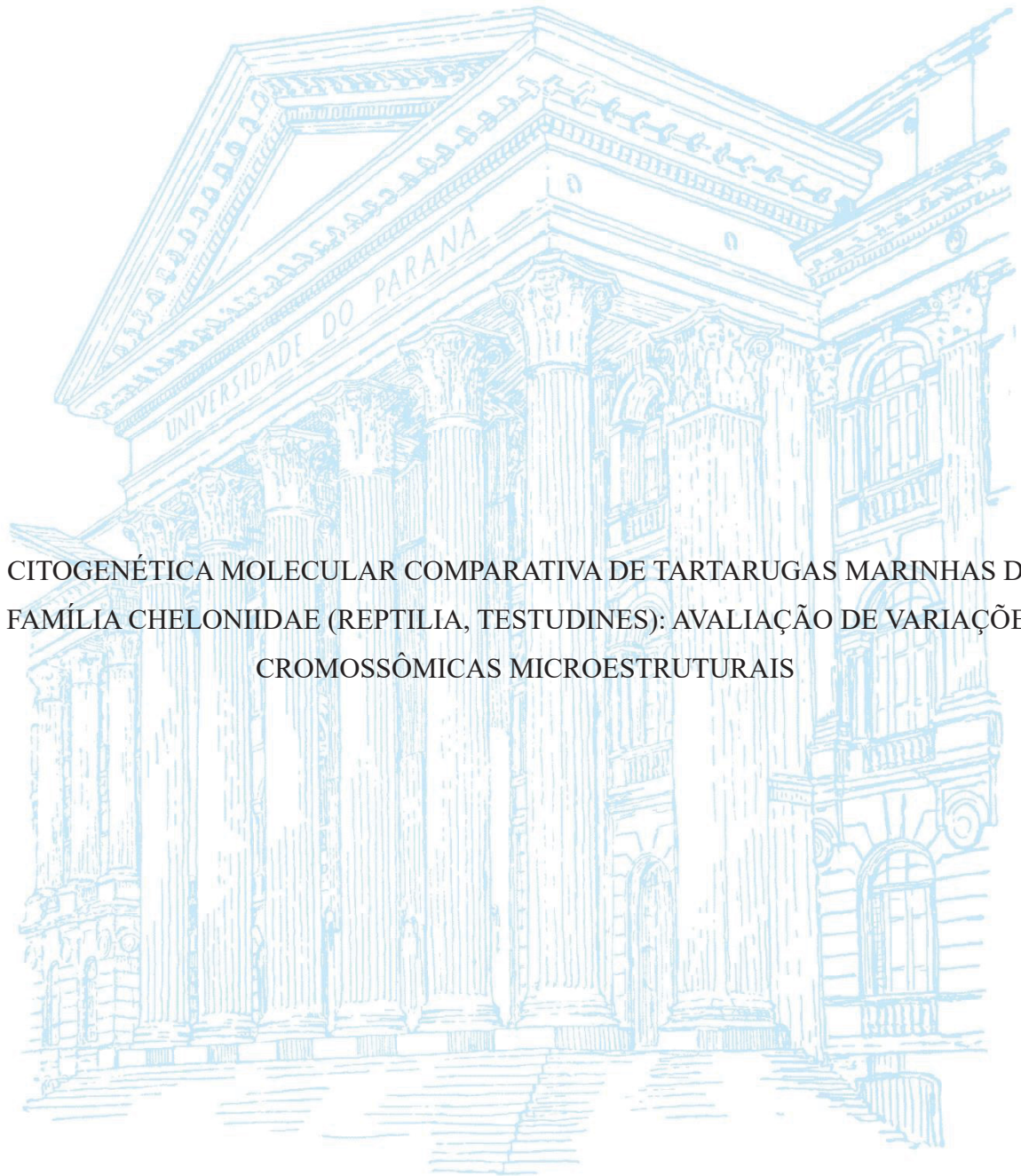


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE REGINA DIAS MACHADO



CITOGENÉTICA MOLECULAR COMPARATIVA DE TARTARUGAS MARINHAS DA
FAMÍLIA CHELONIIDAE (REPTILIA, TESTUDINES): AVALIAÇÃO DE VARIAÇÕES
CROMOSSÔMICAS MICROESTRUTURAIS

CURITIBA

2021

CAROLINE REGINA DIAS MACHADO



CITOGENÉTICA MOLECULAR COMPARATIVA DE TARTARUGAS MARINHAS DA
FAMÍLIA CHELONIIDAE (REPTILIA, TESTUDINES): AVALIAÇÃO DE VARIAÇÕES
CROMOSSÔMICAS MICROESTRUTURAIS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética,
Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de
Doutora em Ciências Biológicas, área de concentração
Genética.

Orientador: Prof Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Co-orientadoras: Dra. Camila Domit

Prof. Dra. Marcela Baer Pucci

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Machado, Caroline Regina Dias.

Citogenética molecular comparativa de tartarugas marinhas da família Cheloniidae (Reptilia, Testudines): avaliação de variações cromossômicas microestruturais. / Caroline Regina Dias Machado. – Curitiba, 2021.
125 f. : il.

Orientador: Marcelo Ricardo Vicari.

Coorientadora: Camila Domit.

Coorientadora: Marcela Baer Pucci.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Morfologia (Animais). 2. Cromossomos. 3. DNA. 4. Hibridação. 5. Marcadores biológicos. 6. Mitocôndria. 7. Tartaruga marinha. I. Título. II. Vicari, Marcelo Ricardo. III. Domit, Camila. IV. Pucci, Marcela Baer. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 597.92



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CAROLINE REGINA DIAS MACHADO** intitulada: **CITOGENÉTICA MOLECULAR COMPARATIVA DE TARTARUGAS MARINHAS DA FAMÍLIA CHELONIIDAE (REPTILIA, TESTUDINES): AVALIAÇÃO DE VARIAÇÕES CROMOSSÔMICAS MICROESTRUTURAIS**, sob orientação do Prof. Dr. MARCELO RICARDO VICARI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

30/08/2021 10:59:25.0

MARCELO RICARDO VICARI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

30/08/2021 15:27:07.0

KALINE ZIEMNICZAK

Avaliador Externo (INSTITUTO FEDERAL DE EDUC., CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DO AMAZONAS)

Assinatura Eletrônica

30/08/2021 11:50:42.0

RENATA COELHO RODRIGUES NORONHA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ)

Assinatura Eletrônica

30/08/2021 11:47:26.0

DANIEL PACHECO BRUSCHI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1587 - E-mail: ppg-gen@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 108888

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 108888

Aos meus pais Vera e Antonio,
com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus e as minhas santinhas Nossa Senhora Aparecida e Nossa Senhora do Perpétuo Socorro por toda a minha fé, minha força, por escutarem minhas preces, por guiarem os meus passos e me abençoarem diariamente.

Às tartarugas marinhas, que povoaram meus sonhos desde criança e tornaram ele realidade durante esses anos. Muito obrigada minhas tartinhas, eu juro que nenhum sangue foi doado em vão para essa pesquisa, trabalhar com vocês foi meu sonho realizado!

Aos meus pais Vera e Antonio, vocês são a minha base. Me deram toda a escolaridade e as oportunidades que não tiveram, acreditaram, me apoiaram e me permitiram realizar cada etapa dos meus sonhos, seja com apoio emocional ou financeiro. Painho, seu apoio me move e me engrandece, muito obrigada. Mainha, só nós duas sabemos que a trajetória até aqui não foi fácil, você virou tão cientista quanto eu durante essa caminhada e nós jogamos todos os obstáculos pra bem longe. Ainda bem que a gente tem a gente né? Amo vocês.

Ao meu namorado Bernardo, por ser o amor da minha vida. Você sempre acreditou em mim e sempre soube como demonstrar isso, com apoio, amor, presença, parceria, respeito, compreensão e um “é claro que você consegue, mo”. Eu amo nossa vida e amo você Bere!

Aos meus irmãos Fernando e Sérgio, por compartilharem comigo o amor pelo mar. Em especial ao Fernando, que além de me levar para várias coletas, já também filmou, acompanhou e conheceu algumas tartarugas. Muito obrigada bro!

À minha cunhada Michele por ser professora e amiga, por estar presente na minha vida há tanto tempo, por todos os conselhos científicos (ou não), por me emprestar tantas vezes o seu laboratório e reagentes.

À minha sobrinha Sofia, a criança mais linda e engraçada que eu conheço, que me anima em qualquer dia e me inspira a ser sempre melhor, você é o dengo da tia Carol!

Aos meus avós (*in memoriam*) Cleri, Jayme Roque, Ilda e Elvino, porque os avós nunca morrem, eles apenas ficam invisíveis e dormem nas profundezas do nosso coração.

Aos meus sogros, Hércio e Rejane, e às minhas cunhadas Laís e Aline por serem minha segunda família e sempre estarem com as portas de casa abertas para mim.

Às minhas amigas Aline, Isabella, Luiza, Manuela, Melissa e Priscilla por serem as melhores amigas e irmãs que eu poderia ter. Por terem tanto orgulho de mim e saberem demonstrar esse amor. Amo vocês, juntas sempre! Longe fisicamente, mas perto do coração.

Aos meus queridos Alex e Lucas Rodrigo, os amigos que me apoiam tanto nessa jornada.

À Luzia, por todo suporte desde sempre, seja com apoio emocional ou com suas loucuras.

À minha família curitibana: seu João, dona Sueli, dona Vera, Geison e Daniele. Além de um lugar pra ficar, vocês me deram uma casa aí pra onde eu sempre quero voltar. Dane, obrigada por ser minha amiguinha, sem você eu não teria caronas, comidinhas gostosas, risadas à toa e muito ânimo. Te admiro tanto!

À Alanna, minha teacher e amiga, por toda paciência e ajuda na tradução de artigos e pela amizade que construímos.

À Maria Carolina, que me pegou pela mão e sem a qual eu não teria concluído meu doutorado e mudado tantas visões. Não tenho como te agradecer por tudo, Carol!

Ao Jimmy (*in memoriam*), que além de escutar diariamente minha rotina de doutoranda me trouxe o alento e o gosto por uma atividade física, você me faz muita falta.

Aos meus companheiros caninos, Pantufa e Slater, pelo amor incondicional durante os anos que estivemos juntinhos.

A jornada de Pós-Graduação acaba sendo uma jornada mais espiritual do que acadêmica, especialmente em meio à uma pandemia, e eu não teria conseguido passar por isso se não fossem todas as pessoas envolvidas a seguir!

Meu orientador Marcelo Ricardo Vicari, que foi o primeiro a acreditar no meu sonho e topou orientar ele. Você foi essencial para que tudo acontecesse, obrigada pela confiança durante todos esses anos, Doc. Pela paciência comigo (desde a iniciação científica), os ensinamentos, puxões de orelha, correções e principalmente pela amizade! Estamos juntos, Doc!

Minha co-orientadora Camila Domit, me inspiro tanto em você! Obrigada por me abrir tantas as portas e por depositar tanta confiança no meu trabalho. Você é demais, Cá!

Minha co-orientadora e querida amiga Marcela, por ser minha mãe científica e me ensinar tudo que eu sei! Obrigada pelos conselhos, por aguentar meus desesperos, por me orientar. Você é meu grande presente dessa vida acadêmica Marci e eu te amo muito!

À professora Viviane Nogaroto Vicari, por todo o conhecimento compartilhado, pela ajuda com protocolos, burocracias e traduções de artigo. Obrigada prof!

À professora Kátia Sabrina Paludo, que me socorreu e encenou um cultivo de linfócitos, sem o qual eu não teria tido os resultados pra essa tese. Você é fantástica prof!

Ao professor José Rosa Gomes por abrir seu laboratório, por todas as nossas conversas e por permitir o uso contínuo do microscópio de epifluorescência.

Aos meus amigos do laboratório de Biologia Cromossômica: Estrutura & Função, os que já passaram e aos que continuam presentes no lab: Geize (Geizinha), Larissa (Laris), Matheus (Mathew), Sebastião (Sebas) e Stephane (Stefa), pelo convívio diário e por toda ajuda ao longo dos anos. Stefa, por ser minha grande amiga, me escutar diariamente e rir sem fim das nossas trapalhadas juntas, obrigada por ter aparecido na minha vida amigam, te amo. Sebas, por sermos tão parecidos, sempre juntos: surtando, rindo, ajudando e fofocando, você é meu presentinho migo, te amo. Laris, a rainha dos bandamentos e minha co-autora maravilhosa, não tenho como agradecer tanta ajuda e confiança que você me deu. Mathew, obrigada por todas as zilhões de ajuda e paciência nas explicações. Geizinha, pelas conversas descontraídas, ajudas com o Lattes, risadas altas e pelos chimarrões!

Aos grandes amigos que a ciência me trouxe e levo sempre comigo, Alain e Michele, por serem presentes, me ajudarem e alegrarem sempre. Rafael (Rafo/Sista), por conversar, fofocar e sempre me ajudar com tantas dúvidas. Patrícia, Luiz e Eliza, pela risada diária e conversas quilométricas no nosso grupinho. Tiago Degrandi, que me ajuda sempre com dicas e experimentos mesmo à distância, “tá certo assim, migo?”.

À Ely, pela companhia durante vários dias solitários de experimentos, pelas conversas e por manter o laboratório sempre limpinho

Aos meus amigos do Laboratório de Ecologia e Conservação (LEC) por toda a ajuda prestada nas minhas coletas e por serem minha família em Pontal! Em especial, as minhas grandes amigas Luci e Sté, amo vocês. À Dai e o Gabriel meus denguinhos, por me darem todo apoio: emocional e com moradia. Gabe, obrigada por toda paciência comigo e com as híbridas!

A todo o pessoal da Mar Brasil e do Projeto de Monitoramento de Praias – Bacia de Santos pela ajuda e suporte durante as coletas.

A toda a equipe da Fundação Projeto Tamar (Bases Pipa, Florianópolis e Praia do Forte), pela autorização das coletas, por toda a ajuda prestada, por confiarem no meu trabalho. Ter vocês como parceiros é um sonho para mim! Em especial à veterinária Thais Pires, por ter me recebido tão bem, ter me ensinado tanto e ter dado todo o suporte antes e depois das coletas, você é demais Tha. As minhas amigas tartarugueiras: Gio, Rapha, Ju, Helo, Tati e Vero, pelo apoio, amizade e pelos dias inesquecíveis na Bahia. Alegria em ter encontrado vocês!

À Daphne Wrobel, a qual eu admiro muito, e acreditou desde o início no meu sonho proporcionando minhas primeiras coletas.

Ao Laboratório de Citogenética Evolutiva e Conservação (CECA) da Universidade Federal do Paraná, por todo apoio com os microssatélites. Em especial, a minha amiga Camilla Gazolla por tantos FISH, mas principalmente pela amizade construída ao longo desses anos!

Ao Aquário Natal pela autorização das coletas e pelo suporte.

Aos meus queridos, Layse, Gideão, Manoella e Luciano, que me deram todo suporte com os materiais que deram início a esse estudo e com a ajuda em protocolos! Layse, obrigada por ter aparecido na minha vida, gata! Mano, obrigada pela paciência com minhas dúvidas.

Aos professores que me ajudaram durante essa caminhada, sendo banca e acompanhamento: Daniel Pacheco Bruschi, Rafael Bueno Noletto e Michelle Schemberger (desde a graduação). Obrigada pelas sugestões, conselhos e incontáveis ajudas. Em especial, Prof. Daniel, por abrir seu laboratório e acreditar tanto em mim.

Aos meus colegas do Doutorado, pelo conhecimento compartilhado e pela ajuda e torcida com os nossos projetos. Em especial, a Tayana, minha amiga do coração que o doutorado me trouxe! Obrigada por tudo, amiga.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao Centro de Estudos do Mar, a Universidade Federal do Paraná e ao Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência da UFPR, por fornecerem toda a infraestrutura e apoio para a realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e aos docentes, por terem me recebido e por terem dado o apoio possível. Aos secretários Murilo e Roberto por toda ajuda prestada.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por conceder a licença para as coletas de material biológico.

À banca de avaliação, pela disponibilidade e por contribuírem com o enriquecimento desta tese!

Por fim, não poderia deixar de estender meus agradecimentos aos meus professores da educação básica, os quais participaram desde o caminho pela alfabetização até o surgimento do amor pelas Ciências. Vocês foram e são inspiração para mim, tenho a plena certeza que sem todas as suas contribuições eu não teria chegado ao Doutorado.

Agradeço de todo o meu coração a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa pesquisa!

*“Nunca tive pressa, mas agora eu tenho
Tenho pressa que essa gente se conscientize, que respeite a vida e que economize
Acredito que um dia o homem vá mudar e as crianças do futuro vão poder brincar
E é preciso paciência para ensinar
E é preciso consciência para poder mudar
Deixa!
Deixa os bichos do mar
Deixa!
Deixa as tartarugas”*

(Bichos do Mar, Lenine)

RESUMO

As tartarugas marinhas pertencem à mais antiga linhagem de répteis vivos e são componentes essenciais dos ecossistemas marinhos. São reconhecidas sete linhagens vivas de tartarugas marinhas no mundo, sendo que cinco delas ocorrem no litoral brasileiro, as quais são: *Dermochelys coriacea*, única representante da família Dermochelyidae, e as outras quatro espécies pertencem à família Cheloniidae: *Chelonia mydas*, *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata* e *Lepidochelys olivacea*. O processo de hibridização entre espécies de tartarugas marinhas na costa brasileira é atípico, sendo a maior taxa de hibridização entre as espécies no mundo, ocorrendo onde áreas de alimentação e períodos reprodutivos se sobrepõem. A citogenética de tartarugas marinhas vem se mostrando um campo promissor que permanecia até pouco tempo atrás inexplorado, permitindo que inferências evolutivas sejam feitas para o grupo a partir do estudo da microestrutura cariotípica. O estabelecimento da estrutura cariotípica para as espécies e o desenvolvimento de marcadores cromossômicos espécie-específicos permitem o reconhecimento de cariótipos híbridos e podem ser uma ferramenta auxiliar ao reconhecimento morfológico e molecular de indivíduos híbridos. Sendo assim, esse estudo tem como objetivo ampliar o conhecimento da organização cariotípica das tartarugas marinhas da família Cheloniidae que ocorrem no litoral brasileiro a partir da obtenção e caracterização de marcadores cromossômicos para avaliar variações cromossômicas microestruturais interespecíficas e aplicar esses marcadores no estudo de dois indivíduos híbridos (híbridas *A* e *B*). Utilizou-se técnicas baseadas na coloração convencional por Giemsa, bandamentos C e G, e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNA ribossômico (rDNA) 5S e 18S e microssatélites (CA)_n, (GA)_n, (CAG)_n, (GATA)_n, (GAA)_n, (CGC)_n e (GACA)_n para as espécies puras e indivíduos híbridos. Foram realizadas análises morfológicas e moleculares, utilizando genes de DNA mitocondrial (mtDNA) e nuclear (nucDNA), para identificação das espécies envolvidas nos casos de hibridismo. O uso da sonda de rDNA 5S permitiu a identificação do segundo par de macrocromossomos metacêntrico como detentor do sítio de rDNA para as quatro espécies puras e as híbridas *A* e *B*, sendo que um sítio adicional em um par de microcromossomos (mc) foi identificado para *C. mydas* e híbrida *A*. Os resultados mostram que apenas os microssatélites (CA)_n, (GA)_n, (CAG)_n e (GATA)_n são detectados nos cromossomos das espécies puras e híbridas, preferencialmente em regiões heterocromáticas dos mc. Variações na localização da heterocromatina e dos microssatélites corrobora a proposta de reposicionamento de centrômero nas espécies de Cheloniidae. A análise integrada (citogenética, morfológica e molecular) mostra que a híbrida *A* é um provável híbrido de segunda geração (F2) entre *C. caretta* x *E. imbricata* x *C. mydas* e a híbrida *B* pode ser resultado de um retrocruzamento entre *C. caretta* x *L. olivacea*, porém o conjunto cromossômico dos híbridos continua balanceado. Esses achados são úteis no entendimento da diversificação cariotípica das espécies e podem ser aplicados no estudo de cariótipos híbridos. Futuramente, a hibridização entre tartarugas marinhas no Brasil deve continuar a ser estudada utilizando análises integradas para compreender e determinar as consequências desse fenômeno para os indivíduos híbridos e para as espécies puras, visando estratégias de manejo e conservação.

Palavras-chave: análises morfológicas; Cheloniidae; conjuntos cromossômicos balanceados; DNAs repetitivos; híbridos; marcadores mitocondriais; marcadores nucleares.

ABSTRACT

Sea turtles belong to the oldest lineage of living reptiles, being an essential part of marine ecosystems. Seven sea turtle living lineages are recognized in the world, five of which occur on the Brazilian coast, they are: *Dermochelys coriacea*, the only representative of Dermochelyidae, and the other four species belong to Cheloniidae: *Chelonia mydas*, *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata* and *Lepidochelys olivacea*. Hybridization process among sea turtles species on the Brazilian coast is atypical with the highest rate of hybridization among the species in the world, occurring where feeding and nesting areas overlap. The cytogenetic of sea turtles is proving to be a promising field that remained unexplored until recently, allowing evolutionary inferences to be made for the group from the study of karyotypic microstructure. The establishment of the karyotypic structure for the species and the development of species-specific chromosome markers allow hybrids karyotypes recognition and can be an auxiliary tool for morphological and molecular recognition of hybrids individuals. Therefore, this study aims to increase the knowledge of the Cheloniidae sea turtles karyotypic organization that occur on the Brazilian coast by obtaining and characterizing chromosomal markers to evaluate interspecific microstructural chromosomal variations and apply these markers in the study of two hybrid individuals (hybrids *A* and *B*). We used techniques such as conventional Giemsa staining, C and G-banding, and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using 5S and 18S ribosomal DNA (rDNA) and (CA)_n, (GA)_n, (CAG)_n, (GATA)_n, (GAA)_n, (CGC)_n and (GACA)_n microsatellites probes for pure and hybrid species. Morphological and molecular analyses were made using mitochondrial (mtDNA) and nuclear (nucDNA) DNA sequences in order to identify the species involved in these cases of hybridism. The 5S rDNA site was identified in the second pair of metacentric macrochromosomes on the four pure species and hybrids *A* and *B*, in addition one extra site was identified in a microchromosome (mc) pair on *C. mydas* and hybrid *A*. The results show that only (CA)_n, (GA)_n, (CAG)_n and (GATA)_n are detected on the chromosomes of pure and hybrid species, preferentially in heterochromatic regions of mc. Variation in the heterochromatin and microsatellites localization corroborates the proposal of centromere repositioning occurrence in Cheloniidae species. The integrated analyses (morphological, molecular, and cytogenetics) shows that *hybrid A* is probably an F2 hybrid among *C. caretta* x *E. imbricata* x *C. mydas* while *hybrid B* could be the result of backcross among *C. caretta* x *L. olivacea*, however the chromosome sets are still balanced. These findings are useful in understanding the karyotypic diversification of the species and can be applied in hybrid karyotypes studies. In the further, sea turtles hybridization in Brazil should continue to be studied using integrated analyses to comprehend and determine the consequences of this phenomenon for hybrid individuals and for pure species, in order to develop conservation and management strategies.

Key-words: balanced chromosome sets; Cheloniidae; hybrids; mitochondrial markers; morphological analysis; nuclear markers; repetitive DNAs.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1 – Cladograma representativo das relações filogenéticas entre as espécies de tartarugas marinhas21
- Figura 2 – Fotos de espécimes de *Chelonia mydas* e esquema de identificação morfológica da espécie focando nas placas da cabeça, carapaça e plastrão25
- Figura 3 – Fotos de espécimes de *Caretta caretta* e esquema de identificação morfológica da espécie focando nas placas da cabeça, carapaça e plastrão26
- Figura 4 – Fotos de espécimes de *Eretmochelys imbricata* e esquema de identificação morfológica da espécie focando nas placas da cabeça, carapaça e plastrão...27
- Figura 5 – Fotos de espécimes de *Lepidochelys olivacea* e esquema de identificação morfológica da espécie focando nas placas da cabeça, carapaça e plastrão...28
- Figura 6 – Espécimes híbridas utilizadas no presente estudo. À esquerda *híbrida A* (provável F2 entre *C. caretta* x *E. imbricata* x *C. mydas*) e à direita *híbrido B* (provável retrocruzamento entre *C. caretta* x *L. olivacea*).....31

MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 7 – Mapa parcial da América do Sul indicando os locais de coleta de material biológico das tartarugas marinhas em diferentes áreas do Brasil42
- Figura 8 – Diagrama de reconhecimento das placas para identificação morfológica das espécies43

CAPÍTULO I

- Figura 1 – Phylogeny, sampled area, and details of chromosome changes in four Cheloniidae species.....68
- Figura 2 – Representative idiograms of heterochromatic regions, NOR and microsatellite motifs on the chromosomes of the four sea turtle species69
- Figura 3 – Karyotypes of sea turtle species subjected to C-banding.....70
- Figura 4 – Karyotypes of sea turtle species subjected to FISH using (CA)₁₅ microsatellites probes (*red signals*)71
- Figura 5 – Karyotypes of sea turtle species subjected to FISH using (GA)₁₅ microsatellites probes (*red signals*)72

| | |
|---|----|
| Figura 6 – Karyotypes of sea turtle species subjected to FISH using (CAG) ₁₀ microsatellites probes (<i>red signals</i>) | 73 |
| Figura 7 – Karyotypes of sea turtle species subjected to FISH using (GATA) ₈ microsatellites probes (<i>red signals</i>) | 74 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|-----|
| Figura 1 – Photographs of hybrid's <i>A</i> and <i>B</i> morphological traits considered as altered or uncharacteristic | 97 |
| Figura 2 – Comparison between carapace scute patterns of <i>C. mydas</i> , <i>C. caretta</i> , <i>E. imbricata</i> <i>L. olivacea</i> , <i>Hybrid A</i> , and <i>Hybrid B</i> | 98 |
| Figura 3 – Haplotype network based on fragments of the mtDNA (a) <i>12S</i> and (b) <i>16S</i> , and on fragments of the nucDNAs (c) <i>BDNF</i> , (d) <i>Cmos</i> , and (e) <i>R35</i> for hybrids <i>A</i> and <i>B</i> , and pure species | 99 |
| Figura 4 – Representative idiograms of G-bandings on the chromosomes of the four pure sea turtle species | 100 |
| Figura 5 – Representative idiograms of heterochromatic regions, rDNAs and microsatellite motifs on the chromosomes of the four pure sea turtle species | 101 |
| Figura 6 – Karyotypes of <i>hybrid A</i> subjected to Giemsa staining, G-banding, and C-banding | 102 |
| Figura 7 – Karyotypes of <i>hybrid A</i> subjected to FISH using 5S and 18S rDNAs (<i>red and green signals</i>), and (CA) ₁₅ , (GA) ₁₅ , and (GATA) ₈ microsatellites probes (<i>red signals</i>) | 103 |
| Figura 8 – Karyotypes of <i>hybrid B</i> subjected to Giemsa staining, G-banding, and C-banding | 104 |
| Figura 9 – Karyotypes of <i>hybrid B</i> subjected to FISH using 5S and 18S rDNAs (<i>red and green signals</i>), and (CA) ₁₅ , (GA) ₁₅ , and (GATA) ₈ microsatellites probes (<i>red signals</i>) | 105 |
| Figura MS.1 – Karyotypes of sea turtle species subjected to FISH using 5S (<i>red signals</i>) and 18S rDNAs (<i>green signals</i>) | 110 |

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Informações sobre as espécies analisadas: número de indivíduos, instituições parceiras, condição de vida dos animais e locais de coleta | 41 |
| Tabela 2 – Relação de <i>primers</i> utilizados nas ampliações das sequências de rDNA, mtDNA e nucDNA com as respectivas referências | 46 |

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| Tabela MS.1 – Data of the sea turtle species sampled in Brazilian coast or obtained in captive condition | 75 |
|--|----|

CAPÍTULO II

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 – Primer sequences used to amplify the rDNAs, mitochondrial and nuclear sequences with annealing temperatures and respective references | 82 |
| Tabela 2 – Head scales and carapace scutes numbers for <i>C. caretta</i> , <i>C. mydas</i> , <i>E. imbricata</i> , <i>L. olivacea</i> and <i>Hybrids A</i> and <i>B</i> | 85 |
| Tabela MS.1 – Data of the sea turtle pure and hybrid species sampled in Brazilian coast or obtained in captive/rehab condition..... | 111 |
| Tabela MS.2 – mtDNA and nucDNA sequences from pure species of <i>C. mydas</i> , <i>C. caretta</i> , <i>E. imbricata</i> and <i>L. olivacea</i> from GenBank | 112 |
| Tabela MS.3 – Diversity indices for each analyzed gene in the four pure sea turtles and two possibly hybrids. N: number of sequences; h: number of haplotypes; S: polymorphic sites; hd: haplotype diversity; π : nucleotide diversity..... | 113 |
| Tabela MS.4 – Most resolute parsimony informative sites for nucDNAs to identify hybrids between sea turtles..... | 113 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- °C - Graus Celsius;
- μL - Microlitro;
- μM – Micromolar;
- 2n – Número diploide;
- 11-dUTP - Digoxigenin -11-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate tetralithium salt;
- 16-dUTP - Biotin-16-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate;
- 12S mtDNA – Ácido desoxiribonucleico mitocondrial 12S;
- 16S mtDNA - Ácido desoxiribonucleico mitocondrial 16S;
- 18S rDNA - Ácido desoxiribonucleico ribossômico 18S;
- 5S rDNA - Ácido desoxiribonucleico ribossômico 5S;
- 18S rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico 18S;
- 45S rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico 45S;
- 5S rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico 5S;
- Ba(OH)₂ – Hidróxido de bário;
- BDNF - *Brain-derived neurotrophic factor*;
- Cmos - *Oocyte maturation fator*;
- CR – Criticamente em perigo;
- Cy5 – Cianina 5;
- DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*;
- DNA - Ácido Desoxiribonucleico;
- dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados;
- Dmrt1 - *Doublesex and mab-3-related transcription factor 1*;
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético;
- EM – Em perigo;
- FISH - Hibridação *in situ* fluorescente;
- gr - Gramas;
- HCl – Ácido clorídrico;
- ITS – Sítio telomérico intersticial;
- KCl – Cloreto de potássio;
- M- Molar;
- Mc – Microcromossomo;
- ml – Mililitro;

mM – Milimolar;
MgCl₂ - Cloreto de Magnésio;
min - Minuto;
mtDNA – DNA mitocondrial;
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*;
NF – Número fundamental;
ng - Nanogramas;
NOR - Região Organizadora de Nucléolo;
nucDNA – DNA nuclear;
pb - Pares de base;
PBS – Tampão fosfato salino;
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase;
pH – Potencial hidrogeniônico;
pM - Picomol;
rDNA - DNA ribossomal;
R35 - *RNA fingerprint protein 35*;
Rpm – Rotações por minuto;
RNA - Ácido Ribonucleico;
rRNA – RNA ribossômico;
s - Segundo;
S - Sul;
SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms*;
SSC – Citrato de Sódio Salino;
SSR - *Simple Sequence Repeats*;
TE - Elemento Transponível;
TSD - *temperature-dependent sex determination*
U – Unidade;
VNTR - *Variable Number of Tandem Repeats*;
VU – Vulnerável;
W – Oeste.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 20 |
| 1.1.1 | Tartarugas marinhas | 20 |
| 1.1.1.1 | <i>Chelonia mydas</i> | 24 |
| 1.1.1.2 | <i>Caretta caretta</i> | 25 |
| 1.1.1.3 | <i>Eretmochelys imbricata</i> | 26 |
| 1.1.1.4 | <i>Lepidochelys olivacea</i> | 27 |
| 1.1.2 | Hibridações entre espécies da família Cheloniidae..... | 28 |
| 1.1.3 | Estudos genéticos aplicados a tartarugas marinhas..... | 31 |
| 1.1.4 | Citogenética de tartarugas marinhas..... | 33 |
| 1.1.5 | DNAs repetitivos..... | 34 |
| 1.2 | JUSTIFICATIVA..... | 38 |
| 2 | OBJETIVOS | 39 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 39 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 39 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 40 |
| 3.1 | MATERIAL BIOLÓGICO E LOCAIS DE COLETA | 40 |
| 3.2 | MÉTODOS..... | 42 |
| 3.2.1 | Análise morfológica | 42 |
| 3.2.2 | Coleta de sangue periférico | 43 |
| 3.2.3 | Cultivo temporário de linfócitos..... | 43 |
| 3.2.4 | Bandamento C | 44 |
| 3.2.5 | Bandamento G..... | 45 |
| 3.2.6 | Extração de DNA genômico..... | 45 |
| 3.2.7 | Amplificação de sequências por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) | 46 |
| 3.2.8 | Purificação de fragmentos de DNA..... | 47 |
| 3.2.9 | Sequenciamento e análise das sequências | 47 |
| 3.2.10 | Análise molecular dos híbridos | 47 |
| 3.2.11 | Marcação de sondas..... | 48 |
| 3.2.12 | Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) | 48 |
| 3.2.13 | Organização dos cariótipos | 49 |
| 4 | RESULTADOS..... | 50 |

| | | |
|-------|---|------------|
| 4.1 | CAPÍTULO I - Heterochromatin and microsatellites detection in karyotypes of four sea turtle species: Interspecific chromosomal differences | 52 |
| 4.1.1 | Abstract | 53 |
| 4.1.2 | Introduction | 54 |
| 4.1.3 | Material and Methods..... | 56 |
| 4.1.4 | Results | 57 |
| 4.1.5 | Discussion | 58 |
| 4.1.6 | References | 62 |
| 4.1.7 | Supplementary material..... | 75 |
| 4.2 | CAPÍTULO II – Integrating morphological, cytogenetic, and molecular data for F2 sea turtle hybrids diagnosis revealed apparently balanced chromosomal sets . Erro! Indicador não definido. | |
| 4.2.1 | Abstract | 78 |
| 4.2.2 | Introduction | 79 |
| 4.2.3 | Material and Methods..... | 81 |
| 4.2.4 | Results | 84 |
| 4.2.5 | Discussion | 87 |
| 4.2.6 | References | 92 |
| 4.2.7 | Supplementary material..... | 106 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 114 |
| | REFERÊNCIAS | 116 |

1 INTRODUÇÃO

As tartarugas marinhas nadam pelos oceanos desde o Cretáceo, há cerca de 200 milhões de anos, sendo parte essencial dos ecossistemas marinhos (PRITCHARD, 1997) e espécies consideradas bandeira para a conservação da biodiversidade. Atualmente, são encontradas sete espécies de tartarugas marinhas no mundo, migrando pelos oceanos desde o Ártico até a Tasmânia, são elas: *Dermochelys coriacea*, *Chelonia mydas*, *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea*, *Lepidochelys kempii* e *Natator depressus*, apenas as duas últimas não são encontradas em águas brasileiras (PRITCHARD, 1997; BAPTISTOTTE et al., 2003; SANTOS et al., 2011a).

Hibridização entre tartarugas marinhas são registradas ao redor do mundo, porém na costa brasileira encontra-se a maior taxa de hibridização entre as espécies (LARA-RUIZ et al., 2006). Devido a sobreposição de temporadas reprodutivas e a superexploração das espécies no passado, no estado da Bahia híbridos entre *E. imbricata* e *C. caretta* são comumente encontrados (ALLENDORF et al., 2001; LARA-RUIZ et al. 2006; VILAÇA et al., 2012; PROIETTI et al., 2014). Ainda não se compreende completamente o efeito à longo prazo da hibridização para essas espécies (LARA-RUIZ et al., 2006; REIS et al. 2010a, 2010b; VILAÇA et al., 2012; VILAÇA e SANTOS, 2013; PROIETTI et al., 2014; SOARES et al., 2017, 2018; ARANTES et al., 2020a, 2020b). Sendo assim, estudos genéticos são necessários e podem combinar o uso de marcadores moleculares herdados biparentalmente (VILAÇA et al., 2012; VILAÇA e SANTOS, 2013) com a citogenética. O entendimento dos mecanismos meióticos da hibridação propiciado pela citogenética é de extrema importância tendo em vista que conjuntos cromossômicos diferentes são um dos fatores que podem gerar gametas desbalanceados e prevenir a introgressão genética (NAVARRO e BARTON, 2003; FARIA e NAVARRO, 2010).

A citogenética de tartarugas marinhas vem se mostrando um campo de estudos promissor e que ainda deve ser muito explorado. Estudos de citogenética molecular se mostraram promissores quando utilizando diferentes marcadores cromossômicos, permitindo a identificação de variação da distribuição de marcadores genéticos entre os cariótipos, demonstrando que os cariótipos não estão conservados como se pensava até então (MACHADO et al., 2020). Esses resultados mostram a importância de estudos citogenéticos para o grupo envolvendo marcadores cromossômicos de DNAs repetitivos, sabendo que estes podem ser específicos ou compartilhados entre as espécies, o que permite o reconhecimento microestrutural dos cromossomos e podem ser aplicados na identificação de cariótipos híbridos.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

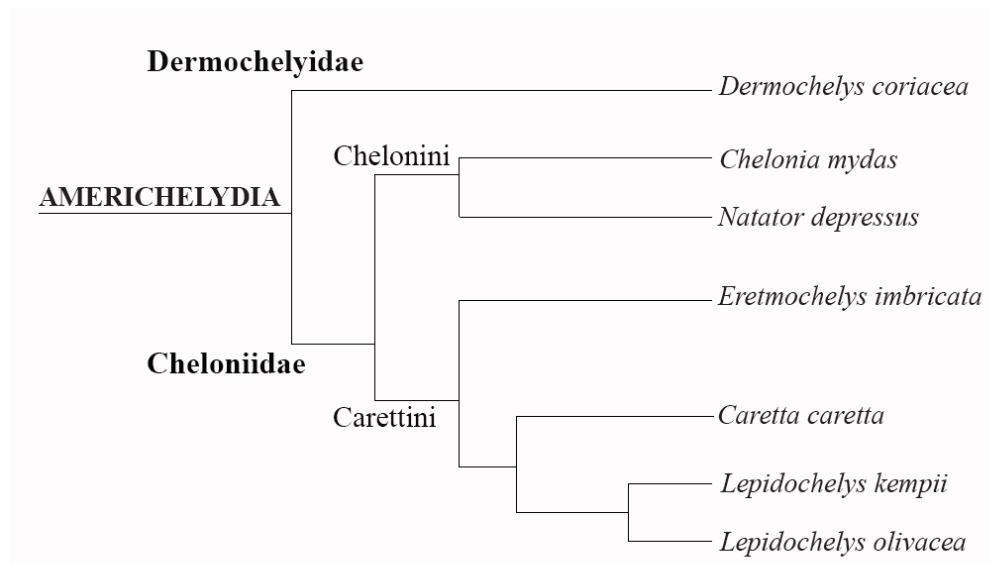
1.1.1 Tartarugas marinhas

As tartarugas marinhas são répteis pertencentes a grande classe Reptilia, subclasse Anapsida (caracterizada por animais que possuem crânio sem aberturas temporais), se encontram dentro da ordem Testudines e da subordem Cryptodira (HICKMAN, 2004). Representam um componente primitivo e singular da diversidade biológica, pertencendo à mais antiga linhagem de répteis vivos (PRITCHARD, 1997). Habitam os oceanos desde o Cretáceo, há aproximadamente 100 milhões de anos, onde estavam presentes quatro famílias de tartarugas marinhas: Toxochelyidae, Protostegidae, Cheloniidae e Dermochelyidae, sendo que apenas as duas últimas permaneceram até os dias de hoje. Todos os gêneros e espécies existentes atualmente surgiram no período Eocênico e Pleistocênico, entre 60 milhões e 10 milhões de anos atrás (HIRAYAMA, 1998; NARO-MACIEL et al., 2008; SANTOS et al., 2011a).

