

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN LA TORTUGA PINTADA (*Trachemys dorbigni*: TESTUDINATA, EMYDIDAE)

ANABEL ELIANA SALAS¹, ALBA IMHOF² y PATRICIA AMAVET^{1,3}

¹ Laboratorio 3, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, 3000, Santa Fe, Argentina.

² Laboratorio de Zoología Aplicada, Anexo Vertebrados, Departamento de Ciencias Naturales (Facultad de Humanidades y Ciencias – UNL/ MASP/MA), A. del Valle 8700, 3000 Santa Fe, Argentina. ³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Rivadavia 1917, 1033 Buenos Aires, Argentina. E-mail: anabelesalas@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la estructura cromosómica de *Trachemys dorbigni* (Testudinata, Emydidae) aportando información a los escasos antecedentes citogenéticos reportados. Se analizaron 14 ejemplares alojados en instalaciones de la Estación Zoológica Experimental “Granja La Esmeralda” de la ciudad de Santa Fe provenientes de diferentes decomisos, por lo que sus lugares de origen no pudieron ser establecidos. Las preparaciones se obtuvieron a partir de cultivo de sangre entera y el análisis de metafases se realizó mediante tinción convencional Giemsa y tinciones diferenciales C y NOR. Los resultados determinaron un número cromosómico diploide de $2n = 50$, y los cromosomas se clasificaron según su morfología en 6 pares de metacéntricos/submetacéntricos, 10 pares de acrocéntricos/telocéntricos y 9 pares de microcromosomas; dicha clasificación fue corroborada mediante promedio de relación de brazos e índice centromérico. No se observaron diferencias morfológicas entre cariotipos de machos y hembras, mientras que los bandeos C revelaron heterocromatina en posición telomérica y en bloque y los bandeos NOR determinaron una región organizadora nucleolar en el par 13, en posición terminal en ambos telómeros. Este trabajo permite ampliar los escasos antecedentes citogenéticos en esta especie, debiéndose profundizar el estudio mediante bandeo con fluorescencia para corroborar o complementar los resultados obtenidos.

Palabras clave:

tortuga pintada, cariotipo, bandeos cromosómicos.

CYTOGENETIC STUDIES ON THE PAINTED TURTLE (*Trachemys dorbigni*: TESTUDINATA, EMYDIDAE)

ANABEL ELIANA SALAS¹, ALBA IMHOF² & PATRICIA AMAVET^{1,3}

¹Laboratorio 3, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, 3000, Santa Fe, Argentina.

²Laboratorio de Zoología Aplicada, Anexo Vertebrados, Departamento de Ciencias Naturales (Facultad de Humanidades y Ciencias – UNL/ MASP/MA), A. del Valle 8700, 3000 Santa Fe, Argentina. ³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Rivadavia

1917, 1033 Buenos Aires, Argentina. E-mail: anabelesalas@hotmail.com

ABSTRACT

The aim of the present study was to characterize the karyotypic structure of *Trachemys dorbigni* (Testudinata, Emydidae) contributing information to the scarce cytogenetic data reported. Fourteen specimens housed on the premises of the Estación Zoológica Experimental “Granja La Esmeralda” of Santa Fe City were analyzed. The exact place of origin could not be determined since they came from various confiscations. Preparations were obtained from whole blood culture. The analysis of metaphases was performed by conventional Giemsa staining and differential banding. The results showed a diploid chromosome number of $2n=50$. Chromosomes were classified according to their morphology in 6 pairs of metacentric/submetacentric, 10 pairs of acrocentric / telocentric and 9 pairs of microchromosomes; this classification was corroborated by average arm ratio and centromeric index. No morphological differences were observed between the karyotypes of males and females, whereas C banding showed heterochromatin telomeric position, and NOR staining determined a nucleolar organizer region in pair 13, in both telomeres in terminal position. This work allows broadening the limited cytogenetic background regarding this species, being necessary further studies using fluorescence banding to corroborate or supplement our results.

Key words:

painted turtle, karyotype, banding chromosomic.

INTRODUCCIÓN

La especie *Trachemys dorbigni* (Testudinata, Emydidae) estuvo sujeta durante muchos años a una permanente discusión taxonómica. Es importante mencionar la sinonimia que esta especie ha presentado a lo largo de los años, antes de adoptar su nombre actual (Cabrera, 1998). Inicialmente fue denominada *Emys dorbigni* o *Trachemys dorbigni* por Dumeril & Bibron (1835); luego fue adoptando diferentes denominaciones: *Pseudemys dorbigni* (