Neste momento evolutivo são reconhecidas sete espécies de tartarugas marinhas no mundo, divididas em duas famílias: Dermochelyidae e Cheloniidae (MEYLAN e MEYLAN 1999). A tartaruga-de-couro, *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1971) é a única espécie atual de Dermochelyidea, enquanto em Cheloniidae são reconhecidas seis espécies classificadas em cinco gêneros: a tartaruga-verde, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758); a tartaruga-cabeçuda, *Caretta caretta* (Linnaeus, 1958); a tartaruga-de-pente, *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766); a tartaruga-oliva, *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829); a tartaruga-de-kempii, *Lepidochelys kempii* (Garman, 1880) e a tartaruga-australiana, *Natator depressus* (Garman, 1880) (PRITCHARD, 1997). As tartarugas-de-couro, verde, cabeçuda, de-pente e oliva ocorrem em águas brasileiras (BAPTISTOTTE et al., 2003), as outras duas espécies são endêmicas de diferentes partes do mundo, a tartaruga-de-kempii se distribui entre o noroeste do oceano Atlântico, Golfo do México e Caribe, e a tartaruga-australiana está restrita a plataforma continental da Austrália, sul da Indonésia e Papua Nova Guiné (PRITCHARD, 1997).

Análises filogenéticas demonstram que Dermochelyidae e Cheloniidae divergiram da linhagem ancestral de Americhelydia durante o Cretáceo e *Dermochelys* aparece como grupo basal e irmão da família Cheloniidae (Figura 1) (IVERSON et al., 2007; NARO-MACIEL et al., 2008; VALENZUELA e ADAMS, 2011; MONTIEL et al., 2016; PEREIRA et al., 2017). Dentro de Cheloniidae são reconhecidas duas tribos: Chelonini, que apresenta a espécie *N. depressus* como grupo irmão do gênero *Chelonia* e Carettonini, formada por *E. imbricata*, *C. caretta*, *L. kempii* e *L. olivacea*, sendo o relacionamento entre as duas últimas espécies bem sustentado (BOWEN, 1993; BOWEN e KARL, 2007; IVERSON et al., 2007; NARO-MACIEL et al., 2008).

Figura 1. Cladograma representativo das relações filogenéticas entre as espécies de tartarugas marinhas.



Fonte: Adaptado de Naro-Maciel et al. (2008) e Pereira et al. (2017).

As tartarugas marinhas são animais considerados altamente derivados morfológicamente por possuírem diversas adaptações para a vida no mar, tais como membros em forma de nadadeiras, glândulas lacrimais grandes e modificadas para remover o excesso de sal do corpo e carapaça com quantidade reduzida de ossos (número de vértebras reduzido e fusionadas com as costelas) e hidrodinâmica facilitando seu deslocamento (MEYLAN e MEYLAN, 1999). São animais que possuem um complexo ciclo de vida, passando sua vida migrando por centenas a milhares de quilômetros entre as áreas de alimentação e desova (BOWEN et al., 1995). Tanto os indivíduos adultos quanto os filhotes e juvenis, parecem utilizar o campo magnético terrestre para guiarem-se durante essas migrações (LOHMANN, 2007).

A maior parte das ocorrências reprodutivas está concentrada em regiões tropicais e subtropicais (SANTOS et al., 2011a). Nas áreas reprodutivas os filhotes eclodem dos ovos simultaneamente, emergem dos ninhos e correm em direção ao oceano dando início a um frenesi de natação, utilizando correntes marítimas, em direção a ambientes pelágicos (BOWEN e KARL, 2007). Durante o percurso ninho-mar, características químicas e físicas da praia natal são registradas pelos filhotes, fenômeno conhecido como “*imprinting*” e, possivelmente tais sinais sejam responsáveis pelo retorno, anos mais tarde, como adultos em idade reprodutiva, para acasalar na mesma praia em que nasceram (LOHMANN et al., 1997, 2001). Durante a fase de vida oceânica, conhecida como “anos perdidos” (CARR et al., 1978), os filhotes

permanecem boiando passivamente nos maiores sistemas de correntes (giros oceânicos), que servem como áreas de desenvolvimento em mar aberto, e sabe-se muito pouco a respeito dos hábitos alimentares, comportamento e desenvolvimento destes animais durante esta etapa do ciclo de vida (BOWEN et al., 1995; LAHANAS et al., 1998). Após este período são recrutados para áreas neríticas de desenvolvimento, como juvenis (LAHANAS et al., 1998). Ao longo do seu desenvolvimento, durante um período de aproximadamente 20 anos, ocupam a zona pelágica nerítica ou oceânica e quando adultos, entre 20-50 anos, migram para as áreas de reprodução onde, após um intervalo de duas semanas, as fêmeas migram para as áreas de nidificação e os machos retornam às áreas de alimentação (LUTZ, 1997).

Apresentam maturação tardia e ciclo de vida longo, demorando de 10 a 40 anos para atingirem a maturidade sexual (MEYLAN e DONNELLY, 1999). O período de postura dos ovos varia de acordo com a região e a espécie, no Brasil a temporada de desovas vai de setembro a abril nas praias do continente e de dezembro a junho nas ilhas oceânicas (SANTOS et al., 2011a). Os ninhos são escavados pela fêmea, com as nadadeiras traseiras, e são depositados entre 100 e 120 ovos em cada um deles (MILLER, 1997; SANTOS et al., 2011a). Após a deposição, a fêmea recobre de areia o ninho e retorna à água, onde permanece até a maturação dos outros ovos para então retornar à areia e construir um novo ninho, sendo que o número de ninhos a cada temporada reprodutiva varia entre três e sete, dependendo da região e de cada indivíduo (FORMIA et al., 2006). Porém, a mortalidade de filhotes e juvenis é alta, sendo que a cada 1.000 ovos aproximadamente um filhote sobrevive até a fase adulta (FRAZER e LADNER, 1986).

Os ovos são incubados pelo calor do sol nas areias durante um período que varia entre 45 e 60 dias (MILLER, 1997). É durante esse período que o sexo dos embriões é determinado, pois as tartarugas marinhas apresentam determinação sexual dependente da temperatura de incubação (TSD - *temperature-dependent sex determination*), não havendo cromossomos sexuais heteromórficos nestas espécies (BICKHAM et al., 1980; MORREALE et al., 1982; YNTEMA e MROSOVSKY, 1982; MROSOVSKY et al., 1984, 1992; VALENZUELA e ADAMS, 2011; MONTIEL et al., 2016). Nesse caso, a expressão de genes como o *Dmrt1* (*Doublesex and mab-3-related transcription factor 1*) aumenta durante o período termo-sensitivo (segundo terço do desenvolvimento embrionário) em machos e permanece baixo em fêmeas atuando na síntese de enzimas envolvidas na diferenciação das gônadas (BULL e VOGT, 1979; PIEAU, 1996; KETTLEWELL et al., 2000; MURDOCK e WIBBELS, 2003; MIZOGUCHI e VALENZUELA, 2020). Nas tartarugas marinhas, temperaturas mais altas produzem fêmeas e mais baixas machos, sendo que a temperatura limite para a definição do

sexo, conhecida como temperatura pivotal, varia de acordo com a espécie (MARCOVALDI et al., 1997; FERREIRA JÚNIOR, 2009). No entanto, animais com TSD sofrem influência direta do aquecimento global, o que pode gerar consequências fatais para a manutenção destas espécies decorrentes do desequilíbrio na razão sexual por conta da alteração da temperatura nas áreas de desova (WEISHAMPELL et al., 2004; HAWKES et al., 2007).

Estudos de marcação e recaptura mostraram que as fêmeas maduras retornam com alta fidelidade à mesma praia de desova em sucessivas estações reprodutivas (ALLARD et al., 1994; KARL et al., 1995; BOWEN e KARL, 2007). Da fidelidade ao sítio de desova surgiu a hipótese de *natal homing*, onde as fêmeas de tartarugas marinhas sempre retornariam à praia de nascimento para desovar (CARR e HIRTH, 1961). Outra hipótese é de que as fêmeas menos experientes seguiriam as fêmeas maduras até uma praia de nidificação e então se fixariam neste local para futuras desovas (hipótese da facilitação social) (OWENS et al., 1982). A hipótese de *natal homing* ficou comprovada pela alta filopatria das fêmeas revelada através de padrões de estruturação populacional para o DNA mitocondrial (mtDNA) nas praias de desova (MEYLAN et al., 1990; ALLARD et al., 1994; JENSEN et al., 2013). No entanto, dados recentes mostram que as fêmeas não são sempre fiéis ao sítio de nascimento como se pensava anteriormente, pois existe uma mistura genética entre linhagens maternas com origens distintas, mostrando que nem sempre todas as fêmeas voltam às praias que nasceram para desovar ou não surgiriam novos locais de nidificação (VARGAS et al., 2016).

As populações de tartarugas marinhas têm sofrido reduções drásticas nas últimas décadas e todas as espécies encontram-se ameaçadas de extinção em diferentes níveis (IUCN, 2021). Infelizmente, isso se deve principalmente à ação antropogênica, a qual inclui sua predação direta para o consumo de carne, ovos e carapaça, que é utilizada na fabricação de diversos artefatos como berços, joias, enfeites, entre outros (SANTOS et al., 2011a). Além disso, ameaças indiretas agravam essa situação, como a perda de habitats costeiro e marinho, causada pela poluição e a degradação ambiental, onde restos de linhas e redes de pesca, plástico e isopor afetam esses animais em todas as fases de seu ciclo de vida (DERRAIK, 2002). A poluição marinha é uma grave ameaça, pois as tartarugas marinhas podem se enrolar em materiais descartados de pesca ou ingerirem material plástico, o que pode gerar asfíxia, fecalomas (endurecimento de fezes no intestino e colón) e uma falsa sensação de saciedade, podendo levar o animal à óbito (SCHUYLER et al., 2014).

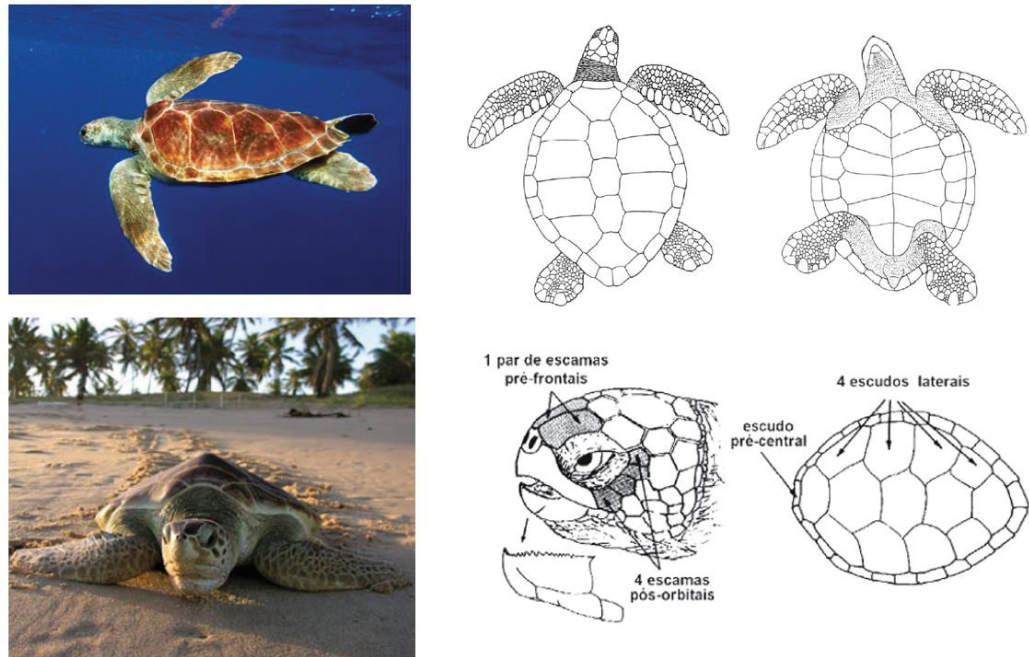
O desenvolvimento costeiro afeta diretamente esses animais, através da iluminação à beira mar que desorienta fêmeas em desova e filhotes, a extração de areia que altera as características de incubação impedindo desenvolvimento dos filhotes e o tráfego de veículos

que causa a compactação da areia, atropelamentos e destruição de ninhos (LUTCAVAGE et al., 1997; SANTOS et al., 2011a). Atualmente, a captura incidental pela pesca é responsável pelos maiores índices de mortalidade de tartarugas marinhas em todo o mundo (HAMANN et al., 2010).

1.1.1.1 *Chelonia mydas*

A tartaruga-verde, também conhecida como aruanã, é classificada como espécie vulnerável (VU) no Brasil (ALMEIDA et al., 2011). Esse nome não se deve a coloração exibida por seu corpo ou carapaça, mas sim pela tonalidade esverdeada apresentada por sua gordura (WYNEKEN, 2001). Sua carapaça exibe tons de verde, oliva e marrom apresentando manchas ou padrões rajados, seu plastrão é branco ou amarelo claro e a pele usualmente é cinza ou marrom (WYNEKEN, 2001; FORMIA et al., 2006). Algumas das características utilizadas para identificação morfológica dessa espécie são a presença de quatro pares de placas laterais e cinco placas vertebrais na carapaça, e na cabeça um único par de placas pré-frontais e quatro placas pós-orbitais (Figura 2) (PRITCHARD e MORTIMER, 1999; WYNEKEN, 2001). São onívoras nos primeiros anos de vida e depois adotam dieta exclusivamente herbívora (ALMEIDA et al., 2011). Quando adultas chegam a alcançar 230 kg e até 1,50 m de comprimento curvilíneo da carapaça, sendo a maior espécie entre as tartarugas de carapaça óssea (PRITCHARD e MORTIMER, 1999). *Chelonia mydas* atinge a maturidade sexual entre 26 e 40 anos e no Brasil as áreas prioritárias de desova estão localizadas em ilhas oceânicas: Ilha da Trindade (Estado do Espírito Santo), Atol das Rocas (Estado do Rio Grande do Norte) e Fernando de Noronha (Estado de Pernambuco) (ALMEIDA et al., 2011). A principal ameaça à *C. mydas* é o aumento da atividade pesqueira que atinge diretamente a população de juvenis, principalmente as atividades de pesca costeira (ALMEIDA et al., 2011). Além disso, essa espécie é atingida pela fibropapilomatose, uma doença de origem infecciosa que pode levar à morte e se caracteriza por múltiplas massas de tumores cutâneos, internos ou externos, que pode estar associada à fatores como poluição e aquecimento das águas (AGUIRRE, 1998; FOLEY et al., 2005; ALMEIDA et al., 2011).

Figura 2. Fotos de espécimes de *Chelonia mydas* e esquema de identificação morfológica da espécie focando nas placas da cabeça, carapaça e plastrão.

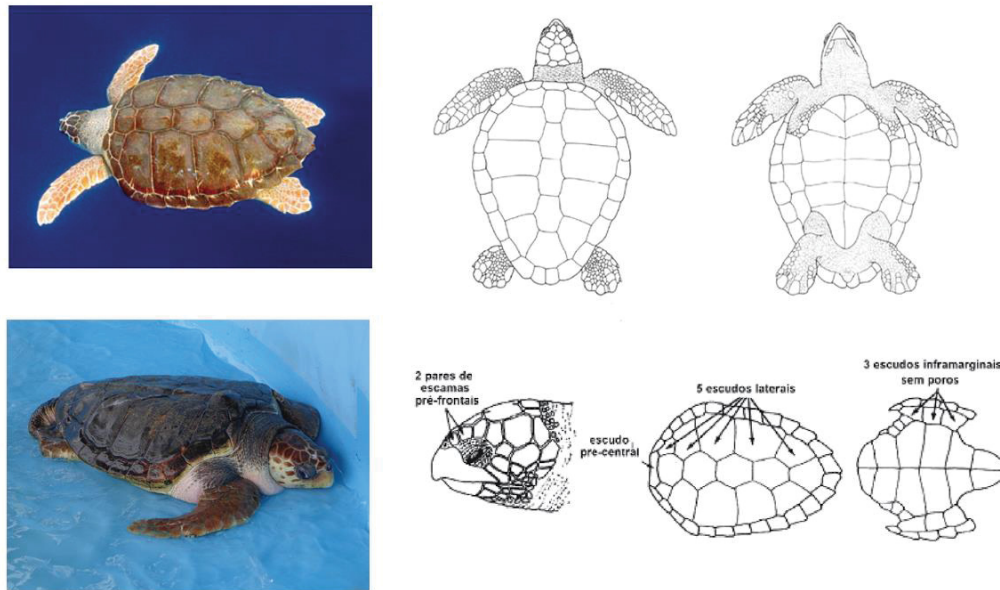


Fonte: Almeida et al. (2011), Pritchard e Mortimer (1999) e Marquéz (1990).

1.1.1.2 *Caretta caretta*

A tartaruga-cabeçuda ou avó-de-aruana é considerada como em perigo (EN) no Brasil (SANTOS et al., 2011b). Possui esse nome por conta do tamanho da cabeça, que é grande e relativamente desproporcional ao corpo, sua coloração é marrom-amarelada e o ventre é amarelo claro (MÁRQUEZ, 1990). A carapaça possui cinco pares de placas laterais, sendo que as placas são justapostas e a cabeça possui dois pares de placas pré-frontais e três pares de placas pós-orbitais (Figura 3) (PRITCHARD e MORTIMER, 1999; WYNEKEN, 2001). Essa espécie apresenta uma dieta carnívora durante toda a sua vida (BJORNDAL, 1997). *Caretta caretta* atinge a maturidade sexual entre 25 e 35 anos e no Brasil as áreas prioritárias de desova estão localizadas no norte da Bahia, Espírito Santo, norte do Rio de Janeiro e Sergipe (SANTOS et al., 2011b). No passado essa espécie foi muito ameaçada pela coleta de ovos e o abate de fêmeas, o que felizmente não acontece mais nas áreas prioritárias de reprodução devido a estratégias de conservação (SANTOS et al., 2011b). Atualmente, a principal ameaça é o aumento da atividade pesqueira que atinge as populações (SANTOS et al., 2011b).

Figura 3. Fotos de espécimes de *Caretta caretta* e esquema de identificação morfológica da espécie focando nas placas da cabeça, carapaça e plastrão.



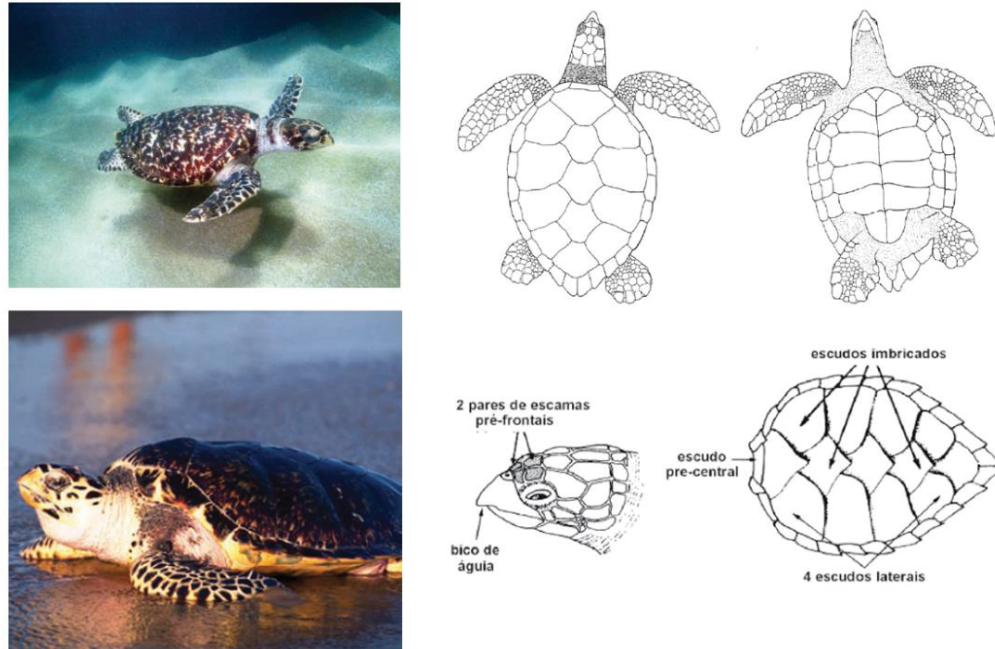
Fonte: O autor (2017), Santos et al. (2011), Pritchard e Mortimer (1999) e Marquéz (1990).

1.1.1.3 *Eretmochelys imbricata*

A tartaruga-de-pente ou tartaruga-verdadeira é classificada como criticamente em perigo (CR) no Brasil (MARCOVALDI et al., 2011). Recebe esse nome porque antigamente faziam pente com sua carapaça, a qual é de coloração marrom com margens serrilhadas e seu ventre é amarelo claro (MÁRQUEZ, 1990; ICMBio, 2021). É reconhecida por apresentar em sua carapaça quatro pares de placas laterais, sendo que estas são sobrepostas (imbricadas) e a cabeça possui dois pares de placas pré-frontais e três pós-orbitais (Figura 4) (PRITCHARD e MORTIMER, 1999; WYNEKEN, 2001). Essa espécie se alimenta principalmente em locais com substratos duros, como recifes, sendo suas presas crustáceos, moluscos, briozoários, celenterados, ouriços, esponjas e algas (SANCHES e BELLINI, 1999). *Eretmochelys imbricata* atinge a maturidade sexual entre 25 e 35 anos e no Brasil as áreas de desova distribuem-se desde o Espírito Santo ao Ceará, sendo que desovas regulares se encontram no litoral norte da Bahia e Sergipe, e no litoral sul do Rio Grande do Norte (MARCOVALDI et al., 2011). A principal ameaça para *E. imbricata* no passado foi a coleta de ovos e o abate de fêmeas, principalmente para exploração e comércio da carapaça para, por exemplo, confecção de joias (SANTOS et al., 2011a). Atualmente essa espécie é ameaçada pela captura incidental em atividades de pesca

costeira, principalmente redes de emalhe (MARCOVALDI et al., 2011).

Figura 4. Fotos de espécimes de *Eretmochelys imbricata* e esquema de identificação morfológica da espécie focando nas placas da cabeça, carapaça e plastrão.



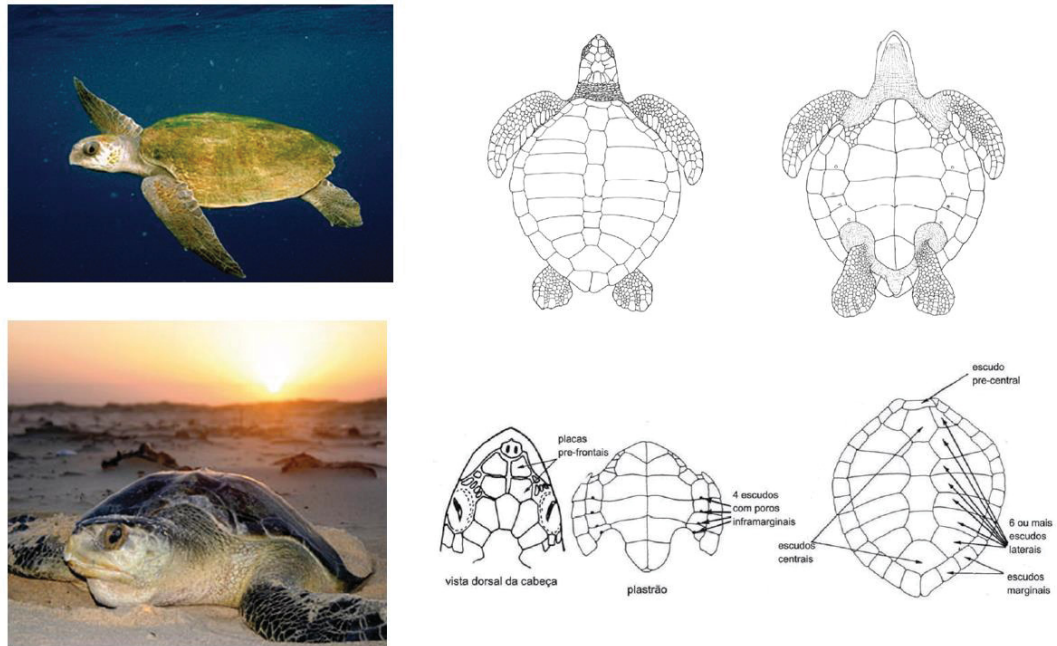
Fonte: Marcovaldi et al. (2011), Pritchard e Mortimer (1999) e Marquéz (1990).

1.1.1.4 *Lepidochelys olivacea*

A tartaruga-oliva ou tartaruga-pequena é considerada como em perigo (EN) no Brasil (CASTILHOS et al., 2011). É a menor das espécies que ocorrem na costa brasileira e recebe esse nome pela coloração da sua carapaça que é verde oliva e seu ventre é amarelo claro (MÁRQUEZ, 1990; SANTOS et al., 2011a). É identificada morfológicamente por apresentar na carapaça de cinco a nove pares (normalmente seis) de placas laterais e na cabeça dois pares de placas pré-frontais e três pares pós-orbitais (Figura 5) (PRITCHARD e MORTIMER, 1999; WYNEKEN, 2001). Essa espécie é carnívora e se alimenta de salpas, peixes, moluscos, crustáceos, briozoários, tunicados, águas-vivas, ovos de peixe e eventualmente algas (SANTOS et al., 2011a). *Lepidochelys olivacea* atinge a maturidade sexual entre 10 e 18 anos e no Brasil a área prioritária de desova está localizada entre o litoral sul do Alagoas e o litoral norte da Bahia, com maior densidade de desovas no estado de Sergipe (CASTILHOS et al., 2011). Algumas populações de *L. olivacea* apresentam comportamento reprodutivo distinto, onde as fêmeas podem emergir em massa e de forma sincronizada para desovar, comportamento

denominado de *arribada*, as quais ocorrem em praias da Índia, México e Costa Rica (KALB, 1999). A captura incidental representa uma das principais ameaças a essa espécie, especialmente redes de arrasto utilizadas na pesca do camarão (CASTILHOS et al., 2011).

Figura 5. Fotos de espécimes de *Lepidochelys olivacea* e esquema de identificação morfológica da espécie focando nas placas da cabeça, carapaça e plastrão.



Fonte: Castilhos et al. (2011), Pritchard e Mortimer (1999) e Marquéz (1990).

1.1.2 Híbridizações entre espécies da família Cheloniidae

O processo de hibridização pode ser definido como o acasalamento entre indivíduos geneticamente distintos, ou seja, entre espécies ou até mesmo subespécies diferentes, acarretando a mistura de genes que até então estavam isolados nessas populações (HARRISON, 1993; RHYMER e SIMBERLOFF, 1996; HARRISON e LARSON, 2014; PIETT et al., 2015; BÉRUBÉ e PALSBOOL, 2018). O sucesso do acasalamento entre duas espécies diferentes pode resultar em híbridos de primeira geração (F1), os quais podem acasalar e produzir híbridos de segunda geração (F2) e ainda, os híbridos podem acasalar com as espécies parentais puras, resultando em retrocruzamentos (PURVES et al., 2001; PIETT et al., 2015). Por conta da mistura de conjuntos gênicos diferentes, o processo de hibridização pode levar à introgressão, quando alelos de uma espécie são incorporados ao conjunto genético de uma espécie diferente (RHYMER e SIMBERLOFF, 1996; VILAÇA et al., 2012).

É comum que híbridos sejam inviáveis ou inférteis, quando as espécies parentais costumam não acasalar (MAYR, 1963), porém espécies que comumente hibridizam podem produzir híbridos viáveis e até mesmo férteis, podendo levar a perda do isolamento reprodutivo das espécies parentais (LEHMAN et al., 1991; RHYMER e SIMBERLOFF, 1996; ALLENDORF et al., 2001; ABBOTT et al., 2013; BÉRUBÉ e PALSOLL, 2018). Sendo assim, o processo de hibridização pode ser considerado tanto negativo, quando contribui para a perda da diversidade genética e até mesmo extinção de espécies, e positivo, quando contribui para a adaptação das espécies, recupera populações ameaçadas e preserva a biodiversidade (PEKKALA et al., 2012; PIETT et al., 2015).

A ocorrência de hibridação natural entre espécies de tartarugas marinhas da família Cheloniidae têm sido relatada em várias áreas do mundo, entre *E. imbricata* e *C. caretta* (CONCEIÇÃO et al., 1990; KARL et al., 1995; LARA-RUIZ et al., 2006; VILAÇA et al., 2012; VILAÇA e SANTOS, 2013), *C. mydas* e *C. caretta* (KARL et al., 1995; JAMES et al., 2004), *E. imbricata* e *L. olivacea* (LARA-RUIZ et al., 2006; VILAÇA et al., 2012, VILAÇA e SANTOS, 2013), *C. caretta* e *L. kempii* (KARL et al., 1995; BARBER et al., 2003), *C. mydas* e *E. imbricata* (Figura 6) (WOOD et al., 1983; KARL et al., 1995; SEMINOFF et al., 2003; VILAÇA e SANTOS, 2013), *C. caretta* e *L. olivacea* (Figura 6) (REIS et al., 2010a, 2010b; VILAÇA et al., 2012; VILAÇA e SANTOS, 2013), e até mesmo entre mais de duas espécies: *C. mydas* × *E. imbricata* × *C. caretta* (VILAÇA et al., 2012; VILAÇA e SANTOS, 2013). Anteriormente, a identificação e descrição desses híbridos era baseada somente em características morfológicas intermediárias de duas espécies (WOOD et al., 1983). No entanto, com o avanço dos estudos e desenvolvimento de novas técnicas, esses híbridos passaram a ser identificados através de marcadores moleculares (mtDNA, microssatélites e nucDNA), que permitem confirmar as espécies envolvidas e avaliar a extensão desses eventos de hibridização (LARA-RUIZ et al., 2006, VILAÇA et al., 2012; VILAÇA e SANTOS, 2013; ARANTES et al., 2020a, 2020b).

Na costa brasileira, especificamente no litoral do estado da Bahia, observa-se uma frequência excepcionalmente alta (42%) de híbridos entre *E. imbricata* e *C. caretta*, onde as tartarugas híbridas apresentam morfologia de tartarugas-de-pente, mas análises genéticas revelaram mtDNA de tartarugas-cabeçudas (LARA-RUIZ et al., 2006). Como o mtDNA é herdado maternamente, isso significa que a prole é resultado do cruzamento de uma fêmea cabeçuda com um macho de-pente (LARA-RUIZ et al., 2006). Ainda, foi observado que esses híbridos apesar de serem mais próximos morfologicamente de *E. imbricata* apresentaram comportamento semelhante à *C. caretta*, inclusive utilizando áreas de alimentação

características da espécie (PROIETTI et al., 2014). Na Bahia, existe uma sobreposição da temporada de reprodução dessas duas espécies fazendo com que estas se encontrem nas áreas de desova, o que possibilita o acasalamento (LARA-RUIZ et al. 2006; VILAÇA et al., 2012; PROIETTI et al., 2014). As causas desta elevada taxa de hibridização ainda não são claras, mas podem estar relacionadas aos declínios populacionais devido às ações antrópicas que resultam em reduções populacionais e perda de habitats (ALLENDORF et al., 2001; LARA-RUIZ et al., 2006, VILAÇA et al., 2012).

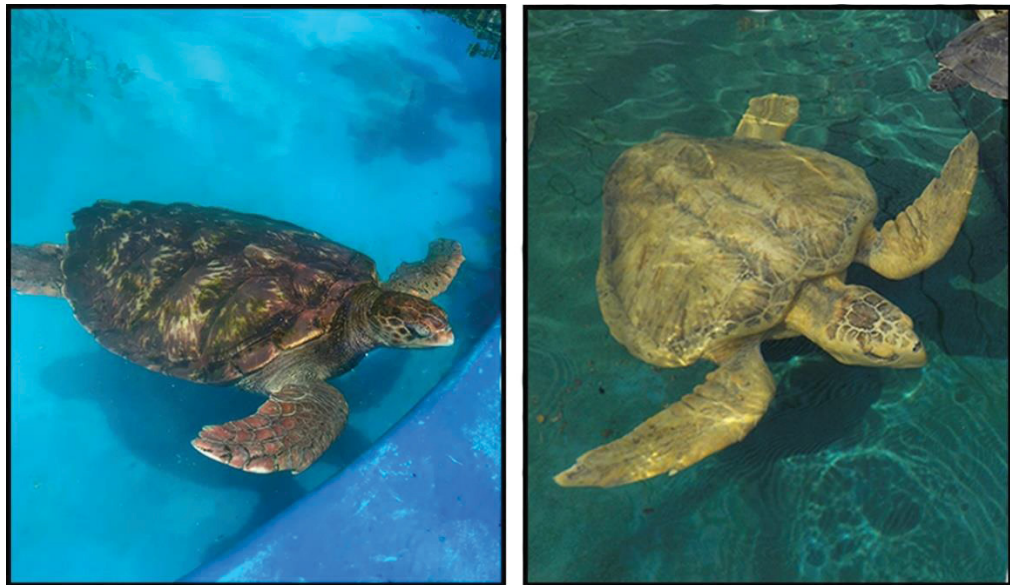
O fenômeno de hibridização foi descrito pela primeira vez no Brasil em 1990 e desde então vem sendo cada vez mais estudado, por estar ocorrendo em uma taxa atípica quando comparado ao resto do mundo e por ter suas consequências ainda pouco conhecidas (CONCEIÇÃO et al., 1990; LARA-RUIZ et al., 2006; VILAÇA et al., 2012; VILAÇA e SANTOS, 2013; ARANTES et al., 2020a, 2020b). Sabe-se que as fêmeas híbridas são reprodutivamente viáveis e produzem filhotes devido à provável inexistência de barreiras reprodutivas e às estruturas cariotípicas praticamente idênticas das espécies (BICKHAM, 1981; KARL et al., 1995; SEMINOFF et al., 2003; LARA-RUIZ et al., 2006; FUKUDA et al., 2013). Estudos têm demonstrado que a maioria dos híbridos são F1 e somente filhotes foram identificados como híbridos F2, sugerindo que ou F2 pode não sobreviver até a idade adulta ou que o evento de hibridização no Brasil ainda é recente, tendo iniciado há cerca de 20 anos atrás (VILAÇA et al., 2012; ARANTES et al., 2020a).

No caso das tartarugas marinhas, ainda não se sabe o quanto este processo pode afetar sua aptidão reprodutiva e sobrevivência (LARA-RUIZ et al., 2006; REIS et al. 2010a, 2010b; VILAÇA et al., 2012; VILAÇA e SANTOS, 2013; PROIETTI et al., 2014; SOARES et al., 2017, 2018; ARANTES et al., 2020a, 2020b). No entanto, o estabelecimento das tartarugas marinhas como espécies independentes ocorreu por milhões de anos apesar da sobreposição entre seus habitats (BOWEN et al., 1993). Acredita-se que as tartarugas marinhas sejam a mais antiga linhagem de vertebrados a hibridizar na natureza (KARL et al., 1995). Portanto, a aquisição de informações genéticas básicas, como os cariótipos, é extremamente importante no entendimento dos mecanismos meióticos da hibridação. A estrutura e o número dos cromossomos diferentes entre espécies são fatores que restringem o *crossing-over* no segmento rearranjado. Estes segmentos assinápticos podem falhar durante a segregação meiótica gerando gametas desbalanceados e, como resultado, podem evitar a introgressão genética (NAVARRO e BARTON, 2003; FARIA e NAVARRO, 2010).

Estudos genéticos são necessários e devem combinar o uso de mtDNA com marcadores herdados biparentalmente, como os nucDNA, para um melhor entendimento da distribuição,

identificação das espécies parentais e gerações (VILAÇA et al., 2012; VILAÇA e SANTOS, 2013). A presença destes híbridos pode ter implicações negativas na conservação das espécies e deve ser levado em consideração no desenvolvimento e implementação de estratégias de manejo apropriadas para estas espécies (LARA-RUIZ et al., 2006; VILAÇA et al., 2012; VILAÇA e SANTOS, 2013; PROIETTI et al., 2014; ARANTES et al., 2020a, 2020b).

Figura 6. Espécimes híbridas utilizadas no presente estudo. À esquerda *híbrido A* (provável F2 entre *C. caretta* x *E. imbricata* x *C. mydas*) e à direita *híbrido B* (provável retrocruzamento entre *C. caretta* x *L. olivacea*).



Fonte das imagens: *Híbrido A* – Fundação Projeto Tamar (2020) e *Híbrido B* – Laboratório de Ecologia e Conservação (2020).

1.1.3 Estudos genéticos aplicados a tartarugas marinhas

Os estudos genéticos são de grande importância para caracterizar a estrutura populacional de tartarugas marinhas e sua dinâmica, tendo em vista que o estudo do comportamento reprodutivo e dos padrões migratórios e de uso do habitat é muito difícil devido ao ciclo de vida desses animais (LARA-RUIZ et al., 2006). Grande parte da informação conhecida sobre a história natural das tartarugas marinhas foi produzida por estudos que utilizaram marcadores genéticos, principalmente marcadores mitocondriais, nucleares e de microssatélites (NORMAN et al., 1994; BOWEN e WITZELL, 1995; BOWEN e KARL, 1997; BOWEN, 2003).

O desenvolvimento e aplicação da genética molecular fez importantes contribuições para o entendimento da dinâmica populacional e evolução das tartarugas marinhas nas últimas décadas (JENSEN et al., 2013; KOMOROSKE et al., 2017). Estudos utilizando marcadores de

mtDNA mostraram evidências de *natal homing*, um comportamento filopátrico, nas fêmeas adultas, o que permitiu estabelecer conexões entre as áreas de alimentação e de nidificação e determinar a origem de tartarugas amostradas longe das áreas de reprodução (BASS et al., 1996, 2006; BOWEN et al., 1994, 2007; JENSEN et al., 2013). Além disso, essas ferramentas também são utilizadas em estudos de filogeografia, sistemas de acasalamento, análise de paternidade e relações de parentesco, sucesso reprodutivo, endocruzamento, comportamento migratório e hibridização (LARA-RUIZ et al., 2006; VILAÇA et al., 2012; JENSEN et al., 2013; KOMOROSKE et al., 2017; ARANTES et al., 2020a, 2020b).

A taxonomia das tartarugas marinhas só foi bem resolvida com o uso de marcadores nucleares e mitocondriais, os quais permitiram a separação da família Cheloniidae em duas tribos, determinar a proximidade entre as espécies e estabelecer diferentes haplótipos para o gênero *Chelonia* nos oceanos Atlântico e Pacífico, o que no passado chegou a ser considerado como uma subespécie dentro do gênero (*Chelonia agassizii*) (PARHAM e ZUG, 1996; NARO-MACIEL et al., 2008; DUCHÊNE et al., 2012). Já para a delimitação de populações, a aplicação de mtDNA é utilizada, tendo em vista que a filopatria das fêmeas é um elemento-chave na determinação dos limites populacionais em espécies de tartarugas marinhas (JENSEN et al., 2013; KOMOROSKE et al., 2017). No entanto, os marcadores de mtDNA, por serem marcadores herdados maternalmente, só esclarecem a contribuição feminina e podem não ter tanto poder de resolução devido à alta taxa de evolução para genes mitocondriais nas tartarugas marinhas (NARO-MACIEL et al., 2008). Em contrapartida, os marcadores nucleares como por exemplo, microssatélites e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), mostram também a contribuição masculina, que é essencial para delimitar populações com maior precisão (KOMOROSKE et al., 2017). A combinação do uso de mtDNA e nucDNA proporcionou uma visão mais clara sobre o fluxo gênico e os limites populacionais, porém os padrões diferem de acordo com a região e a espécie, por isso estudos que integram diferentes metodologias ainda são necessários (JENSEN et al., 2013; KOMOROSKE et al., 2017).

A genética das cinco espécies de tartarugas marinhas do litoral brasileiro tem se focado basicamente no uso de marcadores moleculares para observar padrões de migração e a diversidade genética dos indivíduos. Para isso tem sido utilizado marcadores mtDNA visando identificar populações que se reproduzem em diferentes partes do globo, bem como, para a identificação da linhagem materna em híbridos interespecíficos (LARA-RUIZ et al., 2006; VILAÇA et al., 2012; ARANTES et al., 2020a, 2020b). Atualmente esse é um campo ativo na pesquisa genética em tartarugas marinhas que busca dados que auxiliem no manejo das espécies para a conservação (JENSEN et al., 2013).

1.1.4 Citogenética de tartarugas marinhas

Estudos citogenéticos comparativos são escassos para espécies da ordem Testudines (CAVALCANTE et al., 2018; IANUCCI et al., 2019; CAVALCANTE et al., 2020a, 2020b; MACHADO et al., 2020). Poucos foram os estudos citogenéticos em espécies de tartarugas marinhas, os quais estavam restritos a descrição de características de citogenética clássica, como o bandamento C, bandamento G e a localização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs), ou mesmo, apenas a descrição do cariótipo das espécies (BICKHAM et al., 1980; MEDRANO et al., 1987; KAMEZAKI, 1989; KAMEZAKI, 1990; LÓPEZ et al., 2008; FUKUDA et al., 2012; FUKUDA et al., 2013). Porém, alguns autores destacam que quando se estudam espécies diferentes ou espécies com genomas altamente rearranjados, apenas o uso de marcadores citogenéticos clássicos pode não ser suficiente para esclarecer com detalhes a evolução cariotípica de um grupo (CHOWDHARY e RAUDSEPP, 2001; SCHEMBERGER et al., 2011). Com isso, o desenvolvimento de marcadores cromossômicos específicos, via citogenética molecular, permitiu avanços na compreensão de alterações na microestrutura cariotípica das espécies. Afinal, embora a citogenética clássica demonstre por meio de padrões de bandamentos uma estabilidade e conservação cromossômica, estes não são capazes de demonstrar conservação das sequências de DNA dentro dos cromossomos (WIENBERG e STANYON, 1997).

Bickham e Carr (1983) mostraram que dados cariotípicos estavam disponíveis para cerca de 55% das espécies de tartarugas da subordem Cryptodira, o que permitiu estabelecer relações evolutivas entre as famílias dessa subordem e resolver alguns problemas de classificação. Apontavam que as informações citogenéticas eram úteis para o entendimento de relações evolutivas nesse nível devido ao alto grau de conservação cariotípica encontrados à época em diferentes grupos de tartarugas (BICKHAM, 1981). Dessa forma, a aplicação de técnicas de bandamento nos cromossomos e o reconhecimento de homeologias solucionava parte das dúvidas na reconstrução da filogenia do grupo (BICKHAM e CARR, 1983).

As famílias de tartarugas marinhas Dermochelyidae e Cheloniidae foram descritas por possuírem cariótipos idênticos ($2n=56$), o que demonstra que essas duas famílias são mais relacionadas entre si do que com as outras famílias de tartarugas (BICKHAM e CARR, 1983). Ambas as famílias datam do Cretáceo, sendo consideradas ancestrais na subordem, o que ajudou na proposição do cariótipo $2n=56$ como primitivo para a subordem Cryptodira (BICKHAM e CARR, 1983). Assim, esse cariótipo $2n=56$ pode ter originado os outros cariótipos presentes em espécies dessa subordem com a ocorrência de rearranjos cromossômicos (BICKHAM e CARR, 1983). Dessa maneira, a literatura afirmava que as

tartarugas marinhas possuíam, sem exceção, um cariótipo conservado, o que sugere uma evolução adaptativa eficaz em diferentes níveis (BICKHAM, 1981).

Porém, Machado et al. (2020) realizaram o primeiro estudo de citogenética molecular comparativo entre espécies de tartarugas marinhas da família Cheloniidae, localizando *in situ* os genes de rDNA 18S e a sequência (TTAGGG)_n geral dos telômeros dos vertebrados. Neste estudo foram detectadas variações quanto a morfologia cromossômica, pequenas diferenças no padrão de bandamento dos cromossomos, além de localizar um sítio telomérico intersticial (*interstitial telomeric sequence* - ITS) nas espécies *C. mydas* e *C. caretta*, o qual não foi detectado para as outras espécies, sugerindo que as tartarugas marinhas possuem diferentes marcas espécie-específicas nos cromossomos. Estes dados demonstraram a importância do uso de métodos combinados de citogenética convencional e molecular como ferramenta para detecção de diversidade cromossômica em espécies de tartarugas marinhas (MACHADO et al., 2020). Ainda, com a averiguação do padrão de distribuição de algumas classes de DNAs repetitivos foi demonstrado que os cariótipos da família Cheloniidae não são homogêneos, como proposto em estudos anteriores, mas que possíveis mecanismos evolutivos como reposicionamentos de centrômero e acúmulo de DNAs repetitivos diferenciais atuaram na evolução cariotípica do grupo (MACHADO et al., 2020).

O estabelecimento de marcadores cromossômicos, que podem ser específicos ou compartilhados entre as espécies, permite o reconhecimento da diversidade microestrutural dos cromossomos, o que pode ser utilizado em estudos de cariótipos híbridos. A citogenética é uma ferramenta importante no reconhecimento de cariótipos híbridos, pois espécimes híbridos são resultantes da combinação de dois conjuntos cromossômicos diferentes (DOBIGNY et al., 2017; GALINDO et al., 2021). Essa combinação de conjuntos cromossômicos híbridos pode acarretar em consequências genéticas e evolutivas, a exemplo dos erros meióticos de emparelhamento, *crossing-over* e segregação levando a formação de gametas desbalanceados (DOBIGNY et al., 2017; GALINDO et al., 2021). Ainda, a manutenção de conjuntos cromossômicos balanceados em híbridos interespecíficos de geração F2 e subsequentes leva a introgressão gênica e diluição das diferenças interespecíficas, o que pode ser considerado um problema para a conservação das espécies (DOBIGNY et al., 2017; GALINDO et al., 2021).

1.1.5 DNAs repetitivos

O tamanho do genoma dos eucariotos varia entre as espécies sem relação clara com a complexidade do organismo, número de genes ou nível de ploidia (GREGORY, 2005). Essa variação se deve a acúmulo de diferentes sequências repetitivas, denominadas “DNAs

repetitivos”, que podem representar mais de 80% dos genomas eucarióticos (CHARLESWORTH et al., 1994; KIDWELL, 2002). Atualmente, se sabe que esses DNAs podem ser transcritos e exercer diferentes funções no genoma, porém durante muito tempo essas sequências eram consideradas como não codificantes, sendo chamadas de *junk DNA* (NOWAK, 1994; BIÉMONT e VIEIRA, 2006). Essas sequências podem estar envolvidas na organização estrutural e funcional do genoma, atuando na replicação e reparo do DNA, na regulação e expressão gênica, em rearranjos cromossômicos e na segregação cromossômica (KIDWELL, 2002; SHAPIRO e STERNBERG, 2005; BIÉMONT e VIEIRA, 2006). Inclusive, essas sequências repetitivas podem ser encontradas em pontos de ocorrência de rearranjos cromossômicos, sendo responsáveis pela diversidade cariotípica observada em diversos grupos animais e vegetais (KIDWELL, 2002; FRECHOTTE e PRITHAM, 2007; GONZÁLEZ e PETROV, 2012).

O DNAs repetitivo é formado por unidades de sequências idênticas ou semelhantes, que podem ser encontradas *in tandem* (lado a lado) ou dispersas pelo genoma das espécies. As sequências encontradas *in tandem* compõem o DNA satélite, minissatélites, microsatélites e algumas famílias multigênicas, enquanto as sequências dispersas são representadas pelos elementos transponíveis (HARDMAN, 1986; CHARLESWORTH et al., 1994; KIDWELL, 2002; SUMNER, 2003; WICKER et al., 2007; BISCOTTI et al., 2015).

Os DNAs repetitivos *in tandem* têm funções estruturais significativas, ocorrendo em abundância nos telômeros, centrômeros, *clusters* de famílias multigênicas e em heterocromatinas (VOGT et al., 1992; RAO et al., 2010). Podem ser amplamente distribuídos no genoma de uma família ou gênero ou podem ser específicos de uma espécie ou cromossomo, podendo apresentar variações no número de cópias ao longo da evolução, sendo utilizados em estudos taxonômicos e filogenéticos (RAO et al., 2010). As repetições *in tandem* foram classificadas de acordo com o tamanho da unidade de repetição em: (i) DNA satélite, unidades de 100-1000 pares de base (pb); (ii) minissatélites (VNTR - *Variable Number of Tandem Repeats*), unidades de 10-100 pb; e os (iii) microsatélites (SSR - *Simple Sequence Repeats*), unidades de 1-6 bp (TAUTZ, 1993; LI et al., 2002). Contudo, essa classificação tem sido alvo de reformulações, onde para alguns autores as unidades de repetição simples podem compor sequências de DNA satélite quando organizadas em *arrays* de milhares a milhões de cópias nos cromossomos (GARRIDO-RAMOS, 2015, 2017).

Repetições *in tandem* também são encontradas em famílias multigênicas, termo utilizado para incluir grupos de genes oriundos de um ancestral comum e que possuem sequências de DNA e funções semelhantes (NEI e RONNEY, 2005). Um exemplo bem

conhecido de família multigênica são os DNAs ribossômicos (rDNA), os quais transcrevem os RNAs ribossômicos (rRNA), que são os componentes básicos das subunidades dos ribossomos (SMIT et al., 2007). As famílias multigênicas ribossômicas são organizadas em duas classes: as de rDNA 45S, que transcreve os *rRNAs 18S, 5.8S e 28S* e é responsável pela organização do nucléolo, e a de rDNA 5S, que transcreve somente o *rRNA 5S* (MARTINS e WASKO, 2004). O rDNA 5S pode atuar como marcador genético para a identificação de espécies, subespécies, populações ou até mesmo híbridos (MARTINS e WASKO, 2004).

Os elementos transponíveis (TE – *Transposable Elements*), são sequências de DNAs repetitivos que se encontram dispersos pelo genoma e possuem capacidade de se mover e duplicar, apresentando um notável sucesso evolutivo e diversidade genética e funcional (WICKER et al., 2007). Com base no mecanismo de transposição, esses elementos são agrupados em duas categorias: retrotransposons (elementos de classe I) e transposons (elementos de classe II) (WICKER et al., 2007).

Os retransposons são sequências de DNA que transpõem via transcrição reversa do seu RNA. Nesse processo, esses elementos são transcritos a partir do DNA para RNA e esse RNA é reversamente transcrito, através da enzima transcriptase reversa, para DNA novamente, o qual será inserido em uma nova posição no genoma (WICKER et al., 2007). Já os transposons conseguem se mover sem esse intermediário, esses elementos se movimentam no genoma através de cópias do seu DNA. Essas transposições são catalisadas por enzimas transposases, as quais cortam o DNA, que se ligará à uma nova região do genoma (WICKER et al., 2007).

Os TEs podem também ser classificados levando em consideração sua autonomia na realização da transposição, podendo ser autônomos quando são capazes de produzir todas as proteínas necessárias para a transposição, ou não autônomos, quando não codificam proteínas e precisam “emprestar” as funções enzimáticas necessárias de elementos autônomos presentes nas mesmas células para realizar sua transposição no genoma (FESCHOTTE et al., 2002).

O mobiloma, porção repetitiva de TEs do genoma, das tartarugas permanecia subestimado até pouco tempo atrás. Estimava-se que somente 10% do conteúdo do genoma dessas espécies poderia ser atribuído a elementos transponíveis (SHAFFER et al., 2013; WANG et al., 2013). No entanto, o sequenciamento do genoma de mais espécies de tartarugas permitiu que novas anotações fossem feitas para o grupo, mostrando que cerca de 30% do conteúdo desses genomas correspondem a TEs, o que pode ser relacionado ao tamanho do genoma dos répteis (TOLLIS et al., 2017; BOISSINOT et al., 2019).

Dessa forma, os DNAs repetitivos são utilizados como marcadores cromossômicos, os quais podem ser específicos ou compartilhados entre as espécies, e tem demonstrado que

variações microestruturais participaram da evolução do cariótipo da família Cheloniidae (MACHADO et al., 2020).

1.2 JUSTIFICATIVA

As espécies de tartarugas marinhas que ocorrem no litoral brasileiro estão todas ameaçadas de extinção em diferentes níveis. Além disso, na costa brasileira encontra-se o maior índice de hibridação entre essas espécies de vertebrados, os quais nunca foram citogeneticamente estudados. Diante disso, se torna essencial a aplicação de estudos de caráter citogenético, utilizando técnicas convencionais e moleculares voltadas ao desenvolvimento de marcadores cromossômicos para as espécies, as quais possam auxiliar na avaliação da microestrutura cariotípica dessas espécies. O estabelecimento de marcadores cromossômicos espécie-específicos permite a identificação de cariótipos híbridos, contribuindo para estudos do fenômeno de hibridização e sendo uma ferramenta auxiliar à identificação morfológica e molecular desses híbridos. Preencher essa lacuna do conhecimento do grupo auxilia no entendimento da evolução cariotípica das tartarugas marinhas da família Cheloniidae e na identificação das possíveis consequências das hibridações para as espécies, podendo futuramente contribuir também com estratégias para conservação e manejo dessas espécies consideradas bandeiras para conservação da biodiversidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Ampliar o conhecimento da organização e diversificação cariotípica das tartarugas marinhas da família Cheloniidae que ocorrem no litoral brasileiro e avaliar os conjuntos cromossômicos dos híbridos interespecíficos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar comparativamente os cariótipos de *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* e *L. olivacea* do litoral brasileiro para inferir sobre mecanismos evolutivos que deram origem a diversidade cariotípica do grupo;
- b) Utilizar marcadores cromossômicos de DNAs repetitivos (DNAs ribossômicos e microssatélites) para estudar a história evolutiva dos cariótipos;
- c) Estabelecer marcadores cromossômicos específicos e compartilhados entre as espécies para possibilitar a identificação de cariótipos híbridos;
- d) Utilizar a citogenética como uma ferramenta auxiliar buscando avaliar a ocorrência de conjuntos cromossômicos balanceados e/ou desbalanceados, integrando a análises morfológicas e de sequências mitocondriais e nucleares com vistas a identificação de possíveis indivíduos híbridos interespecíficos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas citogeneticamente espécies de *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* e *L. olivacea* para a caracterização cariotípica, assim como dois exemplares determinados neste estudo como sendo híbridos F2 entre espécies de diferentes tartarugas marinhas.

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO E LOCAIS DE COLETA

O material biológico utilizado nesse estudo é originado de exemplares de vida livre, na reabilitação e de cativeiro das espécies *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* e *L. olivacea*, obtidos em seis localidades diferentes do litoral brasileiro (Tabela 1) (Figura 7). Dentre os exemplares dois indivíduos juvenis classificados como *C. mydas* (Mata de São João – BA) e *C. caretta* (Ponta do Sul – PR) foram identificados, através de uma análise morfológica superficial, como possíveis híbridos entre *C. mydas* (*Cm*) x *E. imbricata* (*Ei*) e *C. caretta* (*Cc*) x *L. olivacea* (*Lo*), sendo chamadas aqui de híbridos *A* e *B*, respectivamente. A coleta de material biológico dos exemplares de cativeiro foi realizada em parceria com a Fundação Projeto Tamar (Bases de Florianópolis e Praia do Forte) e com o Aquário Natal. Já a coleta de material de espécimes de vida livre foi realizada através de captura intencional com rede de espera ou de animais em reabilitação, em parceria com o Laboratório de Ecologia e Conservação (LEC) do Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná, o Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) e a Associação MarBrasil, e em áreas de desova em parceria com a Fundação Projeto Tamar (Base Pipa) (Autorização para atividades com finalidade científica MMA/ICMBio/SISBIO: 52218-8; 43433-2/3).

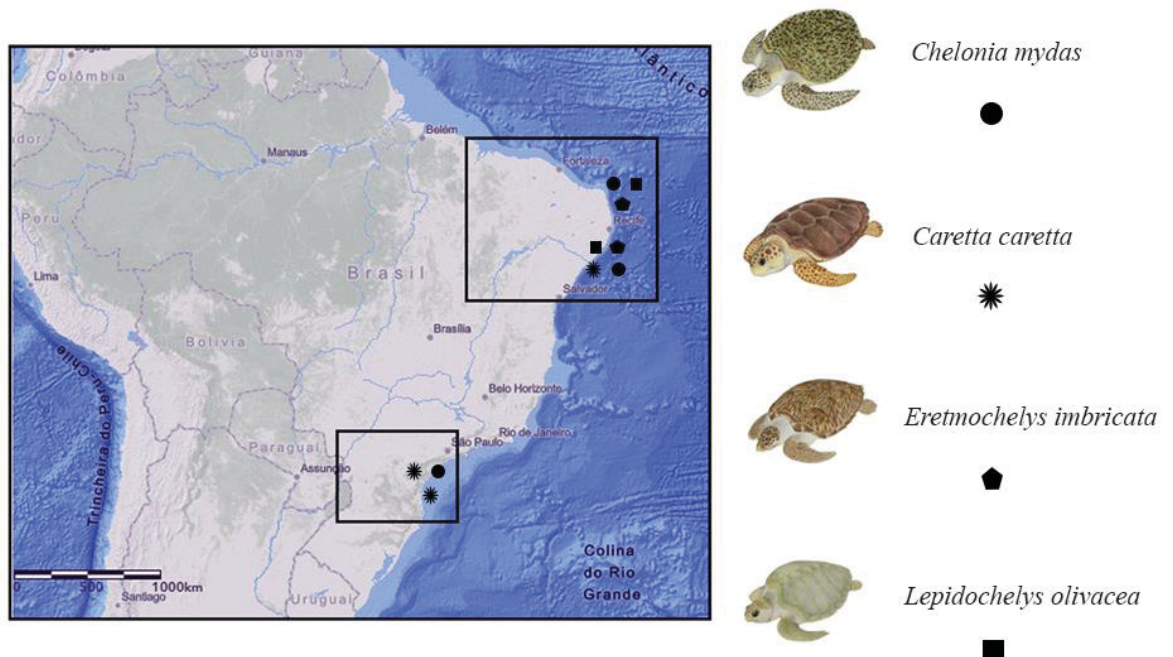
Os procedimentos estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) (Protocolo: 7200/2016). O material foi processado em instituições parceiras durante as coletas em campo e analisado no Laboratório de Biologia Cromossômica: Estrutura & Função da UEPG.

Tabela 1 – Informações sobre as espécies analisadas: número de indivíduos, instituições parceiras, condição de vida dos animais e locais de coleta.

| Espécie | Nº de indivíduos | Instituição | Condição | Localidade |
|-------------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| <i>Chelonia mydas</i> | 3 juvenis | Aquário Natal | Cativeiro | Extremoz – RN |
| | 15 juvenis | LEC/PMP-BS/MarBrasil | Vida livre | Ilha das Cobras, Pontal do Sul - PR |
| | 1 ♀ e 8 juvenis | Fundação Projeto Tamar | Cativeiro | Mata de São João - BA |
| <i>Caretta caretta</i> | 1 ♂ e 2 ♀ | Fundação Projeto Tamar | Cativeiro | Florianópolis – SC |
| | 1 ♂, 3 ♀ e 4 juvenis | Fundação Projeto Tamar | Cativeiro | Mata de São João - BA |
| <i>Eretmochelys imbricata</i> | 2 ♀ | Fundação Projeto Tamar | Vida Livre | Praia das Minas, Tibau do Sul - RN |
| | 4 juvenis | Fundação Projeto Tamar | Cativeiro | Mata de São João - BA |
| <i>Lepidochelys olivacea</i> | 3 juvenis | Aquário Natal | Cativeiro | Extremoz - RN |
| | 1 ♂ e 2 juvenis | Fundação Projeto Tamar | Cativeiro | Mata de São João - BA |
| <i>Híbrido A</i> | 1 juvenil | Fundação Projeto Tamar | Cativeiro | Mata de São João - BA |
| <i>Híbrido B</i> | 1 juvenil | LEC/PMP-BS | Reabilitação | Pontal do Sul - PR |

Fonte: O autor (2021). Nota: RN = Rio Grande do Norte; PR = Paraná; BA = Bahia; SC = Santa Catarina.

Figura 7. Mapa parcial da América do Sul indicando os locais de coleta de material biológico das tartarugas marinhas em diferentes áreas do Brasil. As espécies estão indicadas por formas geométricas nas áreas coletadas: *C. mydas* (círculo), *C. caretta* (asterisco), *E. imbricata* (pentágono) e *L. olivacea* (quadrado).



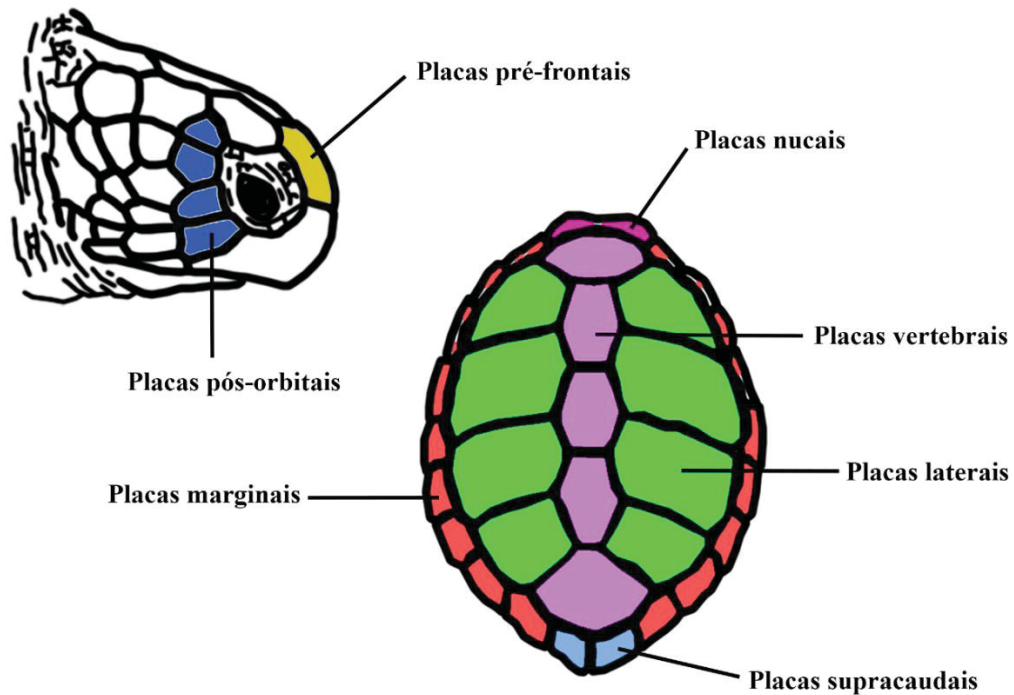
Fonte: O autor (2021) e Projeto Tamar (2021) - imagens esquemáticas das tartarugas.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Análise morfológica

Características morfológicas de espécimes híbridos de tartarugas marinhas foram analisadas em comparação com descrições anatômicas para as espécies puras, como proposto por Pritchard e Mortimer (1999) e Wyneken (2001). Foram contados o número de placas pré-frontais e pós-orbitais da cabeça dos animais, assim como o número de placas vertebrais, laterais, nucais, marginais e supracaudais da carapaça (Figura 8). Após, características morfológicas secundárias foram avaliadas como a aparência geral da cabeça e da carapaça dos híbridos, padrão das placas do plastrão e o número de garras nas nadadeiras, como proposto por Pritchard e Mortimer (1999), Wyneken (2001) e Sim et al. (2014). Todas as análises morfológicas foram realizadas a partir de registros fotográficos dos híbridos *A* e *B* utilizando o *software Adobe Photoshop 2020*.

Figura 8. Diagrama de reconhecimento das placas para identificação morfológica das espécies.



Fonte: Adaptado de Wyneken (2001).

3.2.2 Coleta de sangue periférico

Para coleta de sangue, foi realizada uma desinfecção local com álcool 70% e então foram coletados aproximadamente 2-5 ml de sangue, dependendo do porte do animal, do seio cervical dorsal ou do seio supra-occipital de exemplares de *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* e *L. olivacea* e dos híbridos *A* e *B*.

Para coleta de sangue foram utilizadas seringas de 5 ml estéreis, agulhas estéreis de calibre 25:8, 40:8 e 40:12 e tubos BD VACUTAINER® Heparina estéreis onde o sangue foi armazenado.

3.2.3 Cultivo temporário de linfócitos

O cultivo temporário de linfócitos foi realizado segundo o protocolo de Rodríguez et al. (2003), com modificações. Primeiramente, os tubos BD VACUTAINER® Heparina com sangue foram centrifugados por 5 min a 900 rpm para que os linfócitos fossem separados do plasma e das hemácias, o que facilita a coleta da nuvem de linfócitos. Em ambiente estéril, com uma pipeta Pasteur de plástico a nuvem de linfócitos foi coletada e transferida para alíquotas de meio para cariótipo RPMI (Vitrocell – Embriolife). As alíquotas foram incubadas em estufa

ou banho-maria a 30°C por 72 horas. Meia hora antes do término do tempo de cultivo foi adicionado 100 µL de colchicina 0,025% e as alíquotas ficaram a 30°C até completarem as 72 horas de cultivo. Terminadas as 72 horas, com auxílio de uma pipeta o conteúdo das alíquotas foi ressuspenso para homogeneizar o material. Feito isso, o material foi transferido para tubos de centrífuga (Falcon) e submetidos à centrifugação a 900 rpm durante 10 min. Após esse tempo na centrífuga, o sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 10 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M), a qual foi previamente aquecida em estufa ou banho-maria a 30°C. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro o material foi ressuspenso e incubado a 30°C por 30 min. Após o tempo na hipotônica, foi adicionado 1 ml de fixador Carnoy 3:1 (álcool metílico: ácido acético) recém preparado e gelado para cessar o efeito da mesma. O material ficou descansando na bancada por 10 min. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 900 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. Foram feitas mais duas lavagens com 5 ml de fixador 3:1 e o sobrenadante foi cuidadosamente desprezado após cada lavagem. Por fim, após as lavagens, foram adicionados 1,5 ml de fixador 3:1 ao material que foi transferido para um microtubo de 1,5 ml. As preparações cromossômicas foram armazenadas em freezer para posterior preparo das lâminas.

As lâminas com preparações cromossômicas foram submetidas a coloração convencional por Giemsa 10% (em tampão fosfato pH 6,8) para análise, em microscópio óptico, do número diploide e morfologia cromossômica antes de serem conduzidos outros procedimentos citogenéticos. Foram analisadas pelo menos vinte metáfases por indivíduo para cada técnica de citogenética convencional ou molecular realizada.

3.2.4 Bandamento C

A detecção da heterocromatina constitutiva seguiu o protocolo proposto por Sumner (1972). As lâminas com o material celular foram tratadas em ácido clorídrico (HCl) 0,2N, a 37°C, durante 10 min, lavando-as com água destilada logo em seguida. Feito isso, as lâminas foram incubadas em uma solução de hidróxido de Bário (Ba(OH)₂) a 5%, recém preparada, a 42°C, durante 1:30-2 min. As lâminas foram rapidamente submergidas em solução de ácido clorídrico 0,2N a 42°C e lavadas com água destilada. Depois, as lâminas foram incubadas em solução salina 2xSSC, a 60°C, durante 50 min. Por fim, foram novamente lavadas com água destilada, secas ao ar e coradas com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH 6,8, durante 5 min.

3.2.5 Bandamento G

Para realizar o procedimento de bandamento G foi utilizado o protocolo proposto por Seabright (1971), com modificações. As lâminas com material a ser analisado foram envelhecidas. Após o envelhecimento, foram submetidas à uma digestão com solução de tripsina/EDTA durante 3 s. A solução de tripsina foi preparada utilizando 0,01 g de tripsina (1:250), 1 ml de EDTA 0,5 M e 50 ml de água destilada. A ação da tripsina foi interrompida mediante a lavagem com solução tampão fosfato pH 6,8. Em seguida as lâminas foram coradas com Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH 6,8, por 5 min e fotografadas imediatamente em fotomicroscópio Olympus BX43 com câmera CCD DP-71 (Olympus, Shinjuku, Tóquio, Japão).

3.2.6 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de tecidos tipo pele ou músculo de *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata*, *L. olivacea* e dos híbridos *A* e *B* obtidos de animais mortos, na reabilitação ou em cativeiro utilizando o kit *ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System* (Promega, Madison, WI, USA).

Pequenos fragmentos de tecidos foram cortados e colocados em microtubos estéreis de 1,5 ml onde foram adicionados 160 µL de PBS, 20 µL de Proteinase K e 200 µL de *Cell Lysis Buffer* (CLD). Os microtubos foram incubados em banho maria a 56°C por aproximadamente 1 hora, vortexando os mesmos a cada meia hora. Foi adicionado 20 µL de RNase A e os tubos foram incubados a 56°C por mais 10 min. Após, foi adicionado 250 µL de *Binding Buffer* (BBA). Essa solução, aproximadamente 650 µL, foi adicionada em uma coluna do kit (*ReliaPrep™ Binding Column*), colocada em um tubo coletor, a qual foi centrifugada por 1 min a 14 000 rpm em temperatura ambiente. Após, descartado o líquido do tubo coletor. A seguir, foram adicionados 500 µL de *Column Wash Solution* (CWD) a coluna, centrifugada a 14 000 rpm por 2 min. Após, descartado o líquido do tubo coletor. Esse último passo foi repetido duas vezes, dando um total de três lavagens. O tubo coletor foi descartado e a coluna colocada para secar em estufa a 37°C por 30 min. A coluna foi colocada em um microtubo estéril e foram adicionados 25 µL de *Nuclease-Free Water*, previamente aquecida a 60°C, e incubada a temperatura ambiente por 1 min. A coluna foi centrifugada por 1 min a 14 000 rpm e posteriormente descartada. Os microtubos foram armazenados a -20°C.

3.2.7 Amplificação de sequências por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Os DNAs ribossomais (rDNA) 5S e 18S, os DNAs mitocondriais (mtDNA) 12S e 16S e os DNAs nucleares (nucDNA) BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), Cmos (*oocyte maturation factor*) e R35 (*RNA fingerprint protein 35*) tiveram suas sequências amplificadas por meio de PCR utilizando como molde o DNA genômico das espécies de estudo *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata*, *L. olivacea* e híbridos *A* e *B* (Tabela 2).

As reações de amplificação foram compostas por 40 ng de DNA genômico, 0.2 µM de cada primer, 0.16 mM de dNTPs, 1U Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1.5 mM de MgCl₂ no tampão da reação 1x (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl). O programa da reação de amplificação consistiu em desnaturação inicial por 5 min a 95°C, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 45 s na temperatura de anelamento (58,5° C – 5S; 57 °C – 18S; 60°C – 16S e BDNF; 62°C – 12S, Cmos e R35), 72°C por 2 min e, extensão final a 72°C por 7 min.

As sequências amplificadas foram utilizadas nos procedimentos de purificação, sequenciamento, análise das sequências e análise molecular das híbridas. Os rDNAs 5S e 18S foram utilizados para marcação de sondas utilizadas na hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

Tabela 2 - Relação de *primers* utilizados nas amplificações das sequências de rDNA, mtDNA e nucDNA com as respectivas referências.

| Gene | Primer Forward/Reverse (5' – 3') | Referência |
|-------------|--|--------------------------------|
| 5S | GCCACACCACCCTGAACAC GCCTACGACACCTGGTATTC | Suárez et al. (2007) |
| 18S | GTACAGTGAAACTGCGAATG CCTCGTTCATGGGAATAAT | Machado et al. (2020) |
| 12S | AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT | Kocher et al. (1989) |
| 16S | CGCCTGTTTATCAAAAACAT CCGGTCTGAACTCAGATCACGT | Romano e Palumbi. (1997) |
| BDNF | GACCATCCTTTTCCTKACTATGGTTATTTTCATACTT CTATCTTCCCCTTTTAATGGTCAGTGTACAAAC | Noonan e Chippindale (2006) |
| Cmos | GCCTGGTGCTCCATCGACTGGGATCA GTAGATGTCTGCTTTGGGGGTGA | Le et al. (2006) |
| R35 | ACGATTCTCGCTGATTCTTGC GCAGAAAACCTGAATGTCTCAAAGG | Fujita et al. (2004) |

Fonte: O autor (2021).

3.2.8 Purificação dos fragmentos de DNA

A purificação dos fragmentos de DNA de interesse obtidos por PCR foi realizada utilizando o kit *Gel DNA Purification* (Ludwig Biotecnologia, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil). Foram adicionados aproximadamente 100 µL de produto de PCR, 300 µL de *Buffer DD* deixando a solução amarela, o que indica pH correto. Depois toda a amostra foi transferida para uma coluna do kit (*EC Column*) dentro de um tubo coletor, que foi deixado por 1 min na bancada a temperatura ambiente, em seguida centrifugado a 12000 rpm por 2 min e, em seguida, descartado o conteúdo do tubo coletor. Foram adicionados 600 µL de *DNA Wash Buffer WB* à coluna, centrifugada novamente a 12000 rpm por 2 min, descartado o conteúdo do tubo coletor. O último passo de lavagem foi repetido novamente. Foi feita uma última centrifugação, a 13000 rpm por 2 min, sem ser adicionado nenhum líquido à coluna para que saíssem resíduos das soluções anteriores. O tubo coletor foi descartado e a coluna colocada para secar em estufa a 37°C por 30 min. Por fim, a coluna foi colocada em um microtubo estéril e foram adicionados 25 µL de *Elution Buffer EB*, previamente aquecido em banho-maria a 70°C. A coluna foi deixada em temperatura ambiente por 2 min e então centrifugada a 12000 rpm por 2 min. Esse último passo foi repetido por mais uma vez e então o conteúdo restante no microtubo foi armazenado em freezer à -20°C.

3.2.9 Sequenciamento e análise das sequências

O sequenciamento automático de DNA dos amplicons obtidos foi realizado em sequenciador de DNA ABI-PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas e editadas com o auxílio do *software Geneious v 7.1.9* (KEARSE et al., 2012) e posteriormente submetidas a uma análise de identidade utilizando os bancos de dados *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), presente no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) para a identificação de similaridade entre genes de outros organismos.

3.2.10 Análise molecular dos híbridos

As sequências de mtDNA (12S e 16S) e nucDNA (BDNF, Cmos e R35) dos híbridos *A* e *B* foram analisadas e corrigidas no *software Geneious v 7.1.9* (KEARSE et al., 2012). Os sítios polimórficos dos genes de nucDNA foram visualmente identificados nas duas fases de leitura (*Forward* e *reverse*). Sequências de mtDNA e nucDNA de *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* e *L. olivacea* consideradas puras por Naro-Maciel et al. (2008) (Número de acesso: FJ009020.1-FJ009031.1; FJ039920.1-FJ039988.1) e Vilaça et al. (2012) (Número de acesso:

JX067524.1; JF415092.1-JF415117.1) foram retiradas do banco de dados *GenBank* (NCBI) e alinhadas às sequências dos híbridos *A* e *B* utilizando o algoritmo *ClustalW* do *Geneious*. Os haplótipos de nucDNA foram determinados utilizando a ferramenta *PHASE* do *software DnaSP v5* (LIBRADO e ROZAS, 2009) e uma rede haplotípica foi gerada para cada gene utilizando o critério de *Median Joining* (BANDELT et al., 1999) no *software PopArt 1.7* (LEIGH e BRYANT, 2015).

3.2.11 Marcação de sondas

A sonda de rDNA 18S foi marcada utilizando biotina-16-dUTP (Jena Bioscience, Dortmund, Germany) como descrito em Machado et al. (2020). Já a sonda de rDNA 5S foi marcada através de PCR utilizando 40 ng de DNA de *C. mydas*, 1X *Taq Reaction buffer* (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 µM de dATP, dGTP e dCTP, 28 µM de dTTP, 12 µM de digoxigenina-11-dUTP (Jena Bioscience, Dortmund, Germany), 1 µM de *primers*, 2 mM MgCl₂ e 0.05 U/µL de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®).

As sondas de microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAG)₁₀, (GATA)₈, (GAA)₁₀, (CGC)₁₀ e (GACA)₈ tem marcação direta com o fluorocromo Cy5 (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) na extremidade 5' durante a síntese do DNA.

3.2.12 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

As sondas de rDNAs e microssatélites foram submetidas à FISH. Para as sondas de microssatélites o protocolo seguiu o proposto por Kubat et al. (2008). Já para as sondas de rDNA 5S e 18S foi utilizado o protocolo geral da FISH sob alta condição de estringência (2,5 ng/µL sonda, 50% formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, 37°C por 16 h) como descrito por Pinkel et al. (1986). Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos streptavidina conjugada com *Alexa Fluor 488* (Invitrogen) para o rDNA 18S e anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche Applied Science) para o rDNA 5S. As sondas de microssatélites por terem marcação direta já possuem o anticorpo conjugado e não precisaram de detecção. Os cromossomos foram contracorados com 0,2 µg/mL de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA), e analisados no microscópio de epifluorescência Leica DM 2000 (Leica, Wetzlar, Germany) acoplado à câmera DFC3000 G CCD.

3.2.13 Organização dos cariótipos

Os cromossomos de *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata*, *L. olivacea* e dos híbridos *A* e *B* foram organizados por ordem decrescente de tamanho e de acordo com a posição centromérica, como descrito por Montiel et al. (2016). Foram divididos com base no tamanho em macrocromossomos (metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos) e microcromossomos (mc), de acordo com Bickham et al. (1980). Os cariótipos das híbridas foram organizados baseados nos cariótipos das espécies puras. Idiogramas representativos foram construídos para as espécies puras, baseados nos dados do presente estudo e nos obtidos por Machado et al. (2020), utilizando o *software Adobe Photoshop 2020*.

4. RESULTADOS

Os resultados estão organizados em dois capítulos correspondentes aos artigos científicos:

4.1 CAPÍTULO I

**Heterochromatin and microsatellites detection in karyotypes of four sea turtle species:
Interspecific chromosomal differences**

4.2 CAPÍTULO II

**Integrating morphological, molecular, and cytogenetic data for F2 sea turtle hybrids
diagnosis revealed apparently balanced chromosomal sets**

4.1 CAPÍTULO I

Heterochromatin and microsatellites detection in karyotypes of four sea turtle species: Interspecific chromosomal differences

Artigo publicado no periódico Genetics and Molecular Biology 43, 4, e20200213 (2020)

**Heterochromatin and microsatellites detection in four sea turtle species karyotypes:
Interspecific chromosomal differences**

Caroline Regina Dias Machado¹, Camila Domit², Marcela Baer Pucci³, Camilla Borges Gazolla¹, Larissa Glugoski⁴, Viviane Nogaroto⁵, Marcelo Ricardo Vicari^{1,5}

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 100, 81530-000, Curitiba, Ponta Grossa, Paraná State, Brazil.

² Laboratório de Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, Av. Beira Mar, 83255-000, Pontal do Paraná, Paraná State, Brazil.

³ Departamento de Saúde II, Universidade Nove de Julho, R. Nicolau Assis, 15, 17011-102, Bauru, São Paulo State, Brazil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, 13565-905, São Carlos, São Paulo State, Brazil.

⁵ Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná State, Brazil.

Running title: Heterochromatin in sea turtles.

Abstract

The wide variation in size and content of eukaryotic genomes is mainly attributed to the accumulation of repetitive DNA sequences, like microsatellites, which are tandemly repeated DNA sequences. Sea turtles share a diploid number ($2n$) of 56, however recent molecular cytogenetic data have shown that karyotype conservatism is not a rule in the group. In this study, the heterochromatin distribution and the chromosomal location of microsatellites $(CA)_n$, $(GA)_n$, $(CAG)_n$, $(GATA)_n$, $(GAA)_n$, $(CGC)_n$ and $(GACA)_n$ in *Chelonia mydas*, *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata* and *Lepidochelys olivacea* were comparatively investigated. The obtained data showed that just the $(CA)_n$, $(GA)_n$, $(CAG)_n$ and $(GATA)_n$ microsatellites were located on sea turtle chromosomes, preferentially in heterochromatic regions of the microchromosomes (mc). Variations in the location of heterochromatin and microsatellites sites, especially in some pericentromeric regions of macrochromosomes, corroborate to proposal of centromere repositioning occurrence in Cheloniidae species. Furthermore, the results obtained with the location of microsatellites corroborate with the temperature sex determination mechanism and the absence of heteromorphic sex chromosomes in sea turtles. The findings are useful for understanding part of the karyotypic diversification observed in sea turtles, especially those that explain the diversification of Caretteni from Chelonini species.

Keywords: Cheloniidae; Chromosomal rearrangements; Cryptodira; Endangered species; Repetitive DNAs.

Introduction

Sea turtles (Testudines: Cryptodira) are grouped into Dermochelyidae and Cheloniidae families and only seven living species (Pritchard, 1997). Dermochelyidae is monotypic, represented by *Dermochelys coriacea* (leatherback sea turtle), and is the sister-taxon to a clade comprising all other extant sea turtles (Bowen and Karl, 1996; Dutton *et al.*, 1996; Parham and Fastovsky, 1997; Iverson *et al.*, 2007). Molecular phylogenetic studies supported recognition of two tribes in Cheloniidae: (i) Chelonini grouping *Natator depressus* (flatback sea turtle) and *Chelonia mydas* (green sea turtle) and; (ii) Caretteni grouping *Lepidochelys olivacea* (olive ridley sea turtle), *Lepidochelys kempii* (Kemp's ridley sea turtle), *Eretmochelys imbricata* (hawksbill sea turtle) and, *Caretta caretta* (loggerhead sea turtle) (Iverson *et al.*, 2007; Naromaci *et al.*, 2008).

All sea turtle species show different levels of threat of extinction and are considered flag species for the conservation of biodiversity (IUCN, 2020). In addition, numerous threats affect the population maintenance and species conservation (Lara-Ruiz *et al.*, 2006; Proietti *et al.*, 2014; Arantes *et al.*, 2020). Phylogenetic analyses confirmed turtles as sister group of birds and crocodylians (Archosauria), thus justifying comparisons among the groups (Chiari *et al.*, 2012). Therefore, some authors considered reptiles to be a key group in understanding the evolution of vertebrates, and anchored by chromosomal studies, the diversity of their representatives was studied (Valenzuela and Adams, 2011; Green *et al.*, 2014; Montiel *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2019; Deakin and Ezaz, 2019).

Testudines cytogenetic studies demonstrated karyotypes composed of macrochromosomes and a variable number of microchromosomes (mc), a characteristic shared with birds and squamate reptiles (Olmo, 2008; Pokorná *et al.*, 2011a; Montiel *et al.*, 2016). In turtles, three karyotypic groups were proposed according to the diploid number (2n): (i) high 2n (60 - 68 chromosomes) and high amount of mc; (ii) intermediate 2n (50 - 56 chromosomes) and relatively low amount of mc and; (iii) low 2n (26 - 28 chromosomes) and without mc (Ayres *et al.*, 1969; Barros *et al.*, 1976; Sites *et al.*, 1979). However, genomic and cytogenetic studies using comparative analyses of chromosomal markers are scarce in Testudines species (Iannucci *et al.*, 2019; Cavalcante *et al.*, 2018, 2020a, 2020b).

The wide variation of 2n (26 – 68 chromosomes) observed in turtles implies that their genomes have been deeply reorganized (Noletto *et al.*, 2006; Valenzuela and Adams, 2011; Montiel *et al.*, 2016; Noronha *et al.*, 2016; Cavalcante *et al.*, 2018, 2020a, 2020b; Clemente *et al.*, 2020). In this sense, the characterization of repetitive DNA sequences present in

heterochromatin sites allow us to understand chromosomal rearrangements in some species of the group (Cavalcante *et al.*, 2018, 2020a, 2020b). In turtles, as well as in birds, heterochromatin is located in the pericentromeric region of most macrochromosomes and some mc (Nishida *et al.*, 2013; de Oliveira *et al.*, 2017; Cavalcante *et al.*, 2018; Barcellos *et al.*, 2019). In crocodylians, which do not have mc, the heterochromatic regions were also preferentially located in the pericentromeric regions (Amavet *et al.*, 2003; Kawagoshi *et al.*, 2008).

Heterochromatin is usually composed by an enriched repetitive DNA segment of satellite DNAs (Sumner, 2003). Satellite, minisatellites and microsatellites DNAs were initially classified according to both the length of the whole repeat cluster and the size of the repetitive unit (Tautz, 1993). Although controversy still exists, the term satellite DNA has been applied to any tandem repetitive sequence which is present in blocks of hundreds to thousands of units and which are located in heterochromatin sites regardless of unit size (Garrido-Ramos, 2015). For instance, microsatellites are 1-6 nucleotides units tandemly repeated and can be found accumulated as a part constituent of heterochromatin (Kubat *et al.*, 2008; Schemberger *et al.*, 2019; Viana *et al.*, 2020; Zattera *et al.*, 2020) or located dispersed in euchromatic chromosomes regions (Tóth *et al.*, 2000; Ruiz-Ruano *et al.*, 2015). Its location on chromosomes can be species-specific or present a similar distribution pattern in close relationship species groups (Tóth *et al.*, 2000; Ziemniczak *et al.*, 2014; Pucci *et al.*, 2016).

Based on phylogenetic analysis in Testudines, Montiel *et al.* (2016) proposed that the putatively ancestral condition for Dermochelyidae and Cheloniidae species is a $2n$ of 56 chromosomes. In previous studies, all sea turtle species shared $2n = 56$ and their karyotypes were considered identical (Bickham *et al.*, 1980; Bickham and Carr, 1983; López *et al.*, 2008; Fukuda *et al.*, 2014). However, a recent comparative cytogenetic study showed species-specific differences in chromosomal morphology, G-banding patterns, besides interstitial telomeric sites (ITS) occurrence, among *C. mydas*, *L. olivacea*, *E. imbricata* and *C. caretta*, which ruled out the proposal of conserved structure of the macrochromosomes in Cheloniidae (Machado *et al.*, 2020). Here, chromosomal data of sea turtle species from Cheloniidae that occur in the Brazilian coast: *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata*, and *L. olivacea* were comparatively analyzed, aiming to describe the heterochromatin and microsatellites chromosomal locations, inferring its relations with the interspecific karyotype diversity.

Material and Methods

Sampling and chromosome preparation

Chelonia mydas, *C. caretta*, *E. imbricata* and *L. olivacea* were cytogenetically compared. The biological samples were obtained on different areas of the Brazilian coast (Figure 1; for details, see Table S1): (i) *C. mydas* from Extremoz – Rio Grande do Norte State, Cobras Island – Paraná State and Mata de São João – Bahia State (N = 27: one female and 26 juveniles), (ii) *C. caretta* from Mata de São João and Florianópolis – Santa Catarina State (N = 11: two males, five females and four juveniles), (iii) *E. imbricata* from Tibau do Sul – Rio Grande do Norte State and Mata de São João (N = 6: two females and four juveniles), and (iv) *L. olivacea* from Extremoz and Mata de São João (N = 6: one male and five juveniles). The collection samples were authorized by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, licence number 52218-7; 43433-2/3). All experimental procedures were authorized and performed following the Ethical Committee on Animal Use of the Universidade Estadual de Ponta Grossa. (Protocol: 7200/2016).

Peripheral blood was used to obtain the chromosomal preparations by temporary culture of lymphocytes method (Rodríguez *et al.*, 2003). The slides containing chromosomal preparations were submitted to C-banding for constitutive heterochromatin detection (Sumner, 1972) and to fluorescence *in situ* hybridization (FISH) assays, using microsatellites probes.

FISH

The (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAG)₁₀, (GATA)₈, (GAA)₁₀, (CGC)₁₀ and (GACA)₈ microsatellites probes were directly labelled with Cy5 fluorochrome (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) at the 5' end during DNA synthesis. FISH was performed according to the protocol proposed by Kubat *et al.* (2008), under 77% stringency. Chromosomes were counterstained with 0.2 µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole - DAPI (Sigma-Aldrich) in the VECTASHIELD mounting medium (Vector, Burlingame, CA, USA). The images were captured in CCD Olympus DP-72 camera coupled in epifluorescence microscope Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan). Twenty metaphases were analyzed per sampled individual for microsatellites signals detection.

Karyotypes organization

Chromosomes were arranged by decreasing size and centromere position, as described by Montiel *et al.* (2016). They were classified as bi-armed and one-armed (acrocentric),

depending on their arm ratio, and as macrochromosomes or mc, according to Bickham *et al.* (1980) description. Representative idiograms of the karyotype organization of the four species analyzed were designed, illustrating the data obtained in the present study and those of Machado *et al.* (2020).

Results

Constitutive heterochromatin organization

The four species presented $2n = 56$ arranged in 12 macrochromosome and 16 mc pairs for males and females karyotypes and without evidence for heteromorphic sex chromosomes occurrence among all individuals sampled (Figures 2–7). *Chelonia mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* and *L. olivacea* showed few heterochromatic blocks in the karyotypes, as follows: (i) *C. mydas* showed heterochromatic blocks in the pericentromeric regions of macrochromosomes 2-4, 8, 11 and 12, besides in the pericentromeric regions of mc long arms 13-19, 21, 23 and 25 (Figures 2 and 3); (ii) *C. caretta* has heterochromatic blocks in the pericentromeric regions of macrochromosomes 3 and 8, as well as in the pericentromeric region of mc 13 and, in the long arm of mc 14, 17 and 20 (Figures 2 and 3); (iii) *E. imbricata* showed heterochromatic bands located in the pericentromeric regions of the macrochromosomes 1-3 and 12, besides in the pericentromeric regions of mc 13, 14, and 17 and, in the subterminal region of the long arm of mc 16, 18 and 19 (Figures 2 and 3); and (iv) in *L. olivacea* heterochromatin is located in the pericentromeric regions of the macrochromosomes 2-4, 6 and 9-12, as well as in the pericentromeric regions of mc 13, 15, 17-19 and 21 and, in the long arms of mc 14, 20, 23 and 25 (Figures 2 and 3).

Microsatellites: Distribution Pattern

Distinct microsatellites signals were detected on chromosomes of *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* and *L. olivacea* (Figures 4-7). The (GAA)₁₀, (CGC)₁₀ and (GACA)₈ microsatellites probes were not detected on the chromosomes of these four species by FISH procedure. The microsatellite (CA)_n was located as a block in the short arms of the chromosome pairs 4 and 16 in *C. mydas* (Figures 2 and 4). *Caretta caretta* has (CA)_n block detected in mc 13 and dispersed in mc 17 (Figures 2 and 4). In *E. imbricata*, (CA)_n signals were visualized as a block in chromosome pairs 2, 4, 13 and 16, and dispersed along chromosome pair 9 (Figures 2 and 4). *Lepidochelys olivacea* has (CA)_n markers detected as a block in the short arms of the acrocentric pair 4, besides dispersed signals along the chromosome pairs 4 and 14 (Figures 2 and 4).

(GA)_n signals were detected in mc pair 14 of *C. mydas*, mc pairs 13 and 14 of *C. caretta*, mc pairs 24 and 25 in *E. imbricata*, and in the mc 14 of *L. olivacea* (Figures 2 and 5). The microsatellite (CAG)_n was located as block in chromosome pairs 13, 15-17 of *C. mydas*, besides dispersed signals along chromosome pairs 4, 5, 14, 19 and 21 (Figures 2 and 6). (CAG)_n motifs were not detected in *C. caretta* karyotype (Figure 6), while in *E. imbricata* (CAG)_n signals were located dispersed along the chromosome pairs 8, 13, 17 and 22 (Figures 2 and 6). In *L. olivacea*, (CAG)_n signals were detected in the mc 13, 16, 17 and 19 (Figures 2 and 6). (GATA)_n motifs were in situ located in the mc pairs 13, 15, 16 and 22 in *C. mydas* karyotype, in the mc pairs 13 and 16 in *C. caretta*, in chromosome pairs 9, 16, 18, 19 and 24 in *E. imbricata* and, in mc pairs 13 and 15 of the *L. olivacea* (Figures 2 and 7).

Discussion

Sea turtles have been studied from a cytogenetic point of view (Bickham *et al.*, 1980; Bickham and Carr, 1983; López *et al.*, 2008; Fukuda *et al.*, 2014), but the lack of comparative karyotype studies prevents a more robust analysis of evolutionary chromosomal changes. The first comparative cytogenetic study in sea turtles was conducted by Machado *et al.* (2020) based on G-banding and *in situ* location of 18S rDNA and telomere sequences. The compared karyotypes revealed species-specific chromosomal morphology involving macrochromosomes pairs 4, 5, 7, and 12 among *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* and *L. olivacea* (Machado *et al.*, 2020) and refutes the proposal of identical karyotypes for sea turtles. Additionally, the same four Cheloniidae sea turtles that inhabiting the Brazilian coast were here investigated and showed chromosomal differences in heterochromatin and microsatellites distribution on the karyotypes, making possible to infer new molecular mechanisms in sea turtles diversification.

The heterochromatic blocks found in macrochromosomes varied among species and demonstrated an unusual feature which only one member of the homologous bears pericentromeric heterochromatic block for macrochromosome pairs 1, 2, and 3 in some species, as also detected by Bickham *et al.* (1980) in *C. mydas*. It's known that satellite DNA (including micro- and minisatellites) is made up of systematic in tandem repeats favoring the occurrence of ectopic recombination and genic conversion (Schweizer and Loidl, 1987; Louzada *et al.*, 2020), which could lead to a differential *in cis* accumulation of satellite DNA units on heterochromatin blocks, as visualized in sea turtles' chromosomes. An other pathway, homologous recombination involving transposable elements surrounding pericentromeric region could promote substantial differences in heterochromatin block sizes (Xiao and Peterson, 2000).

Phylogenetic analyses proposed that Dermochelyidae and Cheloniidae diverged from Americhelydia ancestral lineage in the Cretaceous and that all Cheloniidae species diverged from *Dermochelys coriacea* (Iverson et al., 2007; Naro-Maciel et al., 2008; Valenzuela and Adams, 2011; Montiel et al., 2016; Pereira et al., 2017). In addition, an ancestral reconstruction demonstrated that the Chelonini tribe (*C. mydas* and *N. depressus*) split from Carettini about 34 million years ago (Mya), and in Carettini, *Eretmochelys* split from *Caretta* and *Lepidochelys* about 23 Mya (see Figure 1; Pereira et al., 2017). Interestingly, the distinct chromosome pairs morphologies observed among *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* and *L. olivacea*, proposed by Machado et al. (2020), also had diverged in pericentromeric heterochromatin composition, mainly in the pairs 4 and 12.

Different chromosome morphologies (considering the centromere position) in a homeologue chromosome pair among phylogenetically related species may be the result of chromosomal rearrangements (Charlesworth et al., 1994). However, some studies suggested that the repositioning of the centromere can occur, without changes of the DNA markers along the chromosomes (Montefalcone et al., 1999; Ventura et al., 2001). The repositioning of the centromere occurs because of the emergence of a new centromere due to numerous epigenetic changes and not by relocating an existing centromere from another genomic site (Amor et al., 2004). Thus, since G-banding technique did not evidence the occurrence of pericentric inversions among sea turtle chromosomes (Machado et al., 2020), the presence vs. absence or differences in the centromeric heterochromatin content reinforce the proposal of centromeric repositioning mechanism occurrence in the diversification of some chromosomes among *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* and *L. olivacea*.

Changes in pericentromeric heterochromatin composition among sea turtles' chromosomes, as partially demonstrated by microsatellites in situ localization and C-banding, could have emerged to new centromeres and could have led to morphological chromosome alterations. Applying the evolutionary scenario proposed by molecular phylogenetic studies (Iverson et al., 2007; Naro-Maciel et al., 2008; Valenzuela and Adams, 2011; Montiel et al., 2016, Pereira et al., 2017), the bi-armed chromosome pairs 4 and 5 from *C. mydas* could have diverged to acrocentric in *E. imbricata* and *L. olivacea* (Figure 1). Contrary to phylogenetic data that infers *C. caretta* diverged from *E. imbricata*, *C. caretta* shared chromosome pairs 4 and 5 morphology with *C. mydas*, probably indicating chromosomal homoplasy. In addition, *C. caretta* is the only turtle, among the four species studied, that have chromosome pair 7 bi-armed, indicating specific chromosomal changes in the evolutionary lineage that still need to be solved.

Following the phylogenetic proposal, the acrocentric pair 12 of *E. imbricata* diverged from a metacentric one present in *C. mydas*, since the location of a conspicuous heterochromatic block is shared between these chromosomes. The chromosome 12 changed in *E. imbricata* without detection of chromosomal inversions or DNA repeat unit's retraction, which still corroborates with the proposal of partial deletion or translocation in the origin of the pair 12 as an acrocentric in *E. imbricata* (Machado *et al.*, 2020). In this proposal, this chromosomal rearrangement should be a recent and specific event occurred in *E. imbricata*, once *C. caretta* and *L. olivacea* shared the metacentric pair 12 from *C. mydas*.

Usually, microsatellites accumulations were demonstrated in the terminal regions of vertebrate chromosomes, which seems to be a common feature due to different mechanisms that accumulate these sequences in these regions (Pokorná *et al.*, 2011b; Torres *et al.*, 2011; Ziemniczak *et al.*, 2014; Ruiz-Ruano *et al.*, 2015; Pucci *et al.*, 2016; Ernetti *et al.*, 2019). The (CA)_n, (GA)_n, (CAG)_n and (GATA)_n microsatellites were reported for the first time in sea turtles' karyotypes and demonstrated that most of them possibly make up part of the repetitive units of heterochromatin in *C. mydas*, *C. caretta*, *L. olivacea* and *E. imbricata*, especially in mc. Furthermore, the chromosomal location of microsatellites sequences in the pericentromeric regions for some chromosomes is common in species groups close to turtles, such as birds and crocodylians (Rao *et al.*, 2010; Nishida *et al.*, 2013; Matsubara *et al.*, 2016; de Oliveira *et al.*, 2017; Kretschmer *et al.*, 2018; Barcellos *et al.*, 2019). In this study, only the (CA)₁₅ repetition was observed in pericentromeric region for the macrochromosome pair 4 of *C. mydas*, *E. imbricata* and *L. olivacea*, which reinforces the hypothesis of a probable homeology among the pairs and that the morphological differences observed among the chromosomes are the result of a possible centromeric repositioning (Machado *et al.*, 2020).

The microsatellite (GA)_n showed accumulated signals in the Nucleolus Organizer Region (NOR) locus, except for *E. imbricata*. Studies have shown that the frequent association between microsatellites and NOR regions is explained by large number of microsatellites in rDNA intergenic spacers (Ruiz-Ruano *et al.*, 2015; Agrawal and Ganley, 2018). Furthermore, the fact that these microsatellites could be found in blocks, dispersed or absents along the chromosome arms may reflect a possible trend of expansion of these microsatellites in the genomes (Pokorná *et al.*, 2011b; Ruiz-Ruano *et al.*, 2015). Dispersed distributions of microsatellite on chromosomes are constantly associated with TEs, which can contribute to the dispersion of these sequences in the genome (Pucci *et al.*, 2016).

The absence of (CAG)_n signals in the chromosomes of *C. caretta* demonstrated that this repetition may have contracted (deletion of repetitive units) in the genome (López-Flores and

Garrido-Ramos, 2012) to a reduced number of copies, undetectable by FISH procedure (Kretschmer *et al.*, 2018). The number of heterochromatic bands and microsatellites (CA)_n, (GA)_n and (GATA)_n sites also were lower in *C. caretta* when compared to *C. mydas*, *E. imbricata* and *L. olivacea*, corroborating that *C. caretta* has a probable divergent karyotype evolution from the other Caretteni species.

(GATA)_n sequence can be found in the promoter region of the *Doublesex and mab-3-related transcription factor 1 (Dmrt1)* gene (Raymond *et al.*, 2000). *Dmrt1* is a gene that acts during sex determination stages in reptile development (Kettlewell *et al.*, 2000; Mizoguchi and Valenzuela, 2020), which the sex of the embryos is determined by the incubation temperature of the nest (temperature-dependent sex determination: TSD), the most common mechanism of environmental sex determination (ESD) (Ferreira Júnior, 2009). Although, genotypic sex determination mechanism was described to have evolved independently in five families of turtles (Chelidae, Emydidae, Geoemydidae, Kinosternidae and Trionychidae) (Valenzuela and Adams, 2011; Badenhorst *et al.*, 2013; Rovatsos *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019; Viana *et al.*, 2020), sea turtles species were described as belonging to a TSD lineage (Bickham *et al.*, 1980; Morreale *et al.*, 1982; Yntema and Mrosovsky, 1982; Mrosovsky *et al.*, 1984, 1992; Valenzuela and Adams, 2011; Montiel *et al.*, 2016). Previous *in situ* localization of (GATA)_n in three species of turtles with TSD, using both sexes, detected markers preferably in mc and without evidence of sex-specific chromosomal sites (Mazzoleni *et al.*, 2019). *In situ* location of (GATA)_n in *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* and *L. olivacea* showed accumulations in mc pairs, in addition to a macrochromosome in *E. imbricata*. However, the absence of size heteromorphism between homeologous chromosomes carrying (GATA)_n sites reinforces the condition of the absence of heteromorphic sex chromosomes in this group.

In conclusion, this study corroborates the proposal of the centromere repositioning to explain chromosomal morphology alterations in sea turtle diversification, addressing important concerns to absence of pericentromeric heterochromatin in macrochromosomes of Caretteni, especially in *E. imbricata* and *L. olivacea*. Furthermore, heterochromatic bands and microsatellite sites showed chromosomal differences among *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* and *L. olivacea* karyotypes. These findings encourage further research on the the chromosomal evolution in sea turtle species aiming to understand the diversification of Cheloniidae karyotypes.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministério do Meio Ambiente/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. We are also grateful to Projeto TAMAR/Fundação Pro-Tamar, Aquário Natal, Laboratório de Ecologia e Conservação (LEC) and Citogenética Evolutiva e Conservação (CECA) of Universidade Federal do Paraná, Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CETAF/UFPR) and Associação MarBrasil for supporting the biological material sampling and with laboratory stuff and equipment. CRDM and LG would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES/PROAP - Financial Code 001) for the postgraduate scholarship.

References

- Agrawal S and Ganley ARD (2018) The conservation landscape of the human ribosomal RNA gene repeats. *PloS One* 13: e0207531.
- Amavet P, Markariani R and Fenocchio A (2003) Comparative cytogenetic analysis of the South American alligators *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Reptilia, Alligatoridae) from Argentina. *Caryologia* 56:489-493.
- Amor DJ, Bentley K, Ryan J, Perry J, Wong L, Slater H and Choo KA (2004) Human centromere repositioning “in progress”. *PNAS* 101:6542-6547.
- Arantes LS, Vilaça ST, Mazzoni CJ and Santos FR (2020) New genetic insights about hybridization and population structure of hawksbill and loggerhead turtles from Brazil. *J Hered* 111:444-456.
- Ayres M, Sampaio MM, Barros RMS, Dias LB and Cunha OR (1969) A karyological study of turtles from the Brazilian Amazon region. *Cytogenet Genome Res* 8:401-409.
- Badenhorst D, Stanyon R, Engstrom T and Valenzuela N (2013) A ZZ/ZW microchromosome system in the spiny softshell turtle, *Apalone spinifera*, reveals an intriguing sex chromosome conservation in Trionychidae. *Chromosome Res* 21:137-147.
- Barcellos SA, Kretschmer R, de Souza MS, Costa AL, Degrandi TM, dos Santos MS, de Oliveira EHC, Cioffi MB, Gunski RJ and Garnerio ADV (2019) Karyotype evolution and distinct evolutionary history of the W chromosomes in swallows (Aves, Passeriformes). *Cytogenet Genome Res* 158:98-105.
- Barros RM, Sampaio MM, Assis MF and Ayres M (1976) General considerations on the karyotypic evolution of *Chelonia* from the Amazon region of Brazil. *Cytologia* 41:559-565.
- Bickham JW, Bjorndal KA, Haiduk MW and Rainey WE (1980) The karyotype and chromosomal banding patterns of the green turtle (*Chelonia mydas*). *Copeia* 1980:540-543.
- 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* 1983:918-932.

- Bowen BW and Karl SA (1996) Population genetics, phylogeography, and molecular evolution. In: Lutz PL and Musick, JA (eds) *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, pp. 29–50.
- Cavalcante MG, Bastos CEMC, Nagamachi CY, Pieczarka JC, Vicari MR and Noronha RCR (2018) Physical mapping of repetitive DNA suggests 2n reduction in Amazon turtles *Podocnemis* (Testudines: Podocnemididae). *PLoS One* 13: e0197536.
- Cavalcante MG, Nagamachi CY, Pieczarka JC and Noronha RCR (2020a) Evolutionary insights in Amazonian turtles (Testudines, Podocnemididae): co-location of 5S rDNA and U2 snRNA and wide distribution of Tc1/Mariner. *Biol Open* 9: bio049817.
- Cavalcante MG, Souza LF, Vicari MR, de Bastos CEM, de Sousa JV, Nagamachi Y, Pieczarka C, Martins C and Noronha RCR (2020b) Molecular cytogenetics characterization of *Rhinoclemmys punctularia* (Testudines, Geoemydidae) and description of a Gypsy-H3 association in its genome. *Gene* 738: e144477.
- Charlesworth B, Sniegowski P and Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220.
- Chiari Y, Cahais V, Galtier N and Delsuc F (2012) Phylogenomic analyses support the position of turtles as the sister group of birds and crocodiles (Archosauria). *BMC Biol* 10:65.
- Clemente L, Mazzoleni S, Bellavia EP, Augstenová B, Auer M, Praschag P, Protiva T, Velenský P, Wagner P, Fritz U, *et al.* (2020) Interstitial telomeric repeats are rare in turtles. *Genes* 11:657.
- Deakin JE and Ezaz T (2019) Understanding the Evolution of Reptile Chromosomes through Applications of Combined Cytogenetics and Genomics Approaches. *Cytogenet Genome Res* 157:7-20.
- de Oliveira TD, Kretschmer R, Bertocchi NA, Degrandi TM, de Oliveira EHC, Cioffi MB, Garnero ADV and Gunski RJ (2017) Genomic organization of repetitive DNA in woodpeckers (Aves, Piciformes): Implications for karyotype and ZW sex chromosome differentiation. *PLoS One* 12: e0169987.
- Dutton PH, Davis SK, Guerra T and Owens D (1996) Molecular phylogeny for marine turtles based on sequences of the ND4-leucine tRNA and control regions of mitochondrial DNA. *Mol Phyl Evol*, 5:511-521.
- Ernetti JR, Gazolla CB, Recco-Pimentel SM, Luca EM and Bruschi DP (2019) Non-random distribution of microsatellite motifs and (TTAGGG)*n* repeats in the monkey frog *Pithecopus rusticus* (Anura, Phyllomedusidae) karyotype. *Genet Mol Biol* 42: e20190151.
- Ferreira Júnior PD (2009) Aspectos ecológicos da determinação sexual em tartarugas. *Acta Amazonica* 39:139-154.
- Fukuda T, Katayama M, Kinoshita K, Kasugai T, Okamoto H, Kobayashi K, Kurita M, Soichi M, Donai K, Uchida T *et al.* (2014) Primary fibroblast cultures and karyotype analysis for the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 50:381-383.
- Garrido-Ramos MA (2015) Satellite DNA in plants: more than just rubbish. *Cytogenet Genome Res* 146:153-170.

- Green RE, Braun EL, Armstrong J, Earl D, Nguyen N, Hickey G, Vandewege MW, John JAS, Capella-Gutiérrez S, Castoe TA, *et al.* (2014) Three crocodylian genomes reveal ancestral patterns of evolution among archosaurs. *Science* 346:6215.
- Iannucci A, Svartman M, Bellavita M, Chelazzi G, Stanyon R, Ciofi C (2019) Insights into emydid turtle cytogenetics: the european pond turtle as a model species. *Cytogenet Genome Res* 157:166-71.
- Iverson JB, Brown RM, Akre TS, Near TJ, Le M, Thomson RC and Starkey DE (2007) In search of the tree of life for turtles. *Chel Res Monogr* 4:85–106.
- Kawagoshi T, Nishida C, Ota H, Kumazawa Y, Endo H and Matsuda Y (2008) Molecular structures of centromeric heterochromatin and karyotypic evolution in the Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) (Crocodylidae, Crocodylia). *Chromosome Res* 16:1119.
- Kettlewell JR, Raymond CS and Zarkower D (2000) Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis* 26:174-178.
- Kretschmer R, de Oliveira TD, de Oliveira IF, Silva FAO, Gunski RJ, Garner ADV, Cioffi MB, Oliveira EHCD and Freitas TROD (2018) Repetitive DNAs and shrink genomes: A chromosomal analysis in nine Columbidae species (Aves, Columbiformes). *Genet Mol Biol* 41:98-106.
- Kubat Z, Hobza R, Vyskot B and Kejnovsky E (2008) Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. *Genome* 51:350-356.
- Lara-Ruiz P, Lopez GG, Santos FR, Soares LS (2006) Extensive hybridization in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. *Conserv Genet* 7:773–781.
- Lee L, Montiel EE, Navarro-Domínguez BM, Valenzuela N (2019) Chromosomal rearrangements during turtle evolution altered the synteny of genes involved invertebrate sex determination. *Cytogenet Genome Res* 157:77-88.
- López AE, Hernández-Fernández J and Bernal-Villegas J (2008) Condiciones óptimas de cultivo de linfocitos y análisis parcial del cariotipo de la tortuga cabezona, *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae) en Santa Marta, Caribe Colombiano. *Rev Biol Trop* 56:1459-1469.
- López-Flores I and Garrido-Ramos MA (2012) The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. In: Garrido-Ramos MA (eds) *Repetitive DNA*. Karger Publishers, Basel, vol 7, pp 1-28.
- Louzada S, Lopes M, Ferreira D, Adegas F, Escudeiro A, Gama-Carvalho M and Chaves R (2020) Decoding the Role of Satellite DNA in Genome Architecture and Plasticity - An Evolutionary and Clinical Affair. *Genes* 11:72.
- Machado CRD, Glugoski L, Domit C, Pucci MB, Goldberg DW, Marinho LA, Costa GWWF, Nogaroto V, Vicari MR (2020) Comparative cytogenetics of four sea turtle species (Cheloniidae): G-banding pattern and in situ localization of repetitive DNA units. *Cytogenet Genome Res* 160:531-538.

- Matsubara K, O'Meally D, Azad B, Georges A, Sarre SD, Graves JAM, Matsuda Y and Ezaz T (2016) Amplification of microsatellite repeat motifs is associated with the evolutionary differentiation and heterochromatinization of sex chromosomes in Sauropsida. *Chromosoma* 125:111-123.
- Mazzoleni S, Augstenová B, Clemente L, Auer M, Fritz U, Praschag P, Protiva T, Velenský P, Kratochvíl L and Rovatsos M (2019) Turtles of the genera *Geoemyda* and *Pangshura* (Testudines: Geoemydidae) lack differentiated sex chromosomes: the end of a 40-year error cascade for *Pangshura*. *PeerJ* 7:e6241.
- Mizoguchi B and Valenzuela N (2020) Alternative splicing and thermosensitive expression of *Dmrt1* during urogenital development in the painted turtle, *Chrysemys picta*. *PeerJ* 8:e8639.
- Montefalcone G, Tempesta S, Rocchi M and Archidiacono N (1999) Centromere repositioning. *Genome Res* 9:1184-1188.
- Montiel EE, Badenhorst D, Lee LS, Literman R, Trifonov V and Valenzuela N (2016) Cytogenetic insights into the evolution of chromosomes and sex determination reveal striking homology of turtle sex chromosomes to amphibian autosomes. *Cytogenet Genome Res* 148:292-304.
- Morreale SJ, Ruiz GJ and Standor EA (1982) Temperature-dependent sex determination: current practices threaten conservation of sea turtles. *Science* 216:1245-1247.
- Mrosovsky N, Dutton PH and Whitmore CP (1984) Sex ratios of two species of sea turtle nesting in Suriname. *Can J Zool* 62:2227-2239.
- Mrosovsky N, Bass A, Corliss LA, Richardson JI and Richardson TH (1992) Pivotal and beach temperatures for hawksbill turtles nesting in Antigua. *Can J Zool* 70:1920-1925.
- Naro-Maciel E, Le M, FitzSimmon NN and Amato G (2008) Evolutionary relationships of marine turtles: a molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes. *Mol Phyl Evol* 49:659–662.
- Nishida C, Ishijima J, Ishishita S, Yamada K, Griffin DK, Yamazaki T and Matsuda Y (2013) Karyotype reorganization with conserved genomic compartmentalization in dot-shaped microchromosomes in the Japanese mountain hawk-eagle (*Nisaetus nipalensis orientalis*, Accipitridae). *Cytogenet Genome Res* 141:284-294.
- Noletto RB, Kantek DLZ, Swarça AC, Dias AL, Fenocchio AS and Cestari MM (2006) Karyotypic characterization of *Hydromedusa tectifera* (Testudines, Pleurodira) from the upper Iguaçú River in the Brazilian state of Paraná. *Genet Mol Biol* 29:263-266.
- Noronha RCR, Barros LMR, Araújo REF, Marques DF, Nagamachi CY, Martins C and Pieczarka JC (2016) New insights of karyoevolution in the Amazonian turtles *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemidae). *Mol Cytogenet* 9:73.
- Olmo E (2008) Trends in the evolution of reptilian chromosomes. *Integr Comp Biol* 48:4.
- Parham JF and Fastovsky DE (1997) The phylogeny of cheloniid marine turtles revisited. *Chel Cons Biol* 2:548–554.
- Pereira AG, Sterli J, Moreira FR and Schrago CG (2017) Multilocus phylogeny and statistical biogeography clarify the evolutionary history of major lineages of turtles. *Mol Phylogenet Evol* 113:59–66.

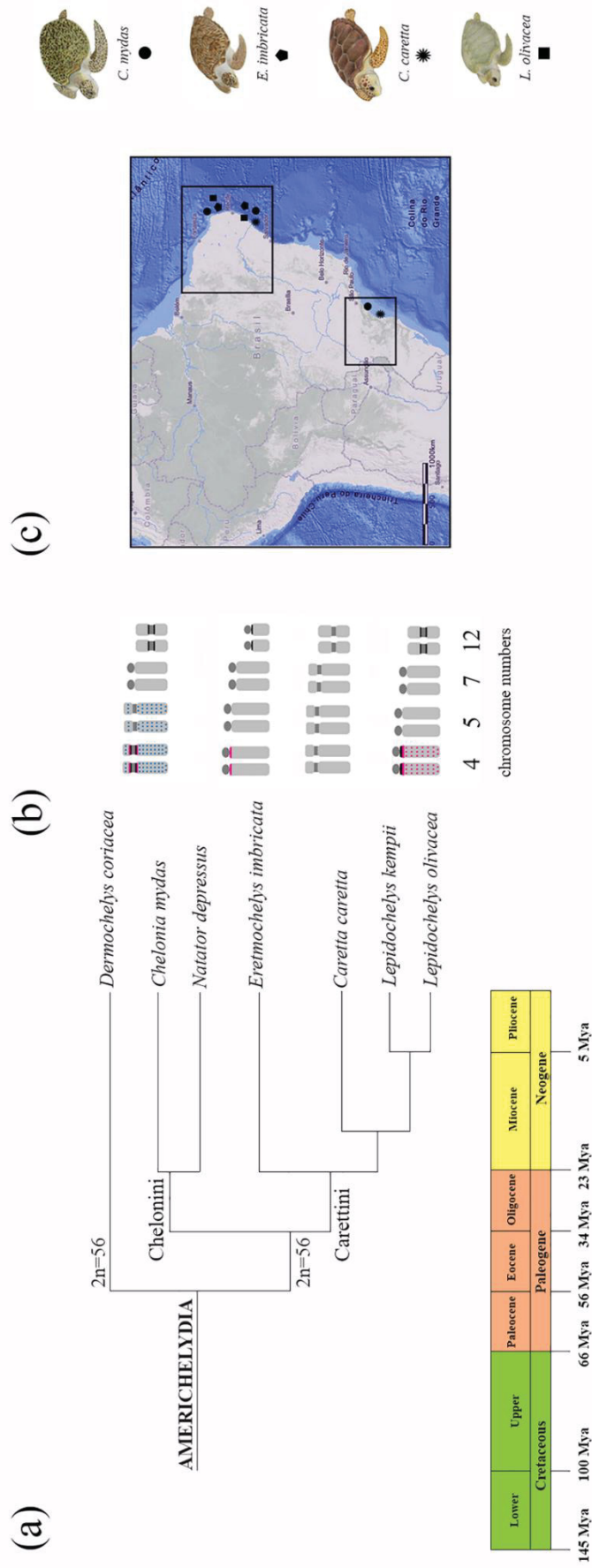
- Pokorná M, Giovannotti M, Kratochvíl L, Kasai F, Trifonov VA, O'Brien PC, Caputo V, Olmo E, Malcolm A, Ferguson-Smith, et al. (2011a) Strong conservation of the bird Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 million years divergence. *Chromosoma* 120:455.
- Pokorná M, Kratochvíl L, Kejnovský E (2011b) Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genet* 12:90.
- Pritchard PCH (1997) Evolution, phylogeny and current status. In: Lutz PL and Musick, JA (eds) *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, pp 1–28.
- Proietti MC, Reisser J, Marins LF, Marcovaldi MA, Soares LS, Monteiro DS, Wijeratne S, Pattiaratchi C and Secchi, ER (2014) Hawksbill × loggerhead sea turtle hybrids at Bahia, Brazil: where do their offspring go? *PeerJ* 2:e255.
- Pucci MB, Barbosa P, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Foresti F, Moreira-Filho O and Vicari MR (2016) Chromosomal spreading of microsatellites and (TTAGGG)_n sequences in the *Characidium zebra* and *C. gomesi* genomes (Characiformes: Crenuchidae). *Cytogenet Genome Res* 149:182-190.
- Rao SR, Trivedi S, Emmanuel D, Merita K and Hynniewta M (2010) DNA repetitive sequences-types, distribution and function: a review. *J Cell Mol Biol* 7:1-11.
- Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ and Zarkower D (2000) *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Gene Dev* 14:2587-2595.
- Rodríguez PA, Ortiz ML and Bueno ML (2003) Agentes mitogénicos para cultivos de linfocitos en quelonios. *Orinoquia* 7:47-49.
- Rovatsos M, Praschag P, Fritz U and Kratochvíl L (2017) Stable Cretaceous sex chromosomes enable molecular sexing in softshell turtles (Testudines: Trionychidae). *Sci Report* 7:42150.
- Ruiz-Ruano FJ, Cuadrado Á, Montiel EE, Camacho JPM and López-León MD (2015) Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. *Chromosoma* 124:221-234.
- Schemberger MO, Nascimento VD, Coan R, Ramos É, Nogaroto V, Zienniczak K, Valente GT, Moreira-Filho O, Martins C and Vicari MR (2019) DNA transposon invasion and microsatellite accumulation guide W chromosome differentiation in a Neotropical fish genome. *Chromosoma* 128:547-560.
- Schweizer D and Loidl, J (1987) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chromosomes Tod* 9:61-74.
- Sites JJW, Bickham JW, Haiduk MW and Iverson JB (1979) Banded karyotypes of six taxa of kinosternid turtles. *Copeia* 1979:692-698.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304-306.
- Sumner AT (2003) *Chromosomes organization and function*. Blackwell Science Ltd., North Berwick, 294 pp.

- Tautz D (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena SD (eds) DNA fingerprinting: State of the science. Birkhäuser, Basel, pp 21-28.
- Torres GA, Gong Z, Iovene M, Hirsch CD, Buell CR, Bryan GJ, Novák P, Jirí M and Jiang J (2011) Organization and evolution of subtelomeric satellite repeats in the potato genome. *G3: Genes Genom Genet* 1:85-92.
- Tóth G, Gáspári Z and Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res* 10:967-981.
- Valenzuela N and Adams DC (2011) Chromosome number and sex determination co-evolve in turtles. *Evolution* 65:1808–1813.
- Ventura M, Archidiacono N and Rocchi M (2001) Centromere emergence in evolution. *Genome Res* 11:595-599.
- Viana PF, Feldberg E, Cioffi MB, de Carvalho VT, Menezes S, Vogt RC, Liehr T and Ezaz T (2020) The Amazonian Red Side-Necked Turtle *Rhinemys rufipes* (Spix, 1824) (Testudines, Chelidae) has a GSD Sex-Determining Mechanism with an Ancient XY Sex Microchromosome System. *Cells* 9:2088.
- Xiao YL and Peterson T (2000) Intrachromosomal homologous recombination in *Arabidopsis* induced by a maize transposon. *Mol Gen Genet* 263:22-29.
- Yntema CL and Mrosovsky N (1982) Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. *Can J Zool* 60:1012-1016.
- Zattera ML, Gazolla CB, Soares ADA, Gazoni T, Pollet N, Recco-Pimentel SM and Bruschi DP (2020) Evolutionary Dynamics of the Repetitive DNA in the Karyotypes of *Pipa carvalhoi* and *Xenopus tropicalis* (Anura, Pipidae). *Front Genet* 11:637.
- Ziemniczak K, Traldi JB, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Moreira-Filho O and Vicari MR (2014) In situ localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n repeated DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Cytogenet Genome Res* 144:325-332.

Internet Resources

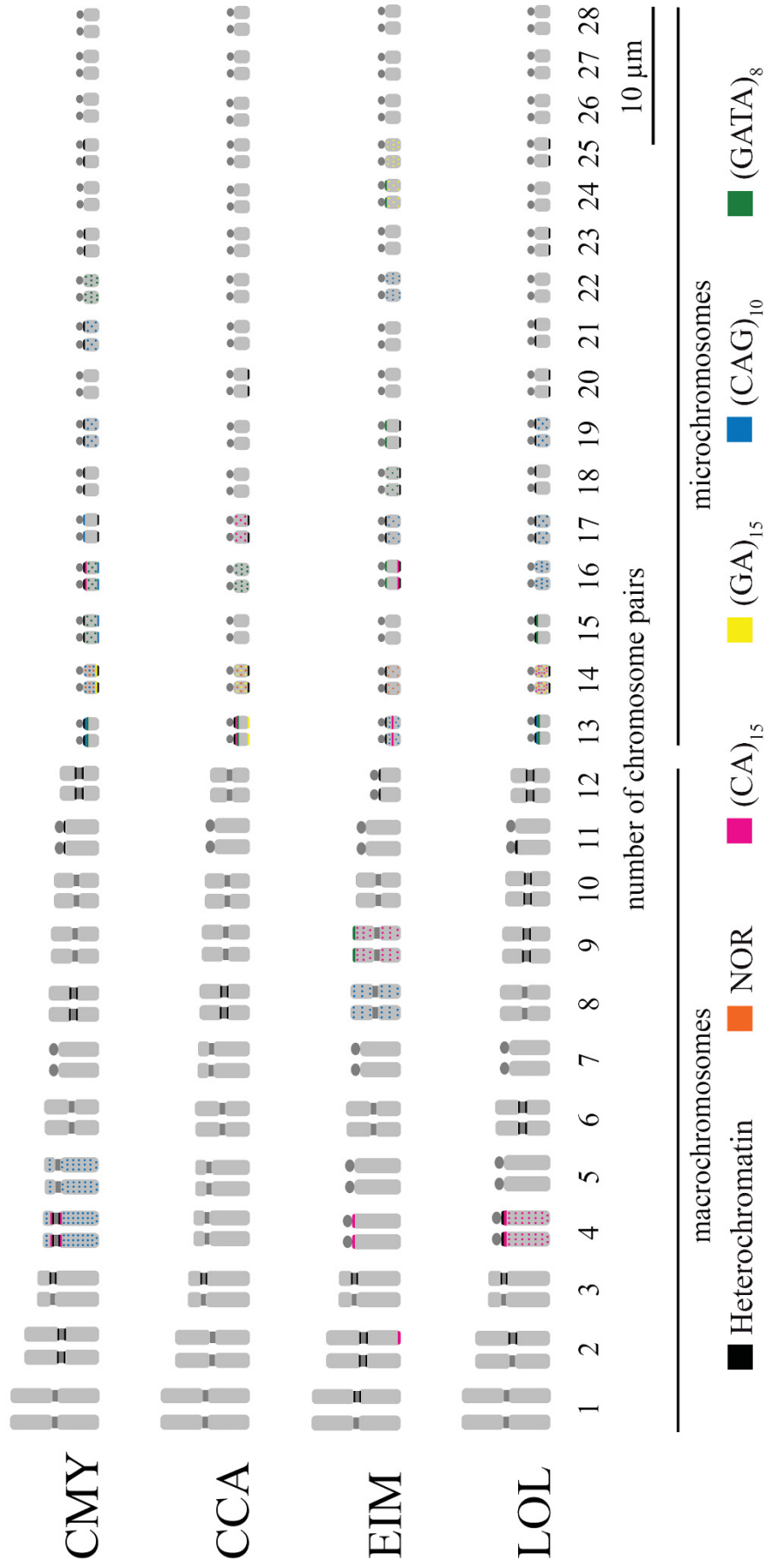
- IUCN (2020) The IUCN red list of threatened species, Version 2020-1, <https://www.iucnredlist.org>. (accessed 19 March 2020).

Figure 1 – Phylogeny, sampled area, and details of chromosome changes in four Cheloniidae species: In (a) phylogeny and ancestral reconstruction of sea turtle species adapted from Pereira *et al.* (2017); In (b), representative idiograms of the pairs 4, 5, 7 and 12 involved in chromosomal changes among sea turtle species; and (c) partial map of South America showing sea turtles sampled in different places in the Brazil and referred by geometric forms, *C. mydas* (circle), *E. imbricata* (pentagon), *C. caretta* (asterisk), and *L. olivacea* (square). Images of sea turtles (Source: Projeto Tamar).



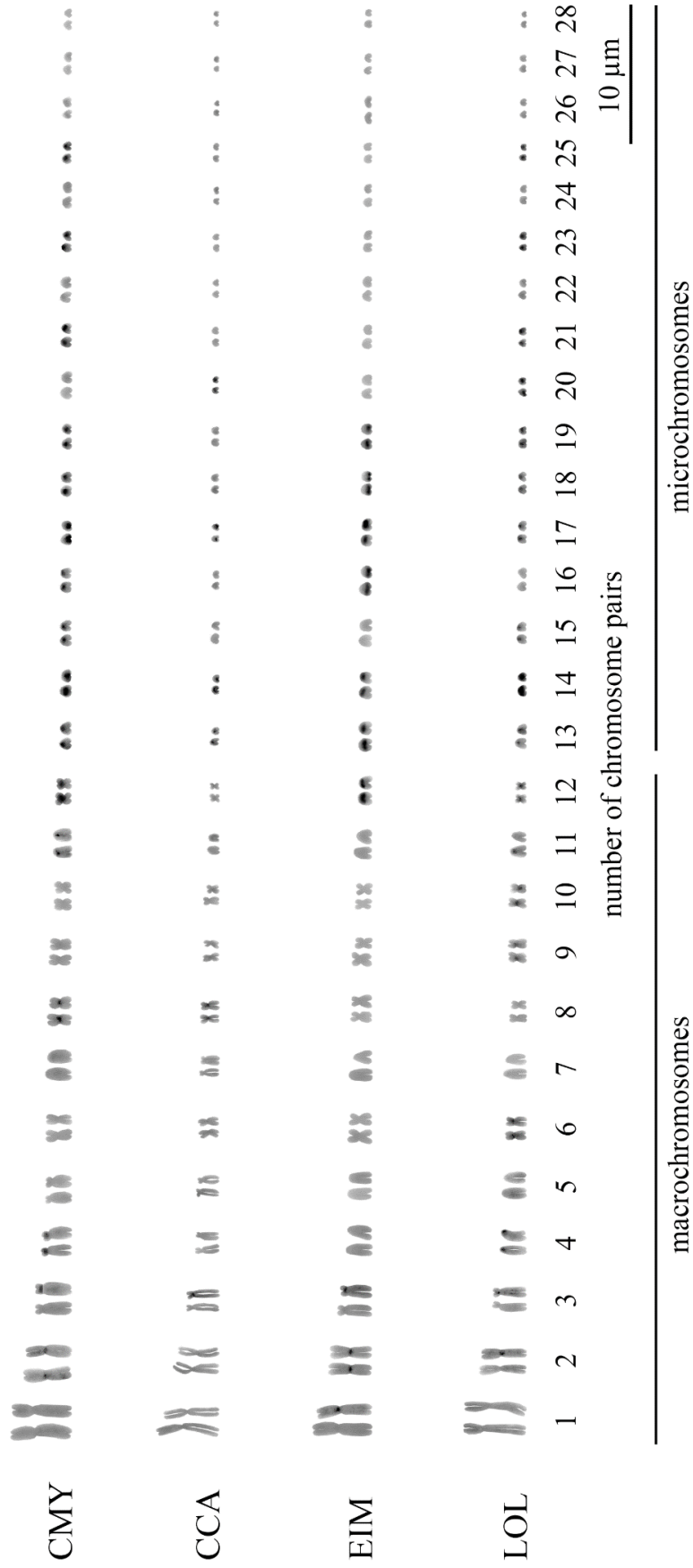
Source: The author (2020).

Figure 2 – Representative idiograms of heterochromatic regions, NOR and microsatellite motifs on the chromosomes of the four sea turtle species. The species names were referred by their 3-letter acronym: *C. mydas* (CMY), *C. caretta* (CCA), *E. imbricata* (EIM) and *L. olivacea* (LOL).



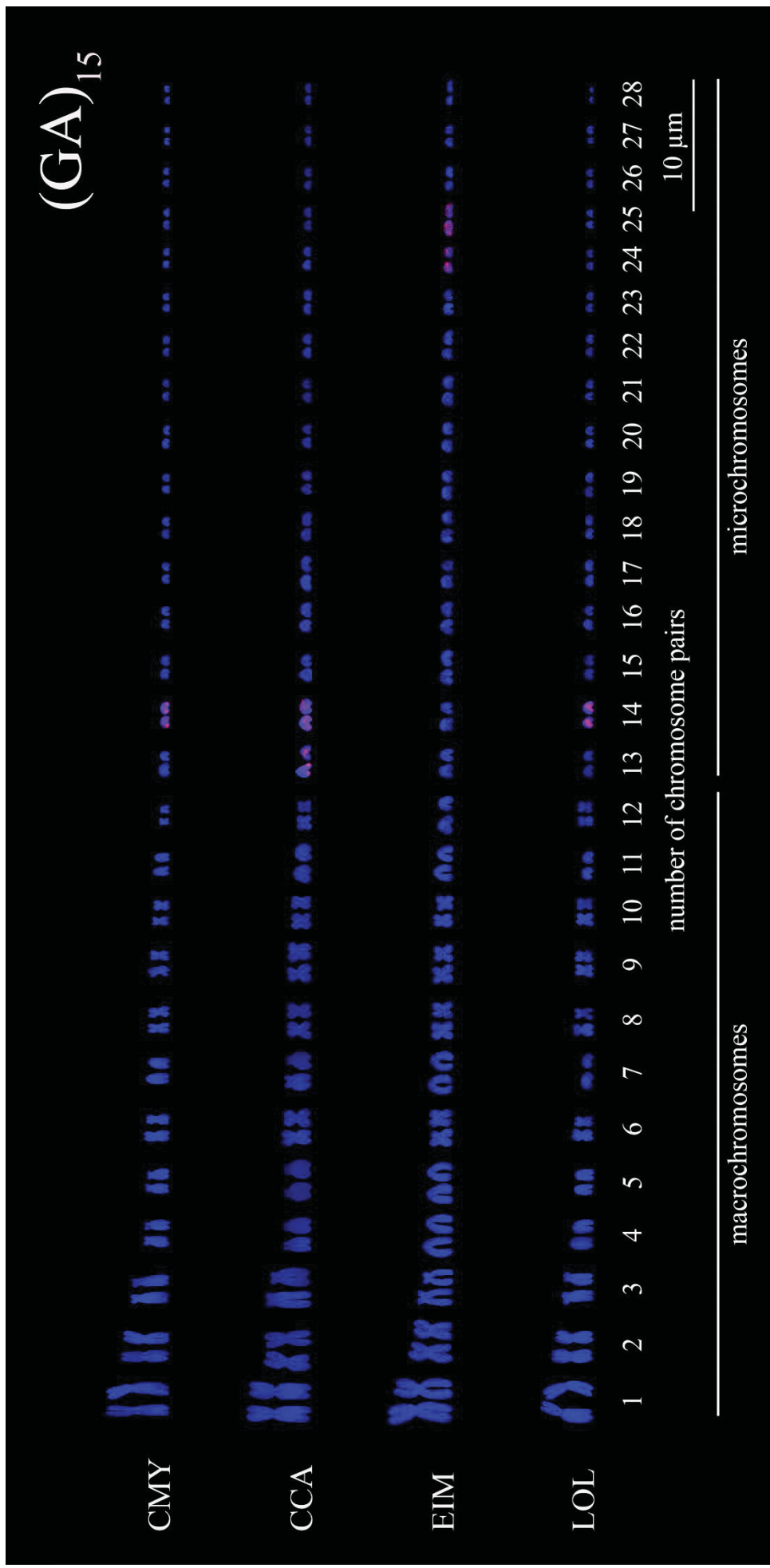
Source: The author (2020).

Figure 3 – Karyotypes of sea turtle species subjected to C-banding. The species names were referred by their 3-letter acronym: *C. mydas* (CMY), *C. caretta* (CCA), *E. imbricata* (EIM) and *L. olivacea* (LOL).



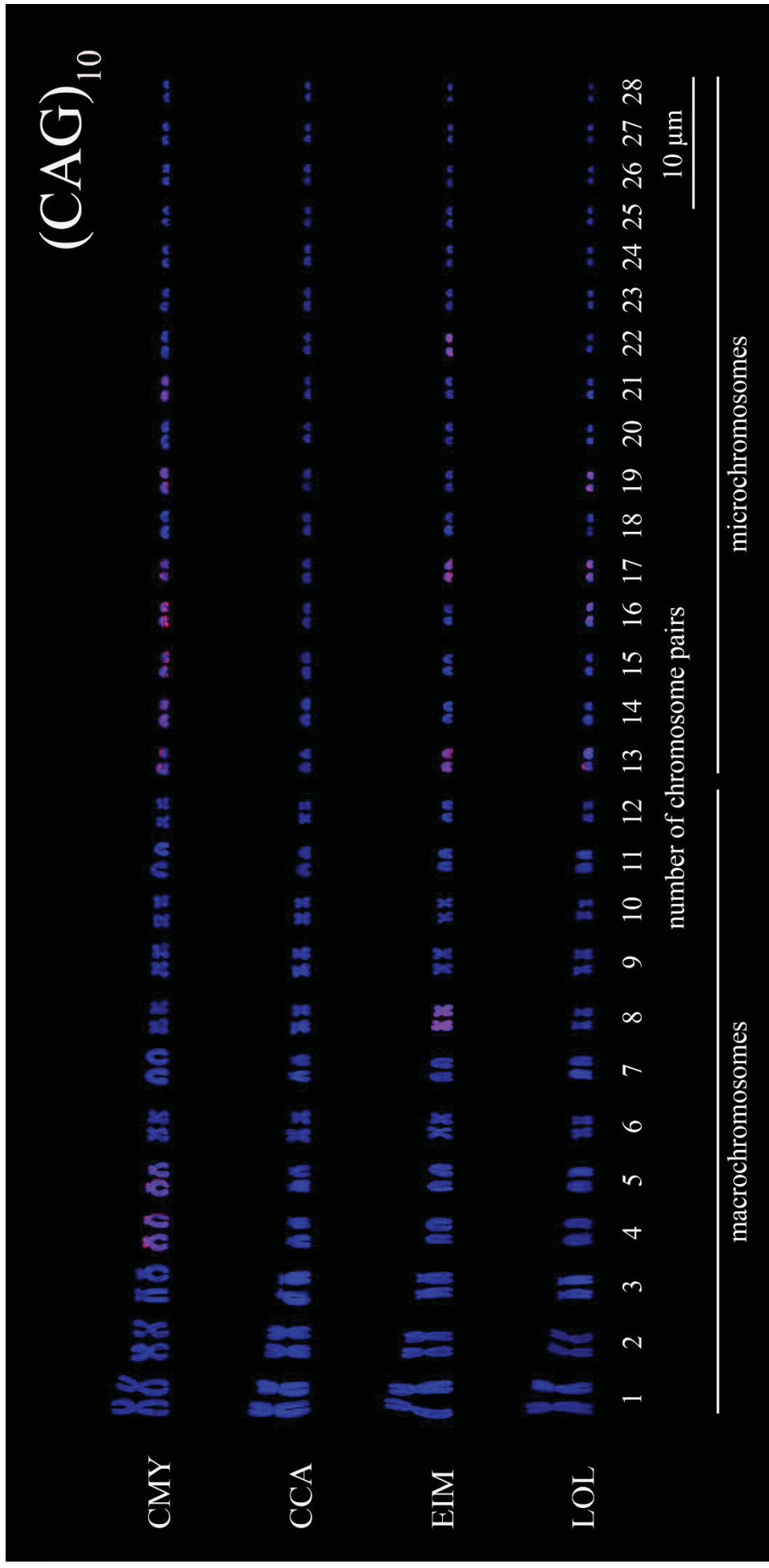
Source: The author (2020).

Figure 5 – Karyotypes of sea turtle species subjected to FISH using $(GA)_{15}$ microsatellites probes (*red signals*). The species names were referred by their 3-letter acronym: *C. mydas* (CMY), *C. caretta* (CCA), *E. imbricata* (EIM) and *L. olivacea* (LOL).



Source: The author (2020).

Figure 6 – Karyotypes of sea turtle species subjected to FISH using (CAG)₁₀ microsatellites probes (*red signals*). The species names were referred by their 3-letter acronym: *C. mydas* (CMY), *C. caretta* (CCA), *E. imbricata* (EIM) and *L. olivacea* (LOL).



Source: The author (2020).

Supplementary material

Table S1 – Data of the sea turtle species sampled in Brazilian coast or obtained in captive condition.

| Species | Samples | Condition | Localities | GPS |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------|---|----------------------------|
| <i>Chelonia mydas</i> | 3 juveniles | Captive | Aquário Natal; Extremoz – RN | 5°43'53" S; 35°12'16" W |
| | 15 juveniles | Wild | Cobras Island; Pontal do Sul – PR | 25°28'55"S; 48°25'56"W |
| | 1 ♀ and 8 juveniles | Captive | Projeto TAMAR; Mata de São João - BA | 12°34'38"S; 38°00'07"W |
| <i>Caretta caretta</i> | 1 ♂ and 2 ♀ | Captive | Projeto TAMAR; Florianópolis – SC | 27°34'19"S; 48°25'40"W |
| | 1 ♂, 3 ♀ and 5 juveniles | Captive | Projeto TAMAR; Mata de São João - BA | 12°34'38"S; 38°00'07"W |
| <i>Eretmochelys imbricata</i> | 2 ♀ | Wild | Minas Beach; Tibau do Sul – RN | 6°14'27"S; 35°02'16"W |
| | 4 juveniles | Captive | Projeto TAMAR; Mata de São João - BA | 12°34'38"S; 38°00'07"W |
| <i>Lepidochelys olivacea</i> | 3 juveniles | Captive | Aquário Natal; Extremoz – RN | 5°43'53" S; 35°12'16" W |
| | 1 ♂ and 2 juveniles | Captive | Projeto TAMAR; Mata de São João- BA | 12°34'38"S; 38°00'07"W |

Source: The author (2020). Note: BA = Bahia state; RN = Rio Grande do Norte state; PR = Paraná state; SC = Santa Catarina state.

4.1 CAPÍTULO II

**Integrating morphological, molecular, and cytogenetic data for F2 sea turtle hybrids
diagnosis revealed apparently balanced chromosomal sets**

Em elaboração para ser submetido ao periódico Heredity

**Integrating morphological, molecular, and cytogenetic data for F2 sea turtle hybrids
diagnosis revealed apparently balanced chromosomal sets**

Caroline Regina Dias Machado¹, Camila Domit², Marcela Baer Pucci³, Larissa Glugoski⁴,
Camilla Borges Gazolla¹, Matheus Azambuja dos Santos¹, Rafael Bonfim de Almeida⁵, Gabriel
Fraga da Fonseca², Thais Torres Pires⁶, Viviane Nogaroto⁷, Marcelo Ricardo Vicari^{1,7*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 100, 81530-000, Curitiba, Ponta Grossa, Paraná State, Brazil.

² Laboratório de Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, Av. Beira Mar, 83255-000, Pontal do Paraná, Paraná State, Brazil.

³ Departamento de Saúde II, Universidade Nove de Julho, R. Nicolau Assis, 15, 17011-102, Bauru, São Paulo State, Brazil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, 13565-905, São Carlos, São Paulo State, Brazil.

⁵ Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina, R. Vidal Ramos, 89460-000, Canoinhas, Santa Catarina State, Brazil.

⁶ Fundação Projeto Tamar, Av. do Farol, 48280-000, Mata de São João, Bahia State, Brazil.

⁷ Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná State, Brazil.

* Corresponding author: Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná State, Brazil. Tel.: +55 42 2102-8135; e-mail: vicarimr@uepg.br, <https://orcid.org/0000-0003-3913-9889>

Abstract

Hybridization could be considered part of the evolutionary history of many species of plants and animals. The process of hybridization among sea turtle species on the Brazilian coast is atypical and occurs where the nesting areas and reproductive seasons overlap. However, integrated morphology and genetics analysis are lacking, mainly to demonstrate the chromosome sets arrange in sea turtle interspecific hybrids. In this study, cytogenetic approaches already established for pure sea turtle species were allied with morphological and molecular analyses aiming recognize genetic composition and balanced chromosome sets occurrence in two possible interspecific hybrids recognized by mixed morphology. The integrated analyses were performed in two hybrids, here named *A* and *B*. The data showed that *hybrid A* is an F2 among *Caretta caretta* x *Eretmochelys imbricata* x *Chelonia mydas* while *hybrid B* could be the result of backcross among *C. caretta* x *Lepidochelys olivacea*. Introgressed alleles were reported, and despite this was verified that the chromosome sets are still balanced, which could explain why the hybridism did not bring grave consequences for analyzed individuals until the present. However, how hybridism can affect the species genetics in a long term is a concern, and the consequences of the crossing-over in hybrid chromosomal sets and the effects over genes regulation still are unpredictable.

Keywords: Balanced chromosome sets; diagnostics chromosomes; introgression.

Introduction

Natural hybridization is the successful interbreeding among genetically distinct populations (Harrison, 1993, 2014; Rhymer and Simberloff, 1996; Bérubé and Palsbooll, 2018), either distinct species or subspecies, combining different and previously isolated gene pools (Pielt et al., 2015; Bérubé and Palsboll, 2018). That kind of interbreeding could lead to different genetic outcomes, such as: (i) a parental generation from genetically distinct populations produces a first-generation hybrid (F1); (ii) F1 generation produces a second-generation hybrid (F2) and (iii) when hybrids interbreed repeatedly with the parental generation, backcrosses happen and the hybrids get more genetically similar to that parental species (Purves et al., 2001; Pielt et al., 2015). The continuous process of hybridization could lead to introgression, when the alleles from one species incorporate into the gene pool of a distinct species (Rhymer and Simberloff, 1996; Vilaça et al., 2012).

Hybridization has been considered part of the evolutionary history of many species of plants and animals (Vilaça et al., 2012). Considering species where hybridization is rare, e.g., in vertebrates, hybrid individuals are usually inviable or sterile, keeping the genetic integrity of the parental species (Mayr, 1963). On the other hand, species that commonly hybridize tend to produce viable hybrids that could reproduce and in consequence reduce or even eliminate the reproductive isolation between the parental species. The genetics introgression could also lead to speciation, hybrid vigor, and creates permanent hybrid zones (Lehman et al., 1991; Rhymer and Simberloff, 1996; Allendorf et al., 2001; Abbott et al., 2013; Bérubé and Palsboll, 2018). Therefore, the hybridization event can be considered either as a negative process - contributing to the extinction of some species or, a positive process - contributing to population adaptation, rescuing populations threatened by inbreeding, maintenance, and preserving biodiversity (Pekkala et al., 2012; Pielt et al., 2015).

All Cheloniidae species that share Brazilian beaches as nesting grounds have suffered under prolonged anthropogenic pressure, which has caused the decline of the populations (Lara-Ruiz et al., 2006; IUCN, 2021). The loggerhead turtle (*Caretta caretta*), the olive ridley (*Lepidochelys olivacea*), the green turtle (*Chelonia mydas*), and the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) have been involved in hybridization processes (Lara-Ruiz et al., 2006; Vilaça et al., 2012; Vilaça and Santos, 2013; Proietti et al., 2014; Soares et al., 2017, 2018; Arantes et al., 2020a, 2020b). The sea turtle hybridism in the northeastern Brazilian coast is atypical, reaching 42% of hybrid females in nesting sites, higher than in any other analyzed population worldwide (Lara-Ruiz et al., 2006; Reis et al., 2010a, 2020b; Arantes et al., 2020a).

Hybridization zones occur where the nesting areas and reproductive seasons overlap, considering two or more species of sea turtles (Soares et al., 2017). Studies have shown that most of the hybrids are F1, while introgression (F2 hybrids) was confirmed only in hatchlings (Arantes et al., 2020a). This fact suggests that F2 hybrids may not survive to adulthood or the hybridization event in Brazil is more recent than it was thought before, and it started one generation ago (about 20 years) (Vilaça et al., 2012; Arantes et al., 2020a).

Sea turtles are known for displaying significant phenotypic variability regarding the number and shape of carapace scutes and head scales (Mast and Carr, 1989; Pritchard and Mortimer, 1999; Wyneken, 2001; Ozdemir and Turkozan, 2006; Sim et al., 2014). However, this variability can also occur due to hybridization, making the analysis of morphological parameters one of the first steps to identify potentially hybrid sea turtles, screening them for further genetic analysis (Sim et al., 2014; Kelez et al., 2016; Ounissi et al., 2016; Hart et al., 2019). Studies of hybrid genetics involving molecular markers allow the study of hybridization events with better precision than morphology-based approaches (Seminoff et al., 2003; Vilaça et al., 2012).

Cytogenetic is a tool that could be great useful in identifying hybrids species based on the karyotypes, as documented for the genus *Mazama* (Galindo et al., 2021), *Sus scrofa* (Wnuk et al., 2005), Amphibia (Haddad et al., 1994) and in different genera of fish (Goes et al., 2020; Káldy et al., 2020). It turns into an essential tool because hybrids are result of two different chromosomes sets which could promote reproductive isolation and speciation since these differences can trigger a series of errors during meiosis, such as incorrect pairing of parental chromosomes, errors in chromosome segregation, and during crossing-over (Dobigny et al., 2017; Galindo et al., 2021). These meiosis defects prevent genetic introgression and have a deleterious effect on the individual reproductive fitness (King, 1993; Faria and Navarro, 2010; Dobigny et al., 2017; Barbosa et al., 2017).

Sea turtles from Cheloniidae are recognized for having a similar karyotype which probably allows the successful hybridization among different species (Bickham, 1981; Karl et al., 1995). Studies showed species-specific markers on the chromosomes of Cheloniidae, identified by classical and molecular cytogenetics, which could be useful in studies on the karyotypic structures of interspecific hybrids (Machado et al., 2020a, 2020b). Here, an integrated analysis of morphological, molecular markers, and cytogenetic was applied to evaluated two new putative hybridization cases in sea turtle aiming investigate the chromosomal sets arranges in living hybrids.

Material and Methods

Sampling and chromosome preparation

Biological samples were obtained from four sea turtles species of Cheloniidae that nidificate on the Brazilian coast: (i) wild *C. mydas* from Cobras Island, Paraná state and captive *C. mydas* from Extremoz, Rio Grande do Norte state and Mata de São João, Bahia state (N = 28: 1 female and 27 juveniles); (ii) captive *C. caretta* from Florianópolis, Santa Catarina state, Pontal do Sul, Paraná state and Mata de São João (N = 12: 2 males, 5 females, and 5 juveniles); (iii) wild *E. imbricata* from Tibau do Sul, Rio Grande do Norte state and captive *E. imbricata* from Mata de São João (N = 6: 2 females and 4 juveniles); and (iv) captive *L. olivacea* from Extremoz and Mata de São João (N = 6: 1 male and 5 juveniles) (ICMBio, licence number 52218-8; 43433-2/3) (Supplementary material: Table S1). Among these samples, two juveniles previously classified as *C. mydas* (captive individual) and *C. caretta* (rehab individual) were identified by a superficial morphological analysis as probable hybrids. So, both were submitted to a morphological, molecular markers, and cytogenetic analysis to hybrids recognition, and after confirmation were named here as *Hybrid A* and *Hybrid B*. All experimental procedures were authorized and performed following the Ethical Committee on Animal Use of the Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocol: 7200/2016).

Morphological analyses

Morphological traits of both hybrids were analyzed, comparing those observed to previous anatomic descriptions (Pritchard and Mortimer, 1999; Wyneken, 2001). First, the number of prefrontal and postorbital scales of the hybrids were counted, followed by the count of vertebral, lateral, nuchal, marginal, and supracaudal carapace scutes. Second, some valuated secondary characteristics were evaluated as the overall shape of the head and carapace of the individuals, plastron scute patterns, and the number of claws in flippers (Pritchard and Mortimer, 1999; Wyneken, 2001; Sim et al., 2014; Ounissi et al., 2016). All morphological analyses using photographs of hybrids *A* and *B* were performed in Adobe Photoshop 2020 software.

Mitochondrial and nuclear DNA sequences obtention

Tissue samples for DNA extraction were collected from the flippers of the *hybrid A* and *hybrid B* sea turtles. Genomic DNA were extracted using ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega, Madison, Wi, USA) following manufacturer's instructions. In order to

recognize species-specific alleles in hybrids *A* and *B*, and identify parental species, the sequences of the mitochondrial DNAs (mtDNA) *12S* and *16S*; and three nuclear DNA (nucDNA) markers (an exon of brain-derived neurotrophic factor – *BDNF*; an exon of oocyte maturation factor – *Cmos* -; and an intron of RNA fingerprint protein 35 gene - *R35*) were amplified using the primers set described in Table 1. The amplification reaction mixture contained 40 ng genomic DNA, 0.2 µM forward and reverse primers, 0.16 mM dNTPs, 1U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 1.5 mM MgCl₂ in reaction buffer (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl). The PCR conditions were as follows: 5 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 s at 95°C, 45 s at annealing temperature, and 2 min at 72°C, and finally 7 min at 72°C. Amplicons were purified using the GFX™ PCR DNA and Gel DNA Purification (Ludwig Biotechnologia, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brazil) and sequenced on an ABI-PRISM Genetic Analyzer equipment (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Table 1. Primer sequences used to amplify the rDNAs, mitochondrial and nuclear sequences with annealing temperatures and respective references.

| <i>Gene</i> | <i>Primer Forward/Reverse (5' – 3')</i> | Annealing temperature (°C) | Reference |
|-------------|--|-----------------------------------|-------------------------------|
| 5S | GCCACACCACCTGAACAC GCCTACGACACCTGGTATTC | 58.5 | Suárez et al. (2007) |
| 18S | GTACAGTGAAACTGCGAATG CCTCGTTCATGGGGAATAAT | 57.0 | Machado et al. (2020a) |
| 12S | AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCACTAT TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT | 62.0 | Kocher et al. (1989) |
| 16S | CGCCTGTTTATCAAAAACAT CCGGTCTGAACTCAGATCACGT | 60.0 | Romano and Palumbi. (1997) |
| BDNF | GACCATCCTTTTCTKACTATGGTTATTTTCATACTT CTATCTTCCCCTTTTAATGGTCAGTGACAAAC | 60.0 | Noonan and Chippindale (2006) |
| Cmos | GCCTGGTGCTCCATCGACTGGGATCA GTAGATGTCTGCTTTGGGGGTGA | 62.0 | Le et al. (2006) |
| R35 | ACGATTCTCGCTGATTCTTGC GCAGAAAACCTGAATGTCTCAAAGG | 62.0 | Fujita et al. (2004) |

Source: The author (2021).

Molecular analyses of Hybrids

Sequences of mtDNA and nucDNA were checked and corrected in the software Geneious v 7.1.9 (Kearse et al., 2012) and heterozygous sites in nucDNAs sequences were identified by visual inspection of the two phases of sequencing reads (forward and reverse). mtDNA and nucDNA sequences from pure species (Naro-Maciel et al., 2008; Vilaça et al.

2012) for *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* and *L. olivacea* were mined from GenBank (Supplementary material: Table S2) and aligned with the hybrid's sequences using the ClustalW algorithm implemented in Geneious. For the nucDNAs sequences the phased haplotypes were determined using the PHASE tool (Stephens and Donnelly, 2003) available in DnaSP v5 (Librado and Rozas, 2009). The PHASE runs were conducted under default parameters (100 iterations with 100 burn-in and thinning interval of 10) and a minimum posterior probability of the haplotypes as 0.9. The haplotype (h) and nucleotide (π) diversities and the numbers of polymorphic (S) and parsimony informative sites for each gene were calculated in DnaSP v5. A haplotype network for each gene was generated through the Median Joining criterion (Bandelt et al., 1999) in PopArt 1.7 (Leigh and Bryant, 2015).

Cytogenetic analyses

Chromosomal preparations were obtained by temporary culture of lymphocytes method using peripheral blood (Rodríguez et al., 2003). The slides containing chromosomal preparations were submitted to conventional 5% Giemsa staining with pH 6.8 phosphate buffer, C-banding (Sumner, 1972), G-banding (Seabright, 1971), and to fluorescence *in situ* hybridization (FISH) assays.

For *in situ* localization experiments, the 5S ribosomal DNA (rDNA) sequence was amplified by polymerase chain reaction (PCR, see primers in table 1) using pure species genomic DNAs as templates, while the 18S rDNA sequence is the same used in Machado et al. (2020a). The partial 5S rDNA and 18S rDNA sequences obtained from *C. mydas* were labeled as probes by PCR using digoxigenin-11-dUTP and biotin-16-dUTP (Jena Bioscience, Dortmund, Germany), respectively. In addition to rDNA probes, the microsatellites previously hybridized on the chromosomes of all four sea turtle species (Machado et al., 2020b) were used in the hybrid specimens' metaphases. These microsatellites, (CA)₁₅, (GA)₁₅ and (GATA)₈ were directly labelled with Cy5 fluorochrome (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) at the 5' end during DNA synthesis.

FISH was performed according to the protocol proposed by Pinkel et al. (1986) and were conducted under high stringency conditions. The hybridization mixture (2.5 ng/ μ L probe, 50% formamide, 2 \times saline-sodium citrate buffer, and 10% dextran sulfate) was applied to the slides, which were then incubated for 16 h at 37°C. Anti-digoxigenin rhodamine (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) and Streptavidin Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) antibodies were used only for 5S and 18S rDNA probe detection.

Chromosomes were counterstained with 0.2 µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole - DAPI (Sigma-Aldrich) in the VECTASHIELD mounting medium (Vector, Burlingame, CA, USA). The images were captured in DFC3000 G CCD camera coupled in epifluorescence microscope Leica DM 2000 (Leica, Wetzlar, Germany). Twenty metaphases were analyzed per sampled hybrid for rDNAs and microsatellites signals detection.

Chromosomes from sea turtle hybrids *A* and *B* were arranged by decreasing size and centromere position based on the karyotypes of the pure species as published by Machado et al. (2020a, 2020b), classified as bi-armed (meta/submetacentric and subtelocentric) and one-armed (acrocentric), and as macrochromosomes or microchromosomes (mc), according to Bickham et al. (1980). In order to make a better comparison with hybrid karyotypes, representative idiograms of the karyotype organization of the four pure species were designed, illustrating the data obtained in the present study (5S rDNA) and those of Machado et al. (2020a, 2020b).

Results

Morphological analyses

The scales and scutes of both hybrid individuals were counted and different pattern alterations were observed in each sea turtle (Table 2). *Hybrid A*, which presents general morphological characteristics of a *C. mydas*, also has similar traits to three other Cheloniidae species (Figure 1). The three postocular scales are observed in *C. caretta*, *E. imbricata*, and *L. olivacea*, while the number of vertebral and lateral scutes equal those of *L. olivacea* (Figure 1a and 2). Analysis of secondary morphological traits revealed strongly serrated marginal scutes, similar to *C. caretta* and *E. imbricata*, an overall shape of the carapace similar to *C. caretta*, and lightly imbricated carapace scutes as in *E. imbricata* (Figure 1b-c and 2).

Hybrid B presents the overall morphology of a *C. caretta* while having traits similar to those observed in *L. olivacea* (Figure 1). In this hybrid, an extra vertebral scute was noted (Table 2). Posterior analysis of the *Hybrid B* morphology revealed more traits comparable to olive ridley sea turtles, such as an overall rounded shape of the carapace, marginal scutes without *C. caretta* characteristic serration (Figures 1f and 2), a single claw on each flipper, and a 4th inframarginal scute on the left side of the plastron (Figure 1d-e).

Table 2. Head scales and carapace scutes numbers for *C. caretta*, *C. mydas*, *E. imbricata*, *L. olivacea* and Hybrids A and B.

| | | <i>Chelonia mydas</i> | | <i>Caretta caretta</i> | | <i>Eretmochelys imbricata</i> | | <i>Lepidochelys olivacea</i> | | Hybrid A | | Hybrid B | |
|-----------------|-------------|-----------------------|----|------------------------|----|-------------------------------|----|------------------------------|----|----------|----|----------|----|
| | | L | R | L | R | L | R | L | R | L | R | L | R |
| Head scales | Prefrontal | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| | Postocular | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Lateral | 4 | 4 | 5 | 5 | 4 | 4 | ≥6 | ≥6 | 6 | 4 | 5 | 5 |
| Carapace scutes | Vertebral | 5 | | 5 | | 5 | | ≥6 | | 6 | | 6 | |
| | Marginal | 11 | 11 | 12 | 12 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 12 | 12 |
| | Nuchal | 1 | | 1 | | 1 | | 1 | | 1 | | 1 | |
| | Supracaudal | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | |

Source: The author (2021). Note: L = left side and R = right side.

Molecular analyses

Independent matrices were obtained for each amplified sequence after being aligned with the pure haplotypes and included 394 bp for *12S*, 565 bp for *16S*, 559 bp for *BDNF*, 601 bp for *Cmos*, and 439 bp for *R35*, resulting in a total of 2,558 bp analyzed (Supplementary material: Sequences and Table S3). The mtDNA sequences were shown to be species-specific with no sharing of haplotypes (Figure 3a and b) and presented 87 parsimony informative sites. For nucDNA sequences, 40 parsimony informative sites were found (Supplementary material: Table S4): for the *BDNF* gene, seven polymorphic sites were found and the haplotypes allow the identification of the species *C. mydas* and *L. olivacea*, while *C. caretta* and *E. imbricata* share a unique haplotype (Figure 3c); the *Cmos* gene presented 20 informative sites and the four species showed exclusive haplotypes for each one (Figure 3d); and the *R35* sequences had 13 informative sites and also showed exclusive haplotypes for each species (Figure 3e) (See supplementary material: Table S4 for some of the most resolute polymorphic sites among the four sea turtles and possible hybrids).

Hybrid A and *Hybrid B* showed haplotypes for mtDNAs (12S and 16S) related to *C. caretta* (Figure 3a and b). Regarding the nucDNAs sequences, *Hybrid A* presented a haplotype similar to *C. mydas* and another identical to the haplotype shared between *C. caretta* and *E. imbricata* for the *BDNF* gene (Figure 3c), and for the *Cmos* and *R35* genes a haplotype identical to *C. mydas* and one identical to *E. imbricata* for each of them (Figures 3d and e). *Hybrid B* showed a haplotype identical to that shared between *C. caretta* and *E. imbricata* for the *BDNF* gene (Figure 3c) and *C. caretta* haplotypes for *Cmos* and *R35* genes (Figures 3d and e).

Cytogenetic analyses

Chelonia mydas, *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata*, and *Lepidochelys olivacea* were cytogenetically compared by Machado et al. (2020a, 2020b), where karyotypes of $2n = 56$ chromosomes and similarities in longitudinal band patterns demonstrated by G and C banding were described (Figures 4 and 5). Distinct chromosome morphologies were found in chromosome pairs 4, 5, 7, and 12 among sea turtle karyotypes (Figures 4 and 5). Besides that, differences in the microsatellites accumulation among chromosomes of the four species were registered (Figure 5). The 5S rDNA partial sequences (~150 bp long) obtained from *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata*, and *L. olivacea* (Supplementary material: Sequences) were found to be 98% similar to *Bufo americanus* 5S ribosomal RNA (GenBank accession No. X58365.1) and for the first time were in situ located on the sea turtle chromosomes. The 5S rDNA sites were detected interstitially on the short arm of the second metacentric pair in *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata*, and *L. olivacea* karyotypes (Figure 5; Supplementary material: Figure S1). In addition, an additional 5S rDNA site was co-localized with 18S rDNA on the fourteenth mc on the *C. mydas* karyotype (Figure 5).

Hybrid A presented a karyotype of $2n = 56$ chromosomes arranged in 17 bi-armed and 39 one-armed chromosomes, and fundamental number (FN) = 73. Diagnostic chromosomes of the parental lineages were highlighted on the karyotypes as follows: subtelocentrics in position 4 and 5 on the karyotypes characteristic from *C. mydas* and *C. caretta*, or acrocentrics characteristic of *C. mydas* and *E. imbricata*; and metacentric on position 12 of the karyotype, characteristic of *C. mydas* and *C. caretta*, together with an acrocentric chromosome characteristic of *E. imbricata* (Figures 6 and 7). Heterochromatic blocks were located in pericentromeric regions of some macrochromosomes, which is similar to *C. mydas*, *C. caretta* and *E. imbricata*, in mc few blocks were detected in pericentromeric and long arm regions, which is more similar to *C. caretta* (Figures 5 and 6). The 5S rDNA was located in the short

arm of the metacentric macrochromosomes in position 2 on the karyotype besides a co-localized 5S/18S rDNAs site on the fourteenth mc, characteristic of *C. mydas* (Figure 7). Based on the microsatellite signals found in pure lineages (Figure 5), (CA)₁₅ sites were positioned in the short arms of the subtelocentric/acrocentric on the karyotype position 4, diagnostics of *C. mydas* and *E. imbricata*, respectively, besides one signal of the last metacentric (Figure 7). In addition, (CA)₁₅ signals in five mc were detected, which were positioned on the karyotype according to some correspondence with sites number and their positions previously found in *C. mydas*, *C. caretta*, and *E. imbricata* (Figure 7). (GA)₁₅ signals were detected only in four mc, which ones could correspond to a mix of sites from *C. mydas*, *C. caretta*, and *E. imbricata* chromosomes (Figure 7). (GATA)₈ motifs were located dispersed for one subtelocentric macrochromosome, and in eight mc combining signals from *C. mydas*, *C. caretta*, and *E. imbricata* chromosomes (Figure 7).

Hybrid B showed a karyotype of $2n = 56$ chromosomes arranged in 19 bi-armed chromosomes and 37 one-armed chromosomes, and FN = 75 (Figure 8). Diagnostic chromosomes from parental lineages were identified as follows: chromosomes in the karyotypic positions 4, 5, and 7 with a subtelocentric morphology characteristic of *C. caretta*, together with acrocentrics, characteristics of *L. olivacea* (Figure 8). *Hybrid B* showed heterochromatic blocks in pericentromeric regions of few macrochromosomes, also in pericentromeric and long arm regions of mc (Figure 8). The 5S rDNA was in situ located only in the short arm of the metacentrics on the karyotype position 2 while the 18S rDNA site was located in two mc (Figure 9). (CA)₁₅ motifs were located on the karyotype position 4, being one subtelocentric and one acrocentric, besides eight sites in mc, some of them also detected in the *C. caretta* and *L. olivacea* pure species (Figure 9). The microsatellite (GA)₁₅ was detected in four mc, combining signals from *C. caretta* and *L. olivacea* (Figure 9). (GATA)₈ signals also were located only in four mc as a match with *C. caretta* and *L. olivacea* signals (Figure 9).

Discussion

Marine chelonians date of the Cretaceous period (about 100 million years ago) (Hirayama, 1998), and the fossil record reveals that four families were established during this period, two of which have survived into the present: Cheloniidae and Dermochelyidae (Pritchard, 1997). Two tribes in Cheloniidae were recognized supported by molecular phylogenetics: Chelonini tribe, grouping *Natator depressus* (flatback sea turtle) and *Chelonia mydas*; and, Carettini tribe grouping *Lepidochelys olivacea*, *Lepidochelys kempii* (Kemp's

ridley sea turtle), *Eretmochelys imbricata* and, *Caretta caretta* (Iverson et al., 2007; Naro-Maciel et al., 2008). It is remarkable that in Brazil sea turtle hybrids are observed among species belonging to tribes Chelonini (*C. mydas*), and Carettoni (*C. caretta*, *E. imbricata*, and *L. olivacea*), whose recent phylogenetic evidence indicates a deep time divergence of about 63 million years (Naro-Maciel et al., 2008; Vilaça et al., 2012). Therefore, Chelonini and Carettoni representatives may be the oldest vertebrate lineages known to hybridize in nature (Karl et al., 1995). In the present study, two hybrids (*A* and *B*) were analyzed by an integrated analysis, where morphology, molecular, and cytogenetics analyses contributed to identify the species involved in these cases. The integrated data demonstrated that *hybrid A* is an F2 among *C. caretta* x *E. imbricata* x *C. mydas* while *hybrid B* could be the result of backcross among *C. caretta* x *L. olivacea*.

Morphological analysis of sea turtles is an essential filter determining when to execute genetic analysis to hybrids recognition (Ounissi et al., 2016; Seminoff et al., 2003). Morphological traits of other sea turtle species (Pritchard and Mortimer, 1999; Wyneken, 2001) were observed in our results for hybrids *A* and *B*. Even though *hybrid A* presented as many scales and scutes as *C. caretta*, *E. imbricata*, and *L. olivacea* (Kelez et al., 2016; Pritchard and Mortimer, 1999; Seminoff et al., 2003; Wyneken, 2001), the imbrication of carapace scutes and the serrated marginal scutes indicate the possibility of *hybrid A* being an offspring of *C. mydas* and *E. imbricata*. A non-modal scute pattern and alterations in plastron and flipper claw patterns (Pritchard and Mortimer, 1999; Wyneken, 2001) were observed in *hybrid B*'s carapace. These traits are known for their natural variability at an individual level in sea turtle species (Pritchard and Mortimer, 1999; Wyneken, 2001; Ounissi et al., 2016). Still, the presence of these alterations in conjunction with the phenotypic similarity of *hybrid B*'s head and carapace to those of olive ridleys can indicate a crossbreeding between *C. caretta* and *L. olivacea*. Hybridization between these two species was previously registered in Brazil but is less commonly observed than between *C. caretta* and *E. imbricata* and could be a result of an overlap in reproductive patterns (Lara-Ruiz et al., 2006; Reis et al., 2010a; Arantes et al., 2020a; Soares et al., 2020).

Some studies of sea turtle hybrids in Brazil were limited to use mtDNA sequence analysis (Lara-Ruiz et al., 2006; Reis et al., 2010a; 2010b). Although this marker could be a great tool to investigate population structure, it is inappropriate to determine hybridization, because mtDNA is strictly maternally inherited (Soares et al., 2017). Additionally, detecting hybridization is not possible when the mtDNA haplotype matches the species morphological

assignment, so to resolve and correctly genotype hybrids, mtDNA and nucDNAs should be used in conjunction for showing the female and male genetic contributions (Soares et al., 2017). *Hybrid A* was morphologically identified as a cross between *C. mydas* x *E. imbricata*, but molecular analyses revealed that mtDNA (*12S* and *16S*) is from *C. caretta*, which shows that a female of *C. caretta* is involved in this hybridism case. Furthermore, nucDNAs (*BDNF*, *Cmos*, and *R35*) were identified as from *C. mydas*, *C. caretta*, and *E. imbricata* allowing hypothesized *hybrid A* as an F2 individual. However, *BDNF* shares the same haplotype in *C. caretta* and *E. imbricata* (Vilaça et al., 2012), which makes it impossible to determine the exact order of the crosses (e.g., F1 could be either a *C. caretta* x *E. imbricata* or *C. caretta* x *C. mydas* hybrid that crossed either a *C. mydas* or *E. imbricata* pure lineage). Hybrids among *C. caretta* × *E. imbricata* × *C. mydas* have been described in the Brazilian coast (Bahia state) as a *C. caretta* x *E. imbricata* F1 crossed with a *C. mydas* (Vilaça et al., 2012) and the integrated morphological, molecular, and cytogenetic data demonstrated an F2 hybrid possessing chromosomal sets from a *C. caretta* × *E. imbricata* × *C. mydas* segregation.

Most of the sea turtle hybrids seem to have 50% of alleles of each parental species, therefore being considered as F1, but backcrosses with both parental species have also been detected, revealing genetic introgression (Vilaça et al., 2012; Arantes et al., 2020a). *Hybrid B* presented mtDNA of *C. caretta*, which indicates that a female *C. caretta* was involved in this case, and interestingly, except for the shared haplotype of *BDNF*, the other nucDNAs represent alleles of *C. caretta*. Undoubtedly, the morphology and cytogenetic analyses showed *L. olivacea* features in the hybrid B. Nevertheless, no alleles of *L. olivacea* were detected in the nucDNA markers, suggesting that hybrid B could be a result of a *C. caretta* x *L. olivacea* hybrid that backcrossed with a pure species of *C. caretta*.

The high-frequency of sea turtles' hybridization in Brazil is a local event where fertile female hybrids are reported in 300 km of the northeast coastline (Arantes et al., 2020a). Hybridization cases on the Brazilian coast coincide with the period of a great population decline of sea turtles during the XX century, which could lead to a reduced chance of potential conspecific encounters (Vilaça et al., 2012). Genetic introgression is a concern when F2 hybrids are found, such as hybrids *A* and *B*, and it should be deeply studied to estimate its future consequences for pure lineages. In an evolutionary context, hybridization can be neutral, disadvantageous, or adaptive (Piett et al., 2015; Olave et al., 2018). Studies have been shown that the phenomenon of hybridization in Brazil could be considered neutral (Lara-Ruiz et al., 2006; Reis et al. 2010a, 2010b; Vilaça et al., 2012; Vilaça and Santos, 2013; Proietti et al.,

2014; Soares et al., 2017, 2018; Arantes et al., 2020a, 2020b), where no mention of positive or negative characteristics or consequences were detected yet.

Three main types of hybridization could be used as a framework for the understanding of the ecological and evolutionary consequences of hybridization: (Type 1) distant species hybridization, mostly preventing gene flow because hybrids are infertile or (Type 2) because homologous chromosomes do not recombine, and (Type 3) interbreeding between more closely related taxa, in which homologous chromosomes recognize themselves during meiosis, resulting in gene flow and consequent introgression between parental organisms (Quilodr an et al., 2020). Sea turtles are in agreement with type 3 hybridization since they are known for the maintenance of chromosome numbers and for having a close karyotype structure (Bickham et al., 1981; Machado et al., 2020a, 2020b). Despite that, the data obtained here for hybrids karyotypes showed that slight differences in the morphology of the chromosomes and in situ localization of cytogenetic markers allowed the identification of the species involved in hybrids *A* and *B* cases.

Distinct morphologies in a homeologous chromosome pair in phylogenetically related species usually are attributed to be the result of chromosomal rearrangements (Charlesworth et al., 1994). Conversely, centromeric repositioning mechanisms could also lead to chromosomal morphology changes, differences in the centromeric heterochromatin bands and microsatellite content help to the proposal of the centromere repositioning in the diversification of macrochromosomes pairs 4, 5, 7, and 12 among Cheloniidae species (Machado et al., 2020b). It is important to notice that chromosomal differences could give raised to unbalanced gametes in the F1 hybrids, and in these cases, unbalanced F1 gametes could lead to F2 inviability or to subsequent generations. Classical cytogenetics showed that chromosomes of different morphologies (subtelocentric/acrocentric in karyotypic positions 4, 5, and 7; and metacentric/acrocentric in position 12) maintained the same longitudinal band patterns from pure species in F2 hybrid karyotypes, despite being from different species: from *C. mydas*, *C. caretta* or *E. imbricata* in *hybrid A*, and from *C. caretta* and *L. olivacea* in *hybrid B*. Thus, either the crossing-over not occurred in these chromosomes in these rearranged chromosome regions, or the crossing-over did not change the gene synteny in hybrids *A* and *B* as verified with balanced chromosomal sets manutention. The last one could be favored if the morphology changes in the chromosomes from Cheloniidae species are the consequence of centromere repositioning and the same gene synteny was maintained.

Cytogenetic markers were developed and characterized in the karyotypes of pure sea turtle species by Machado et al. (2020a, 2020b). While the 18S rDNA has a conserved site among the four Cheloniidae species (Machado et al., 2020a) and was not useful to sea turtle hybrids recognition, a 5S rDNA site co-localized with the 18S rDNA is a species-specific marker of *C. mydas* and gave assistance to identify chromosome set from this species in *hybrid A*. Microsatellites were detected as part of repetitive units of heterochromatin, mainly in mc, for pure species (Machado et al., 2020b). In situ localization of the microsatellites (CA)₁₅, (GA)₁₅, and (GATA)₈ showed that chromosome pairs bearing distinct constitutions regarding microsatellites sites among pure species could be arranged in the hybrids *A* and *B* karyotypes with an apparent balanced chromosome sets organization. The arrangement of chromosome sets in hybrids is arduous, especially in mc, which show the same size and morphology. Despite this extra difficulty, the data revealed that sea turtle hybrids *A* and *B* apparently combine mc that are supposed to be homeologous chromosomes. In addition, some microsatellites sites could not be addressed to anyone parental lineages in the hybrids *A* and *B*, probably as a consequence of population variation not detected in former studies.

Hybridization can have genetic and ecological costs and benefits, such as effects on species adaptation and genetic composition, competition with parent taxa, and invasions of novel habitat (Piett et al., 2015). Here, we observed that despite hybrids *A* and *B* presented morphological characteristics of two sea turtle species when this analysis was integrated with molecular and cytogenetics data, we discovered that *hybrid A* is probably an F2 resulted of three species hybridisms (among *C. caretta* × *E. imbricata* × *C. mydas*), and *hybrid B* is a probably backcrossed (among *C. caretta* × *L. olivacea*). It is important to report that these individuals have introgressed alleles, but the chromosome sets are still balanced. The data showed that hybridism did not bring grave survival consequences for hybrids *A* and *B*, but we cannot access their reproductive parameter. Despite the chromosome sets balanced, we cannot say yet how hybridism can affect the species genetics in a long-term, or how the interspecific chromosomes combined could affect the gene expression. Conservation measures and decisions for a hybrid might depend on the cause of hybridization and the characteristics and consequences of the resulting hybrid (Moritz, 1994; Mallet, 2005). Different approaches have been used to elucidate some questions related to hybridism and further studies should integrate these approaches with molecular and cytogenetics techniques, using it as an auxiliary tool in sea turtle's hybridism diagnosis, since it could be used at any moment of sea turtles lifecycle.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministério do Meio Ambiente/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. We are also grateful to Projeto TAMAR/Fundação Projeto Tamar, Aquário Natal, Laboratório de Ecologia e Conservação (LEC) and Citogenética Evolutiva e Conservação (CECA) of Universidade Federal do Paraná, and Associação MarBrasil for supporting the biological material sampling and with laboratory stuff and equipment. CRDM, LG, MAS and GFF would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES/PROAP - Financial Code 001) for the postgraduate scholarship.

References

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R et al. (2013) Hybridization and speciation. *J Evol Biol* 26:229–246.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P and Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol Evol* 16:613–622
- Arantes LS, Vilaça ST, Mazzoni CJ and Santos FR (2020a) New genetic insights about hybridization and population structure of hawksbill and loggerhead turtles from Brazil. *J Hered* 111:444-456.
- Arantes LS, Ferreira LCL, Driller M, Repinaldo Filho FPM, Mazzoni CJ and Santos FR (2020b) Genomic evidence of recent hybridization between sea turtles at Abrolhos Archipelago and its association to low reproductive output. *Sci Rep* 10:1-13.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* 25:3389-3402.
- Bandelt HJ, Forster P and Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37–48.
- Barbosa P, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF and Vicari MR (2017) Karyotype analysis of three species of *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil: rearranged karyotypes and cytotaxonomy. *Neotrop Ichthyol* 15: e160056.
- Bérubé M and Palsbøll PJ (2018) Hybridism. In: *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press, Cambridge, pp. 496-501.
- Bickham JW, Bjørndal KA, Haiduk MW and Rainey WE (1980) The karyotype and chromosomal banding patterns of the green turtle (*Chelonia mydas*). *Copeia* 1980:540-543.
- Bickham JW (1981) Two-hundred-million-year-old chromosomes: deceleration of the rate of karyotypic evolution in turtles. *Science* 212:1291-1293.
- Charlesworth B, Sniegowski P and Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220.

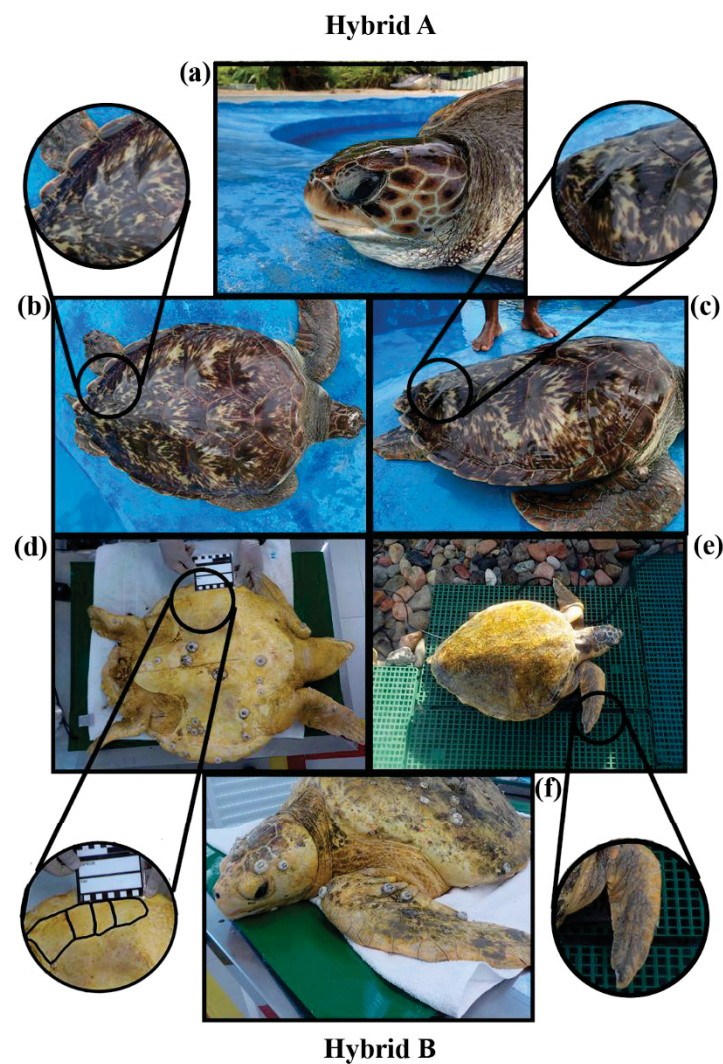
- Dobigny G, Britton-Davidian J and Robinson TJ (2017) Chromosomal polymorphism in mammals: An evolutionary perspective. *Biol Rev Camb Philos Soc* 92:1–21.
- Faria R and Navarro A (2010) Chromosomal speciation revisited: Rearranging theory with pieces of evidence. *Trends Ecol Evol* 25:660-69.
- Fujita MK, Engstrom TN, Starkey DE and Shaffer HB (2004) Turtle phylogeny: insights from a novel nuclear intron. *Mol Phylogenet Evol* 31:1031-1040.
- Galindo DJ, Martins GS, Vozdova M, Cernohorska H, Kubickova S, Bernegossi AM, Kadlcikova D, Rubes J and Duarte JMB (2021) Chromosomal Polymorphism and Speciation: The Case of the Genus *Mazama* (Cetartiodactyla; Cervidae). *Genes* 12:165.
- Goes CAG, Daniel SN, Piva LH, Yasui GS, Artoni RF, Hashimoto DT, Foresti F and Porto-Foresti F (2020) Cytogenetic markers as a tool for characterization of hybrids of *Astyanax* Baird and Girard, 1854 and *Hyphessobrycon* Eigenmann, 1907. *Comp Cytogenet* 14:231.
- Haddad CF, Pombal Jr JP and Batistic RF (1994) Natural hybridization between diploid and tetraploid species of leaf-frogs, genus *Phyllomedusa* (Amphibia). *J Herpetol* 28:425-430.
- Harrison RG (1993) Hybrid zones and the evolutionary process. New York: Oxford University Press.
- Harrison RG and Larson EL (2014) Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *J Hered* 105:795-809.
- Hart CE, Ley-Quñonez CP, Abreu-Grobois FA, Plata-Rosas LJ, Llamas-Gonzalez I, Ocegüera-Camacho DKE and Zavala-Norzagaray AA (2019) Possible hybridization between east pacific green *Chelonia mydas* and olive ridley *Lepidochelys olivacea* sea turtles in northwest Mexico. *Amphib Reptile Conserv* 13:174–180.
- Hirayama R (1998) Oldest known sea turtle. *Nature* 392:705-708.
- IUCN (2021) The IUCN red list of threatened species. Version 2021-1. <https://www.iucnredlist.org>. (June 17, 2021).
- Iverson JB, Brown RM, Akre TS, Near TJ, Le M, Thomson RC and Starkey DE (2007) In search of the tree of life for turtles. *Chel Res Monogr* 4:85-106.
- Káldy J, Mozsár A, Fazekas G, Farkas M, Fazekas DL, Fazekas GL, Goda K, Gyöngy Z, Kovács B, Semmens K et al. (2020) Hybridization of Russian Sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*, Brandt and Ratzeberg, 1833) and American Paddlefish (*Polyodon spathula*, Walbaum 1792) and evaluation of their progeny. *Genes* 11:753.
- Karl SA, Bowen BW and Avise JC (1995) Hybridization among the ancient mariners: characterization of marine turtle hybrids with molecular genetic assays. *J Hered* 86:262-268.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C et al. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647-1649.
- Kelez S, Velez-Zuazo X and Pacheco AS (2016) First record of hybridization between green *Chelonia mydas* and hawksbill *Eretmochelys imbricata* sea turtles in the Southeast Pacific. *PeerJ* 4: e1712.

- King M (1993) *Species Evolution: The Role of Chromosome Change*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX and Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *PNAS* 86:6196-6200.
- Lara-Ruiz P, Lopez GG, Santos FR and Soares LS (2006) Extensive hybridization in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. *Conserv Genet* 7:773–781.
- Le M, Raxworthy CJ, McCord WP and Mertz L (2006) A molecular phylogeny of tortoises (Testudines: Testudinidae) based on mitochondrial and nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol* 40:517–531.
- Lehman N, Eisenhawer A, Hansen K, Mech LD, Peterson RO, Gogan PJP and Wayne RK (1991) Introgression of coyote mitochondrial DNA into sympatric North American grey wolf populations. *Evolution* 45:104–119.
- Leigh JW and Bryant D (2015) POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6:1110–1116.
- Librado P and Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452.
- Machado CRD, Glugoski L, Domit C, Pucci MB, Goldberg DW, Marinho LA, Costa GWWF, Nogaroto V and Vicari MR (2020a) Comparative cytogenetics of four sea turtle species (Cheloniidae): G-banding pattern and in situ localization of repetitive DNA units. *Cytogenet Genome Res* 160:531-538.
- Machado CRD, Domit C, Pucci MB, Gazolla CB, Glugoski L, Nogaroto V and Vicari, MR (2020b) Heterochromatin and microsatellites detection in karyotypes of four sea turtle species: Interspecific chromosomal differences. *Genet Mol Biol* 43: e20200213.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol Evol* 20:229–237.
- Mast RB and Carr JL (1989) Carapacial scute variation in Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempi*) hatchlings and juveniles. *Conserv Manag* 89:202–219.
- Mayr E (1963) *Animal species and evolution*. Cambridge: Harvard University Press.
- Moritz C (1994) Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends Ecol Evol* 9:373-375.
- Naro-Maciel E, Le M, FitzSimmon NN and Amato G (2008) Evolutionary relationships of marine turtles: a molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes. *Mol Phyl Evol* 49:659–662.
- Noonan BP and Chippindale PT (2006) Dispersal and vicariance: the complex evolutionary history of boid snakes. *Mol Phyl Evol* 40:347-358.
- Olave M, Avila LJ, Sites Jr JW and Morando M (2018) Hybridization could be a common phenomenon within the highly diverse lizard genus *Liolaemus*. *J Evol Biol* 31:893-903.
- Ounissi M, Laskri H and Khelifi-Touhami M (2016) Morphology vs Genetics: the hybrid origin of a sea turtle disproved by DNA. *Mediterr Mar Sci* 17:519–532.

- Ozdemir B and Turkozan O (2006) Carapacial scute variation in green turtle, *Chelonia mydas* hatchlings in Northern Cyprus. *Turkish J Zool* 30:141–146.
- Pekkala N, Knott KE, Kotiaho JS, Nissinen K and Puurtinen M (2012) The benefits of interpopulation hybridization diminish with increasing divergence of small populations. *J Evol Biol* 25:2181–2193
- Piett S, Hager HA and Gerrard C (2015) Characteristics for evaluating the conservation value of species hybrids. *Biodivers* 24:1931-1955.
- Pinkel D, Straume T and Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *PNAS* 83:2934-2938.
- Pritchard PCH (1997) Evolution, phylogeny and current status. In: Lutz PL and Musick, JA (eds) *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, pp 1–28.
- Pritchard PCH and Mortimer JA (1999) Taxonomy, external morphology, and species identification. In: Eckert K; Bjorndal K; Abreu-Grobois F and Donnelly M (eds.). *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication 21:11-13.
- Proietti MC, Reisser J, Marins LF, Marcovaldi MA, Soares LS, Monteiro DS, Wijeratne S, Pattiaratchi C and Secchi, ER (2014) Hawksbill × loggerhead sea turtle hybrids at Bahia, Brazil: where do their offspring go? *PeerJ* 2: e255.
- Purves WK, Sadava D, Orians GH, Heller HC (2001) *Life: the science of biology*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Quilodrán CS, Montoya-Burgos JI and Currat M (2020) Harmonizing hybridization dissonance in conservation. *Commun Biol* 3:1-10.
- Reis EC, Soares LS and Lôbo-Hajdu G (2010a) Evidence of olive ridley mitochondrial genome introgression into loggerhead turtle rookeries of Sergipe, Brazil. *Conserv Genet* 11:1587–1591
- Reis EC, Soares LS, Vargas SM, Santos FR, Young RJ, Bjorndal KA, Bolten AB and Lôbo-Hajdu G (2010b) Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. *Conserv Genet* 11:1467-1477.
- Rodríguez PA, Ortiz ML and Bueno ML (2003) Agentes mitogénicos para cultivos de linfocitos en quelonios. *Orinoquia* 7:47-49.
- Romano SL and Palumbi SR (1997) Molecular evolution of a portion of the mitochondrial 16S ribosomal gene region in scleractinian corals. *J Mol Evol* 45:397-411.
- Rhymer JM and Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 27:83–109
- Seabright M (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-972.
- Seminoff JA, Karl SA, Schwartz T and Resendiz A (2003) Hybridization of the green turtle (*Chelonia mydas*) and hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in the Pacific Ocean: indication of an absence of gender bias in the directionality of crosses. *Bull Mar Sci* 73:643–652.

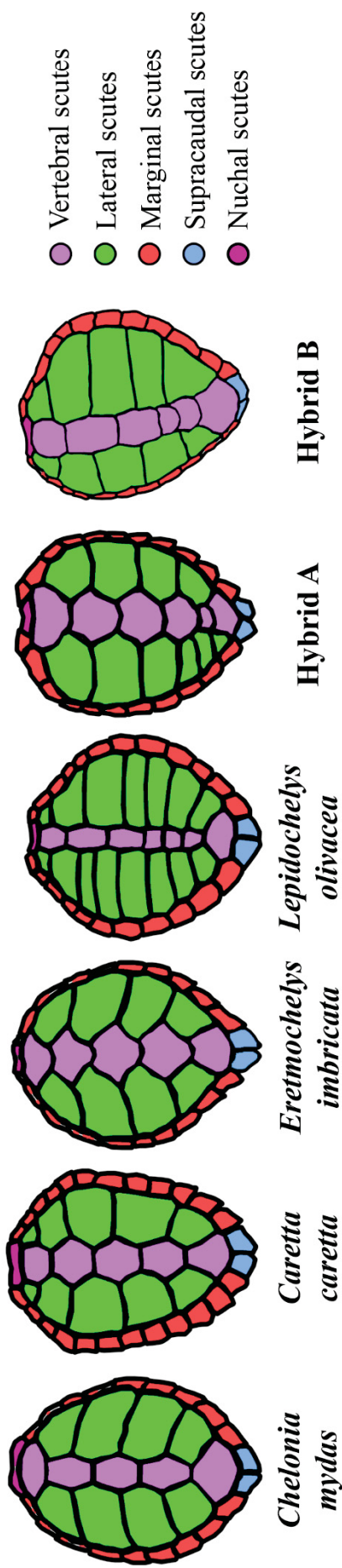
- Sim EL, Booth DT and Limpus CJ (2014) Non-modal Scute Patterns, Morphology, and Locomotor Performance of Loggerhead (*Caretta caretta*) and Flatback (*Natator depressus*) Turtle Hatchlings. *Copeia* 2014:63–69.
- Stephens M and Donnelly P (2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 73:1162–1169.
- Suárez P, Pinto Barroso ICG, Silva DDS, Milhomem SS, Cabral-de-Mello DC, Martins C, Pieczark JC and Nagamachi CY (2017) Highest diploid number among Gymnotiformes: first cytogenetic insights into *Rhabdolichops* (Sternopygidae). *Zebrafish* 14:272-279.
- Soares LS, Bolten AB, Wayne ML, Vilaça ST, Santos FR, Marcovaldi MA and Bjorndal KA (2017) Comparison of reproductive output of hybrid sea turtles and parental species. *Mar Biol* 164:1-10.
- Soares LS, Bjorndal KA, Bolten AB, Marcovaldi MA, Luz PB, Machado R, Lo R, McDaniel SF, Payton AC, Waltzek TB et al. (2018) Effects of hybridization on sea turtle fitness. *Conserv Genet* 19:1311-1322.
- Soares L, Bjorndal K, Bolten A, Wayne M, Castilhos J, Weber M, López-Mendilaharsu, M, Marcovaldi, MA, Vilaça ST and Naro-Maciel E (2020) Reproductive output, foraging destinations, and isotopic niche of olive ridley and loggerhead sea turtles, and their hybrids, in Brazil. *Endanger Species Res* 44:237–251.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304-306.
- Vilaça ST, Vargas SM, Lara-Ruiz P, Molfetti E, Reis EC., Lôbo-Hajdu G, Soares LS and Santos FR (2012) Nuclear markers reveal a complex introgression pattern among marine turtle species on the Brazilian coast. *Mol Ecol* 21:4300-4312.
- Vilaça ST and Santos FRD (2013) Molecular data for the sea turtle population in Brazil. *Dataset Papers in Science* 2013:196492.
- Wnuk M, Kotylak Z, Bugno M and Słota E (2005) Karyotype analysis in pigs–hybrids of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic pig (*Sus scrofa domestica*). *Ann Anim Sci* 5:11-19.
- Wyneken J (2001) The anatomy of sea turtles. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC 470:1–172.

Figure 1. Photographs of hybrid's *A* and *B* morphological traits considered as altered or uncharacteristic from, respectively, *C. mydas* and *C. caretta*. *Hybrid A*: (a) Variation in the number of postocular scales; (b) strong serrated marginal carapace scutes; and (c) lightly imbricated vertebral carapace scutes and presence of a small additional scute. *Hybrid B*: (d) presence of an extra 4th inframarginal scute on the plastron of the individual; (e) single claw on the flipper and overall shape of the carapace; and (f) overall morphology of the individual's head and carapace.



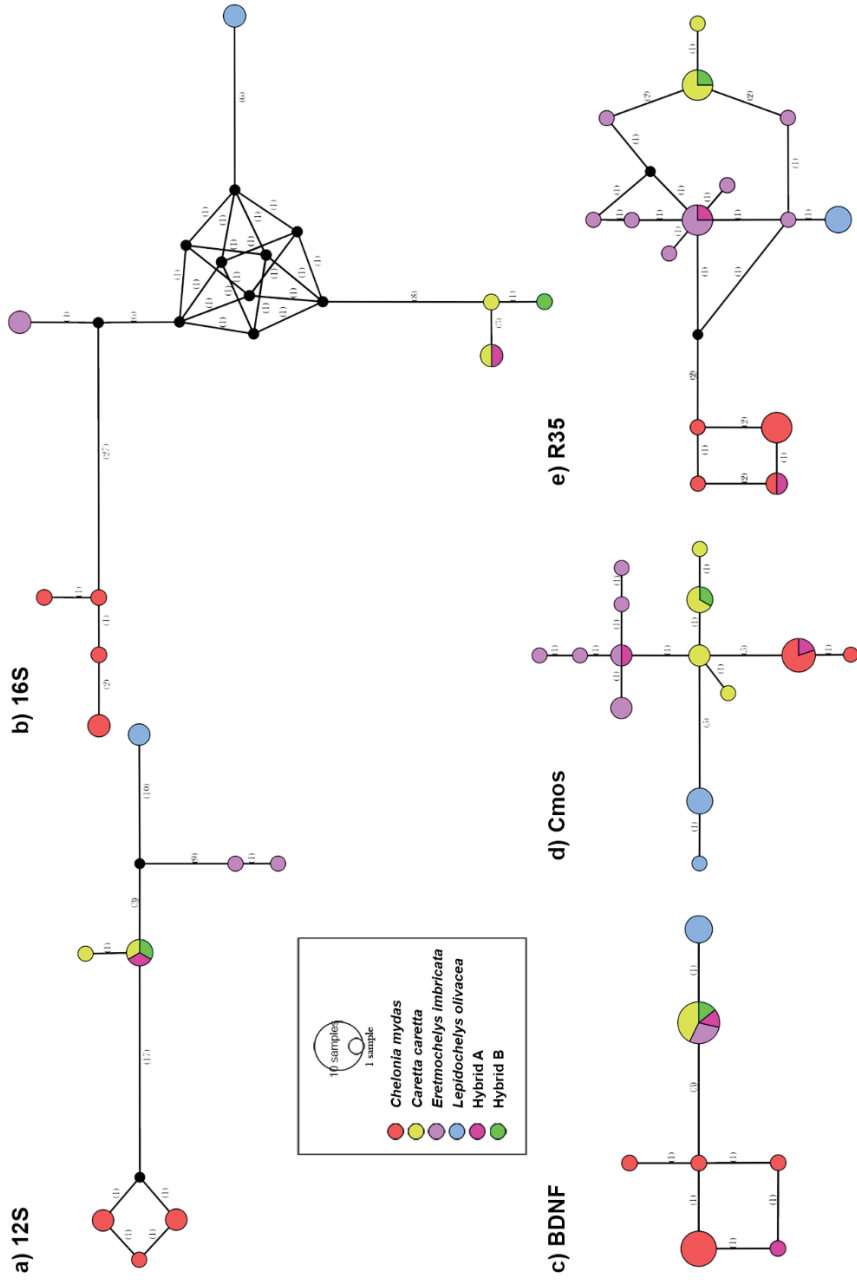
Source: The author (2021).

Figure 2. Comparison between carapace scute patterns of *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata*, *L. olivacea*, *Hybrid A*, and *Hybrid B*. Vertebral, lateral, marginal, supracaudal, and nuchal scutes are displayed in different colors.



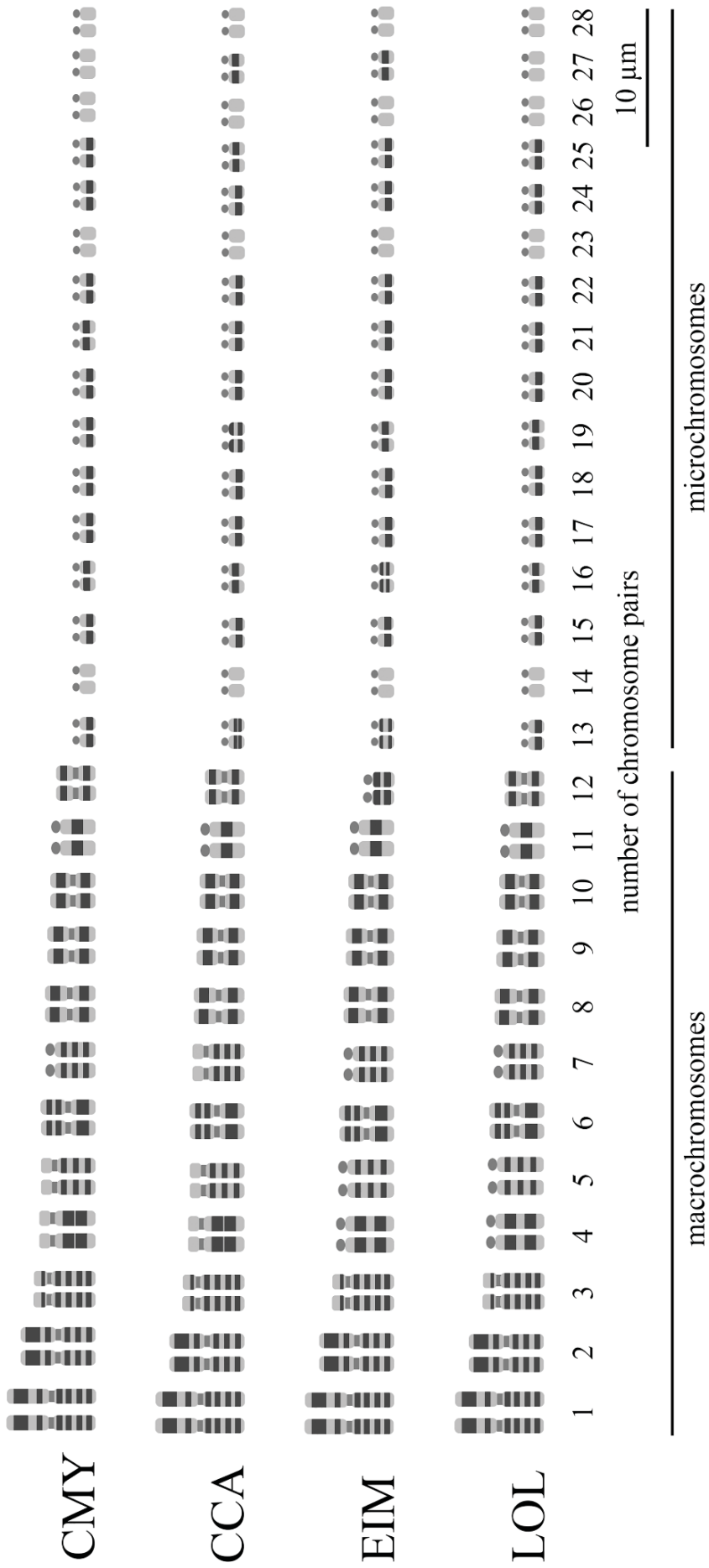
Source: The author (2021).

Figure 3. Haplotype network based on fragments of the mtDNA (a) *I2S* and (b) *I6S*, and on fragments of the nucDNAs (c) *BDNF*, (d) *Cmos*, and (e) *R35* for hybrids *A* and *B*, and pure species.



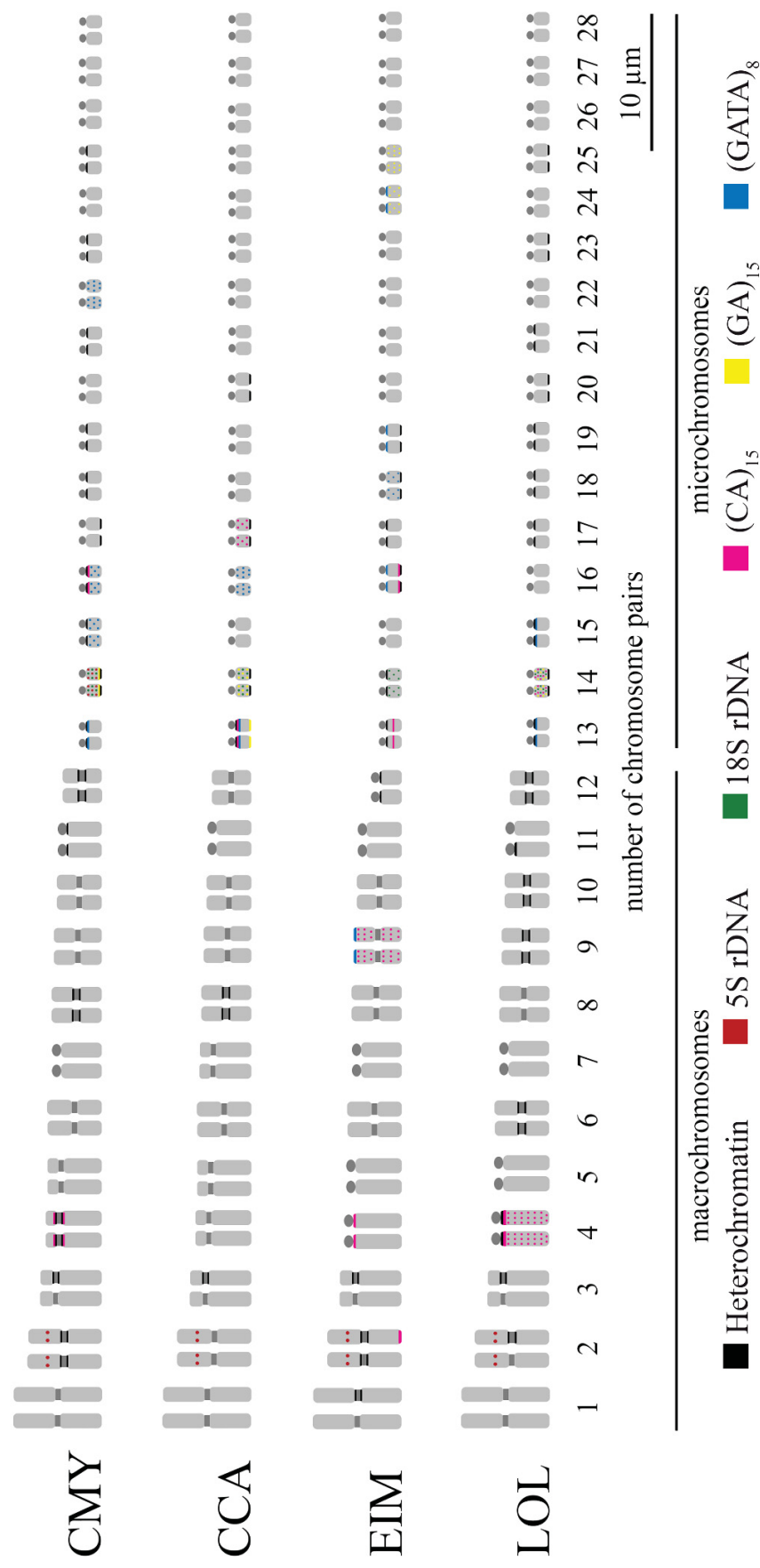
Source: The author (2021).

Figure 4. Representative ideograms of G-bandings on the chromosomes of the four pure sea turtle species. The species names were referred by their 3-letter acronym: *C. mydas* (CMY), *C. caretta* (CCA), *E. imbricata* (EIM) and *L. olivacea* (LOL).



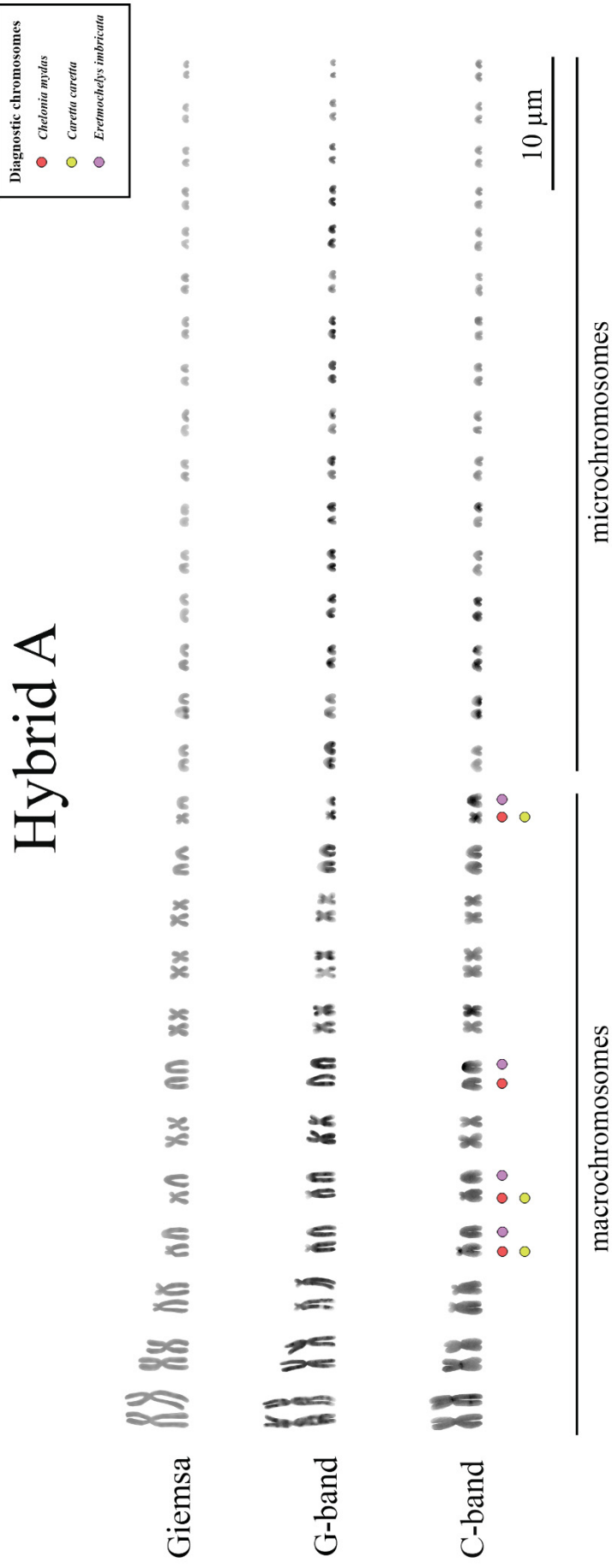
Source: The author (2021).

Figure 5. Representative ideograms of heterochromatic regions, rDNAs and microsatellite motifs on the chromosomes of the four pure sea turtle species. The species names were referred by their 3-letter acronym: *C. mydas* (CMY), *C. caretta* (CCA), *E. imbricata* (EIM) and *L. olivacea* (LOL).



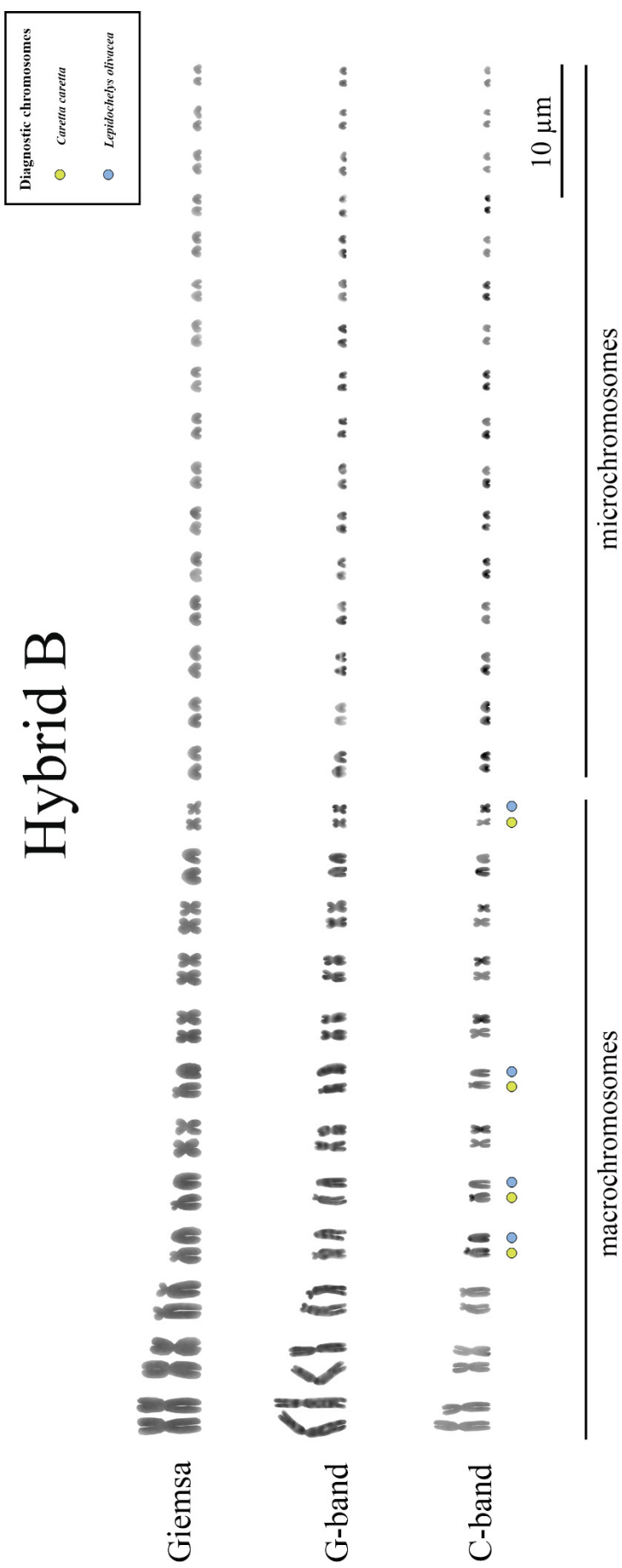
Source: The author (2021).

Figure 6. Karyotypes of *hybrid A* subjected to Giemsa staining, G-banding, and C-banding. Circles of different colors representing the diagnostic chromosomes



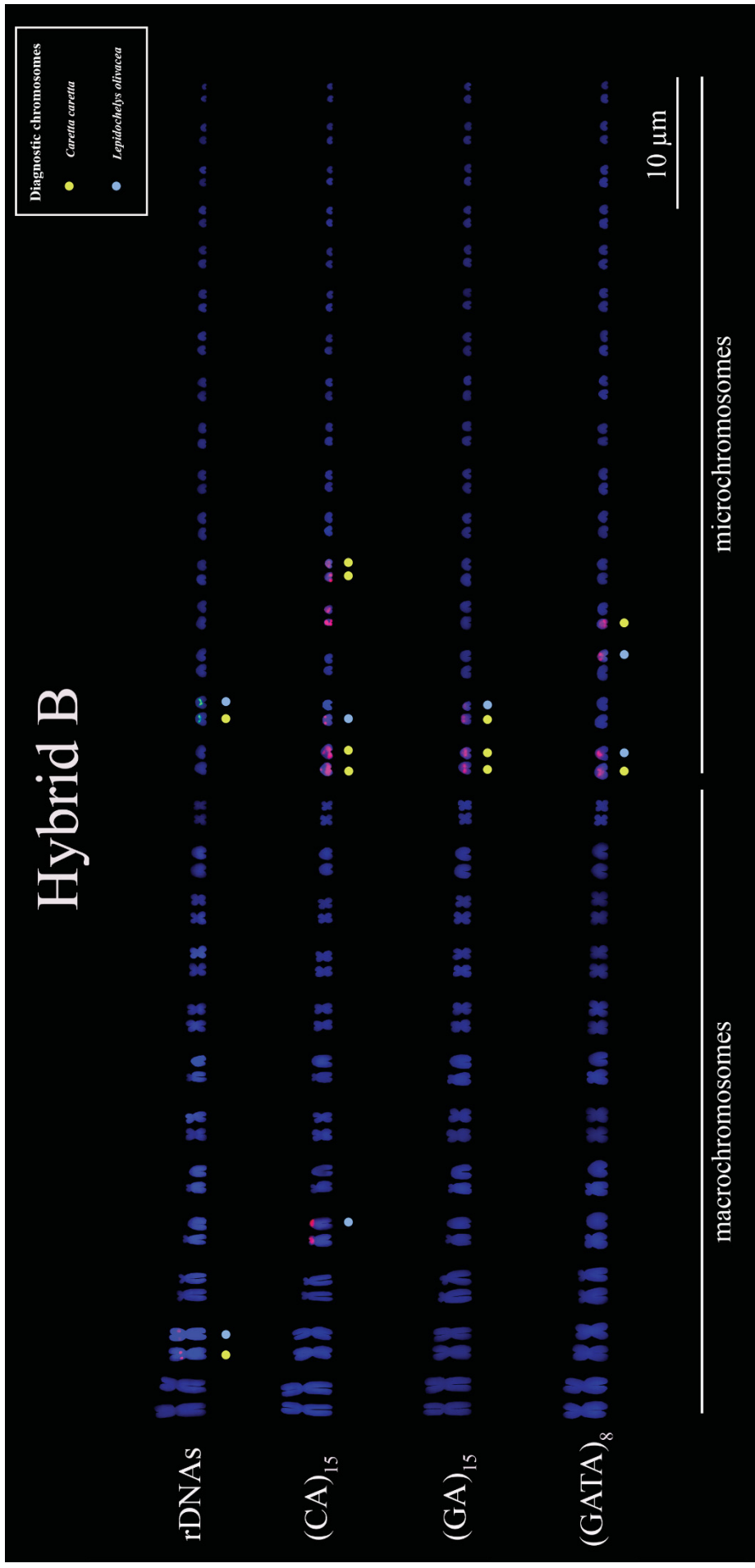
Source: The author (2021).

Figure 8. Karyotypes of *hybrid B* subjected to Giemsa staining, G-banding, and C-banding. Circles of different colors representing the diagnostic chromosomes.



Source: The author (2021).

Figure 9. Karyotypes of *hybrid B* subjected to FISH using 5S and 18S rDNAs (*red and green signals*), and (CA)₁₅, (GA)₁₅, and (GATA)₈ microsatellites probes (*red signals*). Circles of different colors representing the diagnostic chromosomes.



Source: The author (2021).

Supplementary material: Sequences. Sequences of 5S rDNA obtained from *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata*, *L. olivacea* and mtDNA and nucDNA sequences obtained from hybrids *A* and *B*.

5S rDNA – *Chelonia mydas*

>TGCCACACACCCTGAACACGCCCGATCTCGTCTGATCTCGAAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGA
CCTCCTGGGAATACCAGGTGTCGTAGGCA

5S rDNA – *Caretta caretta*

>GCCACACACCCTGAACACGCCCGATCTCGTCTGATCTCGGAAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGAC
CTCCTGGGAATACCAGGTGTCGTAGGCA

5S rDNA – *Eretmochelys imbricata*

>CCCAATGTGGAATTCGCCCTTGCCACACCACCCTGAACACGCCCAATCTCATCTGATCTCAGAAGCTAAGCAGGATTTGGGCCTG
GTTAGCACTTGGATGGGAGACCTCCGAGGAATACCAGGTGTCGTAGGCAAGGGCGAATTCACACAGTG

5S rDNA – *Lepidochelys olivacea*

>CCACTGTGGAATTCGCCCTTGCCACACCACCCTGAACACGCCCGATCTCGTCTGATCTCGGAAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGG
TTAGTACTTGGATGGGAGACCTCCTGGGAATACCAGGTGTCGTAGGCAAGGGCGAATTCACACATTG

12S mtDNA – *Hybrid A*

>AAGCTTCTAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCCCTAAGCTTAGATAATTTCCACACAAAATAATCCGCCAGAACTA
CGAGCATAAACGCTTAAACTCTAAGGACTTGGCGTACCTCAAACCTCCTAGAGGAGCCTGTCTATAATCGATAATCCACGA
TCTACCTCACCATCCCTTGCCAAACCCGCTATATACCACCGTCACCAAGTTACCCCATGAGGGCCACAAAAGTAAAGCAAAATAA
CCTAAACAGTTAATAAGTCAGGTCAAGGTGTAGCTAACTGAGTAGGAAAGAAATGGGCTACATTTTCTACTTTAGAAATAACCCACG
GAAGAATACCATGAAATAGGTTCCACAAGCAGGATTTAGCAGTAAACTGGGAACAGAGAGCCCCAATTTAAGCCGGTCTCTGAGGT
ACGCACACACCGCCCGTCAC

12S mtDNA – *Hybrid B*

>TGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACTTAGATATTTCCACACAAAAATATCCGCCAGAGAACTACGAGCATAAA
 CGTTAAACTCTAAGGACTTGGCGGTACCTCAAAACCTCCTAGAGGAGCCTGTCTATAATCGATAATCCACGATCTACCTCACCC
 ATCCCTTGCCAAACCCGCCTATATACCCGTCACCAGCTTACCCCATGAGGGCCACAAAAGTAAAGCAAAATAACCTAAACAGTT
 AATAAGTCAGGTCAAGGTGTAGCTAACTGAGATGGAAGAAATGGGCTACATTTTCTACTTTAGAAAATAACCCAGGAAAGAAATACC
 ATGAAAATAGGTTCCACAAGCAGGATTTAGCAGTAAACTGGGAACAGAGAGCCCCAATTTAAGCCCGTCTGAGGTACGCACACAC
 CGCCCGTCAACCCCTCCCTGCAGTCAAA

16S mtDNA – *Hybrid A*

>GTGCGCTGTTATCAAAAACATAGCCCTCTAGCAACAATAAGTATTAGAGGTAATGCCCTGCCAGTGACACTGTAAACGGCCGC
 GGTATCCTAACCGTGCAAAGGTAGCGTAATCACTTGTCTTTAAATAAAGACTAGAAATGAATGGCCAAACGAGGTTCCACCTGTC
 TCTTACAACAATCAGTGAAATTGGTCTTCCCGTGCAAAAGCGGGAATAACACTATAAGACGAGAAGACCCCTGTGGAACTTCAA
 ATATAAATCAACTATTATATTACCACCCTAAAGACTTATAATTAAGTCTGATCCATATTTTTGGTTGGGGTGACCTCGGAG
 TAAAAAAAACCTCCGAAAAGAACATATTTCTTAACCTAGATTTACAACCTCAAAGCGCCAAACGGCAAAATGATCCAATATAT
 TTGATCAACGAACCAAGCTACCCAGGGATAACAGCGCAATCCCATCCTAGAGTTCCCTATCGACGATGGGGTTACGACCTCGAT
 GTTGATCAGGACATCCTGATGGTGCAACCGCTATCAAGGGTTCGTTTGTTC AACGATTAATAGTCCCTACGTGATCTGAGTTTCA
 CCGGA

16S mtDNA – *Hybrid B*

>CCTGTTTATCAAAAACATAGCCCTCTAGCAGCAACAAGTATTAGAGGTAATGCCCTGCCAGTGACACTGTAAACGGCCCGGTA
 TCCTAACCGTGCAAAGGTAGCGTAATCACTTGTCTTTTAAATAAAGACTAGAAATGAATGGCCAAACGAGGTTCCACCTGTCTCTT
 ACAACAATCAGTGAATTTGGTCTTCCCGTGCAAAAAGCGGGAATAACACTATAAGACGAGAAGACCCCTGTGGAACTTTAAATAT
 AAATCAACTATTATTTACCACCTAAAGACTTATAATTAAGTCTGATCCATATTTTGGTTGGGGTGACCTCGGAGTAAA
 ACAAAACCTCCGAAAAGAACAATTTTCTTAACCTAGATTTACAACCTCAAAGTGCCACGGCAAAATGATCCAATATATTTGA
 TCAACGAACCAAGCTACCCAGGGATAACAGCGCAATCCCATCCTAGAGTTCCCTATCGACGATGGGGTTACGACCTCGATGTTG
 GATCAGGACATCCTGATGGTGCAACCGCTATCAAGGGTTCGTTTGTTC AACGATTAATAGTCCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCG
 GA

BDNF nucDNA – *Hybrid A*

>TTCCCTGACTATGGTTATTTTCATACTTTCAGTTGCATGAAAGCTGCCCCCTATGAAAGAAGCAAGTGTCAAGAGGACTAGGCAGCTTGG
 CTTACCCAGGTCTTCGGACCCCATGGGACTCTGGAGAGCCCTAAGTGGGCCCAACACTGGTTCAAGAGGACTGACATCATTTGGCAGG
 CACTTTTGAACATGTCATAGAGGAGCTTCTAGATGAGGAGCAGGACRTCCAGCCCAAGTGAAGAAACAAGGATGCCGACTTTGTA
 CACGTCCTCGGGTTATGCTAAGCAGTCAAGTGCCTTTGGAGCCCCCAATTGCTCTTTCTGCTTGAAGGAGTACAAAAAATTACTTTGGATG
 CWGCAAAATATGTCCATGAGGGTCCGGGCGYCACTCTGACCCCTGCTCGCCGTGGGGAGCTGAGCGTGTGTGACAGTACTAGTGAAGT
 GGGTAAACAGCAGCAGAGAAAAAGACTGCAGTGGACATGTCTGGTGCAACRGTACGGTCTTGAAAAAAGTCCCAGTACCCAAAAG
 GCCAACTGAAGCAATACTTCTATGAGACCAAATGCCAAAGGYTACACAAAAAGAGGGTTGCAGGGGCATAGACAAAGAGGC
 ATTGGAATTCCCAGTGCCGAACCTACCCAGTCTTATGTGCGAGCTCTACCATGGATAACAAAAAGAGAGTTGGCTGGCGGTTTAT
 AAGAAATAGACACTTCCCTGTGTTTGTACACTGACCAATTAAAAAGGGGAAAAGATAGA

BDNF nucDNA – *Hybrid B*

>CCATCCTTTTCCCTGACTATGGTTATTTTCATACTTTCAGTTGCATGAAAGCTGCCCCCTATGAAAGAAGCAAGTGTCAAGAGGACTAGG
 CAGCTTGGCTTACCCAGGTCTTTCGGACCCCATGGGACTCTGGAGAGCCCTAAGTGGGCCCAACACTGGTTCAAGAGGACTGACATCA
 TTGGCAGGCACCTTTTGAACATGTCATAGAGGAGCTTCTAGATGAGGAGCAGGACATCCAGCCCAAGTGAAGAAACAAGGATGCC
 GACTTGTACACGCTCTCGGGTTATGCTAAGCAGTCAAGTGCCTTTGGAGCCCCCAATTGCTCTTCTGCTTGAAGGAGTACAAAAATTA
 CTTGGATGCAGCAAAATATGTCCAATGAGGGTCCGGCCCACTTGACCCCTGCTCGCCGTGGGAGCTGAGCGTGTGTGACAGTACT
 AGTGAGTGGGTAACAGCAGCAGAGAAAAAGACTGCAGTGGACATGTCTGGTCAACGGTTACGGTCTTGAAAAAAGTCCCAGTA
 CCCAAAGGCCA ACTGAAGCAATACTTCTATGAGACC AAATGCCAA TCCCAAAGGTTACACAAAAGAGGTTGCAGGGGCATAGAC
 AAGAGGCAATTGGAATTCGCCAGTGCCGAACTACCCAGTCTTATGTGCGAGCTCTACCATGGATAACAAAAAGAGAGTTGGCTGGC
 GGTTATAAGAATAGACACTTCCCTGTGTTTGTACACTGACCATTAAAAAGGGG

Cmos nucDNA – *Hybrid A*

>GGCCTGGTGGCTCCATCGACTGGGATCAATTGTGCCCTACTACAGCCCYTGGGCTCTGGGGGCTTTGGGTCCGTCTACAAGGCCAC
 CTACCA TGGGGAGACAGTGGCTGTGAAACAGGTTGAAGAAGTGCAGCAAGAACCGCTGGCATCACGGCAAAAGTTTCTGGGCTGA
 GCTGAAATGTGGCCCGCCTACASCATGAYAAATGTGTACGTGTTGTAGCTGCCAGCACATGTGCTGCCAGCCAAAGACAGCCTG
 GGCAGCATAAATAATGGAATATGCGGGCCGCACTACCCCTGCACCATGTCACTATGGCACTAGCTGCCCTGCAGGAAAAGGAGAG
 GATGATGGGGGTGGATGTGGCAGAGAACCCCTAAGCATAGCTAGTCCCTGGGTTATTGCTCTGACATTGTGACTGGCTTAGCCCT
 TCCTCCACTCACAGWGTATTGTGCACCTGGACCTGAAGCCTGTAATGTGTTAATCACCGAGCAGGTTGTGTAAAGATTGGAGA
 CTTTGGGTGCTCCCAAAGCTGGAAGAYAGTGTGTCCCAAGTCCCAAGCTTTACCAGCAGGGGGCCACATATACCCACCGTGCC
 CCTGAGCTCCTCAAAGGGGAGAAAGGTCAACCCCAAGCAGAAACATCTACAC

Cmos nucDNA – *Hybrid B*

>TGGTGCTCCATCGACTGGGATCAATTGTGCCTACTACAGCCCTGGGCTCTGGGGGCTTTGGGTCCGTCTACAAGGCCACCTACC
 ATGGGGAGACAGTGGCTGTGAACAGGTGAAGAAGTGCAGCAAGAACC GGCTGGCATCACGGCAAGTTTTCTGGGCTGAGCTGA
 ATGTGGCCCGCCTACACCATGACAAATGTGGTACGTGTGTAGCTGCCAGCACATGTGCTCCTGCCAGCCAAAGACAGCCTGGGCAG
 CATAATAATGGAATATGCGGGCCGCACTACCCCTGCACCA TGTCACTATGGCACTAGCTGCCCTGCAGGGAAAGGGAGAGGATGA
 TGGGGTGGATGTGGCAGAGAACCCCTAAGCATAGCTGATCCCTGGGTTATTGCTCTGACATTTGTGACTGGCTTAGCCCTTCCCTCC
 ACTCACAGTGTATTGTGCACCTGGACCTGAAGCCCTGCTAATGTGTTAATCACCGAGCAGGCTGTGTAAAGATTTGGAGACTTTGG
 GTGCTCCCAAAAGCTGGAAGATAGTGTGTCTCCAGGTCCCAAGCTTTACCAGCAGGGGGGCACATATACCCACCCGTGCCCTGAG
 CTCCCTCAAAGGGGAGAGGTCAACCCCAAGCAGACAT

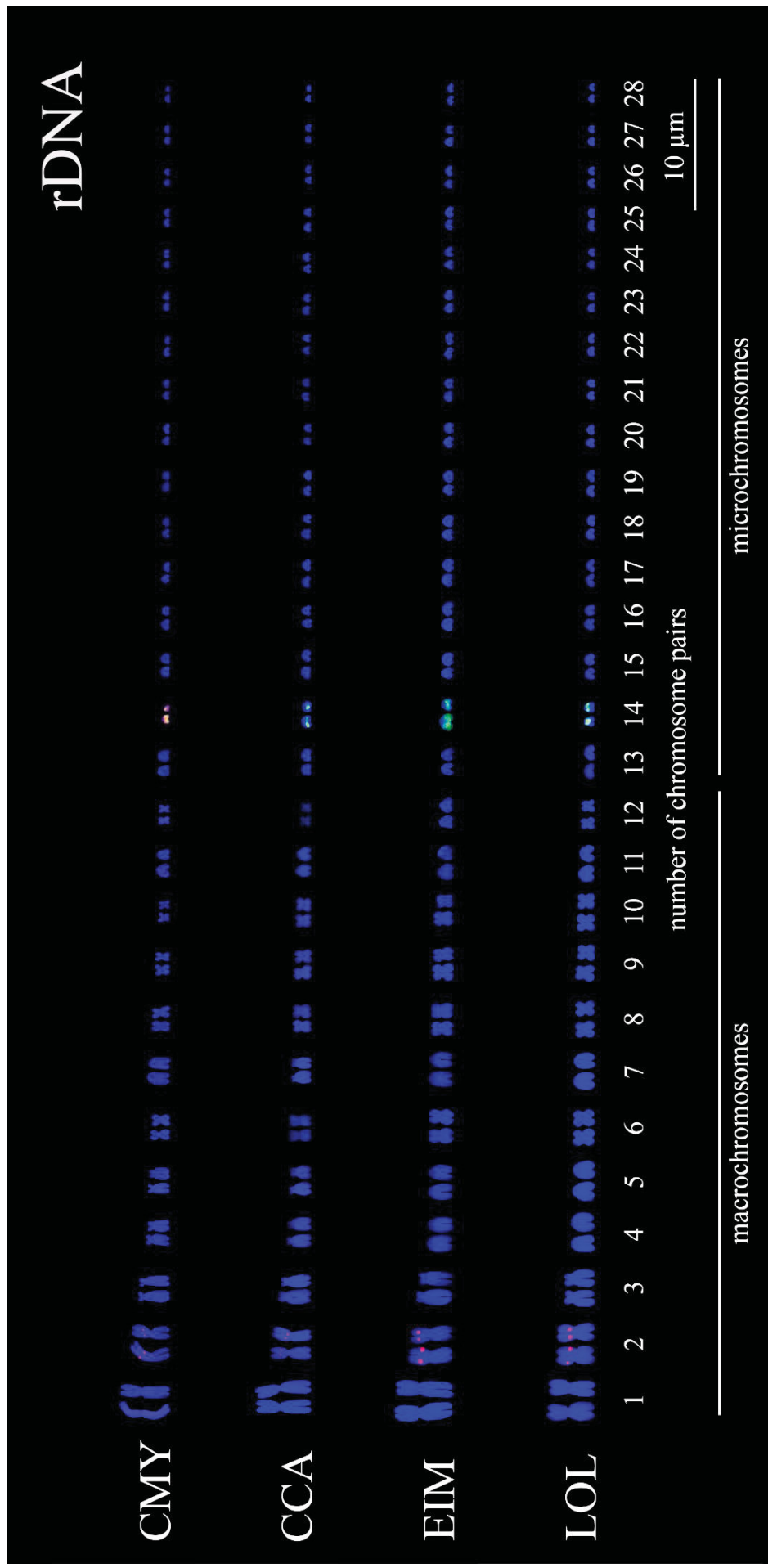
R35 nucDNA – *Hybrid A*

>GCATGTGAACATGTTGGGAATTGTTTCAGTGTCACTCCTTGTCCCTATGGATGTGTATGGAGTCAAGCCTCTCAGCTCCTWTCCATAAA
 GAATGAGAATTATCATGCAYGTGAAGCCMAATCCTGCCTGGCACTGAGTGCCCTCAAACCCCAATTGACTTTTGGGAGTGGRGGATG
 CTCAGCGCCTCACTGGATTGGCTCAGTCACTCCCTAAGAATTGCTTGGAACTGAGCTGCTTCTTTGGCAGACCTCAGGCATCAATA
 TTTATMATTTTCATTTGCAGCAT AAGGCATTTCTGAGAAATAGAGAGAGGGACTGTATGAGGACATTTGTSTTCTAGCA
 TCTGTCAAAGTCACAAAGCCCTAGCAGGAAATCAATGAAAATCTGTGACCCTCTATTTTGTGCACATTAACAAATGTGATGTTTTTGT
 ATTCTGGAAAT

R35 nucDNA – *Hybrid B*

>GAAACAGTCACTCCAGCAATTAAGAACAGCATAAATCACATCCATAGAAAGTCAATTTCAAACCTAGAGCTGTGTTTTGTCTGGCTTTTCAT
 CAGGATTGATACATTCATACAAAATCAGTGCATTTCAA AAAATGAAAAGCCAGATTCATATGTTTTTCCAGTTTTACATCAGTGT
 AAGCCACTGAAACCCAGCACAGAGCTAGGCTAATGGTAGGGTGAAATCAGGTTTTGTGTTTCAAGCAGTCTGGCAGGCATTTGGGTT
 GACTCTGAGATCTGTGAGTTTTACTAAGGCAGATTTGTTTTCTCCATCCTCAGTCTGAGTCAAGCCCTTTGCCAGTCACT
 CTGGGTAAGAAACTGAAGCTTGTCTGAGAAAGTGAAGAATGTTTGTATCTTTGTATTTGAAAGCATTAACAATTTGATGC
 AATGATGGAAAAGGATAAATAAACAAGGATACCTTACAAGTGAAGTCCCTTTGCTGGGCATGTGAACATGTTGGGAAATGTTTCAGT
 GTCATCCTTGTCTATCAATGTGTATGGAGTCAGCCTCTCAGCTCCTATCCATAAAGAAATGAGAATTAATCATGACGTGAAGCCGA
 ATCCTGCCCTGGCACTGAGTGCCCTCAAACCCCAATTGACTTTGGGAGTGGGGATGCTCAGCCCTCACTGGATTGGCTCAGTCATC
 CCTAAGAAATTGCTTGGAAATCTGAGCTGCTTCTTTGGCAGACCTCAGGCATCAATA TTTATAATTTTCATTTGCAGCAT AAGGCATTC
 TGAGAAATAGAGAGAGAGGGGAGGGACTGTATGAGGACATTTGTCTTCTAGCATCTGTCAAAGTCAAAAGCTCACAAGCCTAGCAGGAA
 TCAATGAAAATCTGTGATCTCTATTTTTTGTGCACATTAACAATGTGATGTTTTTGTATTCTCTGGAAAATTC A

Figure S1. Karyotypes of sea turtle species subjected to FISH using 5S (*red signals*) and 18S rDNAs (*green signals*). The species names were referred by their 3-letter acronym: *C. mydas* (CMY), *C. caretta* (CCA), *E. imbricata* (EIM) and *L. olivacea* (LOL).



Source: The author (2021).

Table S1 – Data of the sea turtle pure and hybrid species sampled in Brazilian coast or obtained in captive/rehab condition.

| Species | Samples | Condition | Localities |
|-------------------------------|--------------------------|-----------|-------------------------------------|
| <i>Chelonia mydas</i> | 3 juveniles | Captive | Extremoz – RN |
| | 15 juveniles | Wild | Ilha das Cobras, Pontal do Sul - PR |
| | 1 ♀ and 8 juveniles | Captive | Mata de São João - BA |
| <i>Caretta caretta</i> | 1 ♂ and 2 ♀ | Captive | Florianópolis – SC |
| | 1 ♂, 3 ♀ and 4 juveniles | Captive | Mata de São João - BA |
| <i>Eretmochelys imbricata</i> | 2 ♀ | Wild | Praia das Minas, Tibau do Sul - RN |
| | 4 juveniles | Captive | Mata de São João - BA |
| <i>Lepidochelys olivacea</i> | 3 juveniles | Captive | Extremoz - RN |
| | 1 ♂ and 2 juvenis | Captive | Mata de São João - BA |
| <i>Hybrid A</i> | 1 juvenile | Captive | Mata de São João - BA |
| <i>Hybrid B</i> | 1 juvenile | Rehab | Pontal do Sul - PR |

Source: The author (2021). Note: BA = Bahia state; RN = Rio Grande do Norte state; PR = Paraná state; SC = Santa Catarina state.

Table S2. mtDNA and nucDNA sequences from pure species of *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* and *L. olivacea* from GenBank.

| Gene Species | 12S | 16S | BDNF | Cmos | R35 |
|---------------------|--|--|---|---|--|
| <i>C. mydas</i> | FJ039920.1; FJ039927.1; FJ039934.1; FJ039941.1; FJ039948.1 | FJ039921.1; FJ039928.1; FJ039935.1; FJ039942.1; FJ039949.1 | FJ039922.1; FJ039929.1; FJ039936.1; FJ039943.1; FJ039950.1; JF415094.1; JF415095.1; JF415096.1 | FJ039923.1; FJ039930.1; FJ039937.1; FJ039944.1; FJ039951.1; | FJ039924.1; FJ039931.1; FJ039938.1; FJ039945.1; FJ039952.1; JF415118.1; JF415119.1 |
| <i>C. caretta</i> | FJ009020.1; FJ009027.1 | FJ009021.1; FJ009028.1 | FJ009022.1; FJ009029.1; JF415092.1 | FJ009023.1; FJ009030.1; JF415097.1; JF415098.1; JF415100.1; JF415104.1 | FJ009024.1; FJ009031.1; JF415108.1; JF415109.1 |
| <i>E. imbricata</i> | FJ039963.1; FJ039970.1 | FJ039964.1; FJ039971.1 | FJ039965.1; FJ039972.1 | FJ039966.1; FJ039973.1; JF415099.1; JF415101.1; JF415102.1; JF415105.1; JF415106.1 | FJ039967.1; FJ039974.1; JF415110.1; JF415111.1; JF415112.1; JF415114.1; JF415115.1; JF415116.1; JF415117.1 |
| <i>L. olivacea</i> | FJ039977.1; FJ039984.1 | FJ039978.1; FJ039985.1 | FJ039979.1; FJ039986.1; JF415093.1 | FJ039980.1; FJ039987.1; JF415103.1; JF415107.1 | FJ039981.1; FJ039988.1; JF415113.1; JX067524.1 |
| <i>Total</i> | 11 | 11 | 16 | 22 | 24 |

Source: Naro-Maciel et al. (2008) and Vilaça et al. (2012).

Table S3. Diversity indices for each analyzed gene in the four pure sea turtles and two possibly hybrids. N: number of sequences; h: number of haplotypes; S: polymorphic sites; hd: haplotype diversity; π : nucleotide diversity.

| Gene | Size (pb) | N | h | S | Parsimony informative sites | hd | π |
|-------------|-----------|----|----|----|-----------------------------|-------|---------|
| <i>I2S</i> | 395 | 13 | 8 | 38 | 37 | 0,923 | 0,03941 |
| <i>I6S</i> | 565 | 13 | 9 | 52 | 50 | 0,949 | 0,04124 |
| <i>BDNF</i> | 559 | 18 | 7 | 7 | 7 | 0,776 | 0,00452 |
| <i>Cmos</i> | 601 | 24 | 14 | 20 | 20 | 0,921 | 0,00815 |
| <i>R35</i> | 439 | 26 | 15 | 14 | 13 | 0,921 | 0,00928 |

Source: The author (2021).

Table S4. Most resolute parsimony informative sites for nucDNAs to identify hybrids between sea turtles.

| Position Species | BDNF (559 bp) | | | | Cmos (601 bp) | | | | R35 (439 bp) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|---------------|-----|-----|-----|---------------|-----|----|----|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 109 | 138 | 234 | 261 | 366 | 447 | 33 | 56 | 176 | 182 | 218 | 325 | 389 | 401 | 423 | 458 | 521 | 530 | 46 | 47 | 77 | 105 | 114 | 146 | 165 | 262 | 333 | 389 | |
| <i>C. caretta</i> | A | C | A | C | G | T | C | C | C | T | A | C | C | C | T | G | T | T | C | A | A | C | G | C | G | A | C | C | T |
| <i>C. mydas</i> | A/G | C | T | T | A/G | C | T | C | G | T | C | A | C | C | A | G | T | C | C | G | T | C/T | C | C | C | A | A/C | C/G | C |
| <i>E.imbricata</i> | A | C | A | C | G | T | C | C | C | T | A | C | C | C | T | G | C | C | C | C/G | A/G | A | C | A/G | C | G | A | C | C/T |
| <i>L.olivacea</i> | A | T | A | C | G | T | C | T | C | T | G | T | T | T | C | T | C | C | G | G | A | C | G | T | G | A | C | C | |
| Hybrid A | R | C | W | Y | R | Y | Y | C | S | Y | Y | A | C | C | W | G | Y | C | G | G | W | Y | M | C | R | M | S | C | |
| Hybrid B | A | C | A | C | G | T | C | C | C | T | A | C | C | C | T | G | T | T | C | C | A | A | C | G | C | G | A | C | T |

Source: The author (2021).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os répteis, de maneira geral, são elementos-chave no entendimento da evolução dos vertebrados e estudos em espécies pertencentes a essa classe trazem respostas importantes sob um olhar evolutivo. As tartarugas marinhas pertencem à mais antiga linhagem de répteis que habita o nosso planeta, migrando pelos oceanos há milhões de anos. Diversos aspectos da vida desses animais permanecem sem respostas, devido ao hábito de vida migratório e também à ausência de estudo mais aprofundados no grupo. A genética das tartarugas marinhas vem evoluindo ao longo dos anos, dando diversas respostas às questões que dizem respeito à taxonomia, identificação da origem de animais em áreas de alimentação e reprodução, e hibridização entre as espécies. Contudo, citogenética de tartarugas marinhas é um campo que ainda pode ser muito explorado e já vem revelando fatos interessantes sobre a evolução cariotípica da família Cheloniidae.

O fenômeno de hibridização entre espécies de tartarugas marinhas surpreende pesquisadores ao redor do mundo devido à sua alta ocorrência na costa brasileira. Estudos já apontam os motivos desse fenômeno, identificam as zonas de hibridação e as espécies envolvidas, porém ainda pouco se sabe sobre as consequências da hibridização para as espécies puras e o futuro dos indivíduos híbridos. A hibridação entre as espécies nunca havia sido estudada a partir de uma abordagem citogenética. Nesse estudo, desenvolvemos marcadores cromossômicos para as tartarugas marinhas da família Cheloniidae e identificamos marcas específicas para as espécies, as quais foram utilizadas no reconhecimento das híbridas *A* e *B*.

No primeiro capítulo, foram identificadas as regiões heterocromáticas e a localização dos microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAG)₁₀ e (GATA)₈ em espécies puras da família Cheloniidae. Os dados gerados corroboraram a proposta do reposicionamento de centrômero como responsável pelas diferenças encontradas no cariótipo das espécies, comprovando que os cariótipos das tartarugas marinhas não são homogêneos. Foram identificados diferentes padrões de distribuição da heterocromatina e sítios microssatélites nos cromossomos mostrando a importância desses marcadores na diversificação cariotípica do grupo.

No segundo capítulo, realizou-se uma análise integrada entre morfologia, citogenética e molecular buscando a identificação de dois indivíduos híbridos entre espécies de tartarugas marinhas. Marcadores cromossômicos de microssatélites (CA₁₅, GA₁₅ e GATA₈) já desenvolvidos para as espécies puras e novos marcadores de rDNA 5S foram aplicados em cariótipos híbridos. Dessa análise foram obtidos dados robustos que permitiram chegar à conclusão de que a *híbrida A* é um F2 entre *C. caretta* x *E. imbricata* x *C. mydas* e a *híbrida B*

é o resultado de um retrocruzamento entre *C. caretta* x *L. olivacea*. Os resultados demonstram conjuntos cromossômicos balanceados, porém não se pode confirmar se esses híbridos são férteis ou se poderão produzir prole viável e quais serão as consequências dessa hibridização à longo prazo.

As contribuições desse estudo para o grupo abrem portas para o desenvolvimento de novos marcadores cromossômicos de DNAs repetitivos para as espécies e o estabelecimento dessas marcas em espécies puras para a aplicação, em maior escala, na identificação de indivíduos híbridos. Estudos futuros podem utilizar a citogenética como uma ferramenta auxiliar na identificação de híbridos e se aprofundar no impacto dessa hibridização nos cariótipos, podendo contribuir com estratégias de manejo e conservação para as espécies.

REFERÊNCIAS

As referências correspondem à bibliografia utilizada na introdução e nos materiais e métodos desta tese.

ABBOTT, R. et al. Hybridization and speciation. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 26, n. 2, p. 229-246, 2013.

AGUIRRE, A. A. Fibropapillomas in marine turtles: a workshop at the 18th Annual Symposium on Biology and Conservation of Sea Turtles. **Marine Turtle Newsletter**, v. 82, n. 1, p. 0-12, 1998.

ALMEIDA, de P. A. et al. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. **Revista Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 12-19, 2011.

ALLARD, M. W. et al. Support for natal homing in green turtles from mitochondrial DNA sequences. **Copeia**, p. 34-41, 1994.

ALLENDORF, F. W. et al. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 11, p. 613-622, 2001.

ARANTES, L. S. et al. New genetic insights about hybridization and population structure of hawksbill and loggerhead turtles from Brazil. **Journal of Heredity**, v. 111, n. 5, p. 444-456, 2020a.

ARANTES, L. S. et al. Genomic evidence of recent hybridization between sea turtles at Abrolhos Archipelago and its association to low reproductive output. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020b.

BANDELT, H. J. et al. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BAPTISTOTTE, C. et al. Reproductive biology and conservation status of the loggerhead sea turtle (*C. Caretta*) in Espírito Santo state, Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v.4, n.3, p.523-529, 2003.

BARBER, R. C. et al. Natural hybridization between a Kemp's Ridley (*Lepidochelys kempii*) and loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) confirmed by molecular analysis. **Chelonian Conservation and Biology**, v.4, n.3, p. 701-704, 2003.

BASS, A. L. et al. Testing models of female reproductive migratory behaviour and population structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with mtDNA sequences. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 3, p. 321-328, 1996.

BASS, A. L. et al. Green turtle (*Chelonia mydas*) foraging and nesting aggregations in the Caribbean and Atlantic: impact of currents and behavior on dispersal. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 4, p. 346-354, 2006.

BÉRUBÉ, M. e PALSBOÛLL, P. J. Hybridism. In: Encyclopedia of marine mammals. **Academic Press**: Cambridge, p. 496-501, 2018.

BICKHAM, J. W. et al. The karyotype and chromosomal banding patterns of the green turtle (*Chelonia mydas*). **Copeia**, v. 1980, n. 3, p. 540-543, 1980.

BICKHAM, J. W. Two-Hundred-Million-Year-Old Chromosomes: Deceleration of the Rate of Karyotypic Evolution in Turtles. **Science**, v. 212, n. 4500, p. 1291-1293, 1981.

BICKHAM, J. W. e CARR, J. L. Taxonomy and Phylogeny of the Higher Categories of Cryptodiran Turtles Based on a Cladistic Analysis of Chromosomal Data. **Copeia**, v. 1983, n. 4, p. 918-932, 1983.

BIÉMONT, C. e VIEIRA, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, p. 521-524, 2006.

BISCOTTI, M. A. et al. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 415-420, 2015.

BJORNDAL, K.A., Foraging ecology and nutrition of sea turtles. In: Lutz, P. L. and Musick, J. A. (eds.). *The Biology of Sea Turtles*. **CRC Press**: Boca Raton. p.199-231, 1997.

BOISSINOT, S. et al. The mobilome of reptiles: Evolution, structure, and function. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 157, n. 1-2, p. 21-33, 2019.

BOWEN, B. W. et al. A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping rate assessment and conservation relevance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 12, p. 5574-5577, 1993.

BOWEN, B. W. et al. Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. **Evolution**, v. 48, n. 6, p. 1820-1828, 1994.

BOWEN, B. W. et al. Trans-Pacific migrations of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) demonstrated with mitochondrial DNA markers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 9, p. 3731-3734, 1995.

BOWEN, B. W. What is a loggerhead turtle? The genetic perspective. In: Bolten A. B.; Witherington, B. E. (eds). *Loggerhead Sea Turtles*. **Smithsonian Press**: Washington. p. 7-27, 2003.

BOWEN, B. W. et al. Mixed-stock analysis reveals the migrations of juvenile hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean Sea. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 1, p. 49-60, 2007.

BOWEN, B. W. e KARL, S. A. Population genetics, phylogeography, and molecular evolution. In: Lutz, P. L.; Musick, J. A. (eds.). *The Biology of Sea Turtles*, **CRC Press**: Boca Raton. p. 39-50, 1997.

BOWEN, B. W. e KARL, S.A. Population genetics and phylogeography of sea turtles. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 4886-4907, 2007.

BOWEN, B. W. e WITZELL, W. N. Sea turtle conservation genetics. In: **Proceedings of the International Symposium on Sea turtle Conservation Genetics**. **NOAA Technical Memorandum NMFSSSEFSC-396**. **National Technical Information Service, Springfield, Virginia**, p. 1-9, 1995.

BULL, J. J. e VOGT, R. C. Temperature-dependent sex determination in turtles. **Science**, v. 206, n. 7, p. 1186-1188, 1979.

- CARR, A. e HIRTH, H. Social facilitation in green turtle siblings. **Animal Behaviour**, v. 9, n. 1-2, p. 68-70, 1961.
- CARR, A. F. et al. The ecology and migrations of sea turtles. The West Caribbean green turtle colony. **Bulletin of the of the American Museum of Natural History**, v. 162, p.1-46, 1978.
- CASTILHOS, J. C. de et al. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) no Brasil. **Revista Biodiversidade Brasileira**, Ano I, n. 1, p. 28-36, 2011.
- CAVALCANTE, M. G. et al. Physical mapping of repetitive DNA suggests 2n reduction in Amazon turtles *Podocnemis* (Testudines: Podocnemididae). **PLoS One**, v. 13, n. 5, p. e0197536, 2018.
- CAVALCANTE, M. G. et al. Evolutionary insights in Amazonian turtles (Testudines, Podocnemididae): co-location of 5S rDNA and U2 snRNA and wide distribution of Tc1/Mariner. **Biology open**, v. 9, n. 4, p. bio049817, 2020.
- CAVALCANTE, M. G. et al. Molecular cytogenetics characterization of *Rhinoclemmys punctularia* (Testudines, Geoemydidae) and description of a Gypsy-H3 association in its genome. **Gene**, v. 738, p. 144477, 2020.
- CHARLESWORTH, B. et al. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215-220, 1994.
- CHOWDHARY, B. P. e RAUDSEPP, T. Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. **Methods in Cell Science**, v. 23, p. 37-55, 2001.
- CONCEIÇÃO, M. B. et al. Eletrophoretic characterization of a hybrid between *Eretmochelys imbricata* and *Caretta caretta* (Cheloniidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 97B, n. 2, p. 275-278, 1990.
- DERRAIK, J. G. B. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. **Marine pollution bulletin**, v. 44, n. 9, p. 842-852, 2002.
- DOBIGNY, G. et al. Chromosomal polymorphism in mammals: an evolutionary perspective. **Biological Reviews**, v. 92, n. 1, p. 1-21, 2017.
- DUCHENE, S. et al. Marine turtle mitogenome phylogenetics and evolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 65, n. 1, p. 241-250, 2012.
- FARIA, R. e NAVARRO, A. Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 11, p. 660-669, 2010.
- FERREIRA JÚNIOR, P. D. Aspectos Ecológicos da Determinação Sexual em Tartarugas. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 139-154, 2009.
- FESCHOTTE, C. et al. Miniature inverted repeat transposable elements and their relationships to established DNA transposons. In: Craig, N.L.; Craigie, R.; Gellert, M. e Lambowitz, A.M. (eds.) Mobile DNA II. **ASM Press**: Washington. p 1147–1157, 2002.
- FOLEY, A. M. et al. Fibropapillomatosis in stranded green turtles (*Chelonia mydas*) from the eastern United States (1980–98): trends and associations with environmental factors. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 1, p. 29-41, 2005.

- FORMIA, A. et al. Mitochondrial DNA diversity and phylogeography of endangered green turtle (*Chelonia mydas*) populations in Africa. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 3, p. 353-369, 2006.
- FRAZER, N. B. e LADNER, R. C. A growth curve for green sea turtles, *Chelonia mydas*, in the US Virgin Islands, 1913-14. **Copeia**, v. 1986, n. 3, p. 798-802, 1986.
- FRECHOTTE, C. e PRITHAM, J. E. DNA transposons and evolution of eukaryotic genomics. **Annual Review of Genetics**, v. 41, n. 331, p. 69, 2007.
- FUJITA, M. K. et al. Turtle phylogeny: insights from a novel nuclear intron. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 31, n. 3, p. 1031-1040, 2004.
- FUKUDA, T. et al. Efficient establishment of primary fibroblaste cultures from the hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 48, p. 660-665, 2012.
- FUKUDA, T. et al. Primary fibroblast cultures and karyotype analysis for the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 50, p. 381-383, 2013.
- GALINDO, David Javier et al. Chromosomal Polymorphism and Speciation: The Case of the Genus *Mazama* (Cetartiodactyla; Cervidae). **Genes**, v. 12, n. 2, p. 165, 2021.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in plants: more than just rubbish. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 2, p. 153-170, 2015.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: an evolving topic. **Genes**, v. 8, n. 9, p. 230, 2017.
- GONZALEZ, J. e PETROV, D. A. Evolution of genome content: population dynamics of transposable elements in flies and humans. **Evolutionary Genomics**, p. 361-383, 2012.
- GREGORY, T. R. Genome size evolution in animals. In: Gregory, T. R. (eds.). The evolution of the genome, **Elsevier**: San Diego. p. 3-87, 2005.
- HAMANN, M. et al. Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. **Endangered Species Research**, v. 11, n. 3, p. 245-269, 2010.
- HARDMAN, N. Structure and function of repetitive DNA in eukaryotes. **Biochemical Journal**, v. 234, p. 1-11, 1986.
- HARRISON, R. G. Hybrid zones and the evolutionary process. **Oxford University Press on Demand**: New York, 1993.
- HARRISON, R. G. e LARSON, E. L. Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. **Journal of Heredity**, v. 105, n. S1, p. 795-809, 2014.
- HAWKES, L. A. et al. Investigating the potential impacts of climate change on a marine turtle population. **Global Change Biology**, v. 13, n. 5, p. 923-932, 2007.
- HICKMAN, C. P. Princípios integrados de Zoologia. 11 ed. **Guanabara Koogan**: Rio de Janeiro. 846 p. 2004.
- HIRAYAMA, R. Oldest known sea turtle. **Nature**, v. 392, n. 6677, p. 705-708, 1998.
- IANNUCCI, A. et al. Insights into emydid turtle cytogenetics: the European pond turtle as a model species. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 157, n. 3, p. 166-171, 2019.

ICMBio. **Destaque – Tartaruga de Pente.** Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/atendimentoaocidadao-2/28-fauna-brasileira/especies-ameacadas/624-destaque-tartaruga-de-pente>. Acesso em: 17 de junho de 2021.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species.** Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 17 de junho de 2021.

IVERSON, J. B. et al. In search of the tree of life for turtles. **Chelonian Research Monographs**, v. 4, p. 85-106, 2007.

JAMES, M. C. et al. Hybridization Between a Green Turtle, *Chelonia mydas*, and Loggerhead Turtle, *Caretta caretta*, and the First Record of a Green Turtle in Atlantic Canada. **The Canadian Field-Naturalist**, v. 118, p. 579-582, 2004.

JENSEN, M. P. et al. Molecular Genetics of Sea Turtles. In: Wyneken, J.; Lohmann, K. J. e Musick, J. A. (eds.). *The Biology of Sea Turtles Volume III*. **CRC Press**: Boca Raton. p. 135-161, 2013.

KAMEZAKI, N. Karyotype of the Loggerhead Turtle, *Caretta caretta*, from Japan **Zoological Science**, v. 6, p. 421-422, 1989.

KAMEZAKI, N. Karyotype of the Hawksbill Turtle, *Eretmochelys imbricata*, from Japan, with Notes on a Method for Preparation of Chromosomes from Liver Cells. **Japanese Journal of Herpetology**, v. 13, n. 4, p. 111-113, 1990.

KALB, Heather Jean. **Behavior and physiology of solitary and arribada nesting olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*) during the internesting period.** Tese de Doutorado, Texas A&M University, College Station, TX. 123p.

KARL, S. et al. Hybridization among the ancient mariners: characterization of marine turtle hybrids with molecular genetic assays. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 262-268, 1995.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KETTLEWELL, J. et al. Temperature dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation. **Genesis**, v. 26, p. 174–178, 2000.

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, p. 49-63, 2002.

KOCHER, T. D. et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 16, p. 6196-6200, 1989.

KOMOROSKE, L. M. et al. Advances in the application of genetics in marine turtle biology and conservation. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, p. 156, 2017.

KUBAT, Z. et al. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, v. 51, n. 5, p. 350-356, 2008.

LARA-RUIZ, P. et al. Extensive hybridization in hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. **Conservation Genetics**, v. 7, p. 773-781, 2006.

- LAHANAS, P. N. et al. Genetic composition of a green turtle (*Chelonia mydas*) feeding ground population: evidence for multiple origins. **Marine Biology**, v. 130, n. 3, p. 345-352, 1998.
- LE, M. et al. A molecular phylogeny of tortoises (Testudines: Testudinidae) based on mitochondrial and nuclear genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 2, p. 517-531, 2006.
- LEHMAN, N. et al. Introgression of coyote mitochondrial DNA into sympatric North American gray wolf populations. **Evolution**, v. 45, n. 1, p. 104-119, 1991.
- LEIGH, J. W. e BRYANT, D. POPART: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110-1116, 2015.
- LI, Y et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2453-2465, 2002.
- LIBRADO, P. e ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.
- LOHMANN, K. J. et al. Orientation, navigation, and natal beach homing in sea turtles. In: Lutz, P. L. and Musick, J. A. (eds.). *The Biology of Sea Turtles*. **CRC Press**: Boca Raton, FL, p. 108-135, 1997.
- LOHMANN, K. J. et al. Regional magnetic fields as navigational markers for sea turtles. **Science**, v. 294, n. 5541, p. 364-366, 2001.
- LOHMANN, K. J. Sea turtles: navigating with magnetism. **Current Biology**, v. 17, n. 3, p. R102-R104, 2007.
- LÓPEZ, E. A. et al. Condiciones óptimas de cultivo de linfócitos y análisis parcial del cariotipo de la tortuga cabezona, *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae) en Santa Marta, Caribe Colombiano. **Revista de Biología Tropical**, v. 56, n. 3, p. 1459-1469, 2008.
- LUTCAVAGE, M. E. et al. Human impacts on sea turtle survival. In: Lutz, P. L.; Musick, J. A. (eds.). *The Biology of Sea Turtles*, **CRC Press**: Boca Raton. p. 387-409, 1997.
- LUTZ, P. L. Salt, water and pH balance in the sea turtle. In: Lutz, P. L. and Musick, J. A. (eds.). *The Biology of Sea Turtles*. **CRC Press**: Boca Raton. p. 343-361, 1997.
- MACHADO, C. R. D. et al. Comparative cytogenetics of four sea turtle species (Cheloniidae): G-banding pattern and in situ localization of repetitive DNA units. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 9, p. 531-538, 2020.
- MARCOVALDI, M. A. et al. Estimating sex ratios of loggerhead turtles in Brazil from pivotal incubation durations. **Canadian Journal of Zoology**, v. 75, n. 5, p. 755-770, 1997.
- MARCOVALDI, M. A. et al. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) no Brasil. **Revista Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 20-27, 2011.
- MARTINS, C. e WASKO, A. P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. **Focus on Genome Research**, v. 289, p. 318, 2004.
- MÁRQUEZ, M. R. Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. 11 ed. **FAO Fisheries Synopsis**: Rome. 81 p. 1990.
- MAYR, E. Animal species and evolution. **Harvard University Press**: Cambridge, 1963.

- MEDRANO, L. et al. Karyotype of the sea turtle *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761). **Amphibia-Reptilia**, v. 8, p. 171-178, 1987.
- MEYLAN, A. B. et al. A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. **Science**, v. 248, p. 724-727, 1990.
- MEYLAN, A. B. e DONNELLY, M. Status justification for listing the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) as critically endangered on the 1996 IUCN Red List of Threatened Animals. **Chelonian Conservation and Biology**, v.3, n.2, p.200-224, 1999.
- MEYLAN, A. B. e MEYLAN, P. A. Introducción a la Evolución, Historias de Vida y Biología de las Tortugas Marinas. In: Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. **IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication**, n 4, 1999.
- MILLER, J.D. Reproduction in sea turtles. In: Lutz, P. L. and Musick, J. A. (eds.). The Biology of Sea Turtles. **CRC Press**: Boca Raton. p. 51-82, 1997.
- MIZOGUCHI, B. e VALENZUELA, N. Alternative splicing and thermosensitive expression of Dmrt1 during urogenital development in the painted turtle, *Chrysemys picta*. **PeerJ**, v. 8, p. e8639, 2020.
- MONTIEL, E. E. et al. Cytogenetic insights into the evolution of chromosomes and sex determination reveal striking homology of turtle sex chromosomes to amphibian autosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 148, n. 4, p. 292-304, 2016.
- MORREALE, S. J. et al. Temperature dependent sex determination: Current practices threaten conservation of sea turtles. **Science**, v. 216, p. 1245-1247, 1982.
- MROSOVSKY, N. et al. Sex ratio of two species of sea turtle nesting in Suriname. **Canadian Journal of Zoology**, v. 62, n. 11, p. 2227-2239, 1984.
- MROSOVSKY, N. et al. Pivotal and beach temperatures for hawksbill turtles nesting in Antigua. **Canadian Journal of Zoology**, v. 70, n. 10, p. 1920-1925, 1992.
- MURDOCK, C. e WIBBELS, T. Expression of Dmrt1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 101, p. 302-308, 2003.
- NARO-MACIEL, E. et al. Evolutionary relationships of marine turtles: a molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 2, p. 659-662, 2008.
- NAVARRO, A. e BARTON, N. H. Accumulating postzygotic isolation genes in parapatry: a new twist on chromosomal speciation. **Evolution**, v. 57, n. 3, p. 447-459, 2003.
- NEI, M. e ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 121-152, 2005.
- NOONAN, B. P. e CHIPPINDALE, P. T. Dispersal and vicariance: the complex evolutionary history of boid snakes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 2, p. 347-358, 2006.
- NORMAN, J. A. et al. Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. **Molecular Ecology**, v. 3, n. 4, p. 363-373, 1994.
- NOWAK, R. Mining treasures from junk DNA. **Science**, v. 263, p. 608-610, 1994.
- OWENS, D. W. et al. The imprinting hypothesis and sea turtle reproduction. **Herpetologica**, p. 124-135, 1982.

- PARHAM, J. F. e ZUG, G. R. *Chelonia agassizii* - valid or not. **Marine Turtle Newsletter**, v. 72, n. 2, 1996.
- PEKKALA, N. et al. The benefits of interpopulation hybridization diminish with increasing divergence of small populations. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 25, n. 11, p. 2181-2193, 2012.
- PEREIRA, A. G. et al. Multilocus phylogeny and statistical biogeography clarify the evolutionary history of major lineages of turtles. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 113, p. 59-66, 2017.
- PIEAU, C. Temperature variation and sex determination in reptiles. **BioEssays**, v. 18, n. 1, p. 19-26, 1996.
- PIETT, S. et al. Characteristics for evaluating the conservation value of species hybrids. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 8, p. 1931-1955, 2015.
- PINKEL, D. et al. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.
- PRITCHARD, P. C. H. Evolution, phylogeny and current status. In: Lutz, P. L. and Musick, J. A. (eds.). *The Biology of Sea Turtles*. **CRC Press**: Boca Raton, FL. p. 1-28, 1997.
- PRITCHARD, P.C.H. e MORTIMER, J. A. Taxonomy, external morphology and species identification. In: Eckert, K.; Bjorndal, K.; Abreu-Grobois, F. e Donnelly, M. (eds.). *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. **IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication**, v. 21, n. 4, p. 23-41, 1999.
- PROIETTI, M. C. et al. Hawksbill× loggerhead sea turtle hybrids at Bahia, Brazil: where do their offspring go?. **PeerJ**, v. 2, p. e255, 2014.
- PURVES, W. K. *Life: The science of biology*. **Sinauer Associates**: Sunderland, MA. 2001.
- RAO, S. R. et al. DNA repetitive sequences types, distribution and function: A review. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 7-8, p. 1-11, 2010.
- REIS, E. C. et al. Evidence of olive ridley mitochondrial genome introgression into loggerhead turtle rookeries of Sergipe, Brazil. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 4, p. 1587-1591, 2010a.
- REIS, E. C. et al. Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 4, p. 1467-1477, 2010b.
- RODRÍGUEZ, P. A. et al. Agentes mitogénicos para cultivos de linfocitos en quelonios. **Orinoquia**, v. 7, n. 1-2, p. 47-49, 2003.
- RHYMER, J. M. e SIMBERLOFF, D. Extinction by hybridization and introgression. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 27, n. 1, p. 83-109, 1996.
- ROMANO, S. L. e PALUMBI, S. R. Molecular evolution of a portion of the mitochondrial 16S ribosomal gene region in scleractinian corals. **Journal of Molecular Evolution**, v. 45, n. 4, p. 397-411, 1997.
- SANCHES, T. M. e BELLINI, C. Juvenile *Eretmochelys imbricata* and *Chelonia mydas* in the Archipelago of Fernando de Noronha, Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 3, n. 2, p. 308-311, 1999.

- SANTOS, A. S. et al. Plano de ação nacional para a conservação de tartarugas marinhas. **Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade (ICMBio)**: Brasília, p. 21. 2011a.
- SANTOS, A. S. et al. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Caretta caretta* Linnaeus, 1758 no Brasil. **Revista Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 3-11, 2011b.
- SCHEMBERGER, M. O. et al. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**, v. 139, p. 1499–1508, 2011.
- SCHUYLER, Q. et al. Global analysis of anthropogenic debris ingestion by sea turtles. **Conservation Biology**, v. 28, n. 1, p. 129-139, 2014.
- SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**, v. 2, n. 7731, p. 971-972, 1971.
- SEMINOFF, J. A. et al. Hybridization of the green turtle (*Chelonia mydas*) and hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in the Pacific Ocean: indication of an absence of gender bias in the directionality of crosses. **Bulletin of Marine Science**, v. 73, n. 3, p. 643-652, 2003.
- SHAFFER, H. B. et al. The western painted turtle genome, a model for the evolution of extreme physiological adaptations in a slowly evolving lineage. **Genome Biology**, v. 14, n. 3, p. 1-23, 2013.
- SHAPIRO, J. A. e STERNBERG, R. V. Why repetitive DNA is essential to genome function. **Biological Reviews**, v. 80, n. 2, p. 227-250, 2005.
- SIM, E. L. et al. Non-modal scute patterns, morphology, and locomotor performance of loggerhead (*Caretta caretta*) and flatback (*Natator depressus*) turtle hatchlings. **Copeia**, v. 2014, n. 1, p. 63-69, 2014.
- SMIT, S. et al. Evolutionary rates vary among rRNA structural elements. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 10, p. 3339-3354, 2007.
- SOARES, L. S. et al. Comparison of reproductive output of hybrid sea turtles and parental species. **Marine Biology**, v. 164, n. 1, p. 1-10, 2017.
- SOARES, L. S. et al. Effects of hybridization on sea turtle fitness. **Conservation Genetics**, v. 19, n. 6, p. 1311-1322, 2018.
- SUÁREZ, P. et al. Highest diploid number among Gymnotiformes: first cytogenetic insights into *Rhabdolichops* (Sternopygidae). **Zebrafish**, v. 14, n. 3, p. 272-279, 2017.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.75, p.304-306, 1972.
- SUMNER, A. T. Chromosomes: organization and function. **Blackwell Publishing**: New York. 304 p. 2003.
- TAUTZ, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: DNA fingerprinting: State of the science, S. D. J. Pena, R. Chakraborty, J. T. Epplen et al. (eds.). DNA fingerprinting: State of the science. **Birkhäuser Verlag Basel**: Switzerland. P. 21-28, 1993.
- TOLLIS, M. et al. The Agassiz's desert tortoise genome provides a resource for the conservation of a threatened species. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0177708, 2017.

- VALENZUELA, N. e ADAMS, D. C. Chromosome number and sex determination coevolve in turtles. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, v. 65, n. 6, p. 1808-1813, 2011.
- VARGAS, S. M. et al. Phylogeography, genetic diversity, and management units of hawksbill turtles in the Indo-Pacific. **Journal of Heredity**, v. 107, n. 3, p. 199-213, 2016.
- VILAÇA, S. T. et al. Nuclear markers reveal a complex introgression pattern among marine turtle species on the Brazilian coast. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 17, p. 4300-4312, 2012.
- VILAÇA, S. T. e SANTOS, F. R. Molecular data for the sea turtle population in Brazil. **Dataset Papers in Science**, v. 2013, 2013.
- VOGT, P. Code domains in tandem repetitive DNA sequence structures. **Chromosoma**, v. 101, n. 10, p. 585-589, 1992.
- WANG, Z. et al. The draft genomes of soft-shell turtle and green sea turtle yield insights into the development and evolution of the turtle-specific body plan. **Nature Genetics**, v. 45, n. 6, p. 701-706, 2013.
- WEISHAMPEL et al. Earlier nesting by loggerhead sea turtles following sea surface warming. **Global Change Biology**, v. 10, n. 8, p. 1424-1427, 2004.
- WIENBERG, J. e STANYON, R. Comparative painting of mammalian chromosomes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 7, n. 6, p. 784-791, 1997.
- WICKER, T. W. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 973-982, 2007.
- WOOD, J. R. et al. Hybridization of *Chelonia mydas* and *Eretmochelys imbricata*. **Copeia**, v. 1983, n. 3, p. 839-842, 1983.
- WYNEKEN, J. The anatomy of sea turtles. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC, v. 470, p. 1-172, 2001.
- YNTEMA, C. L. e MROSOVSKY, N. Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. **Canadian Journal of Zoology**, v. 60, n. 5, p. 1012-1016, 1982.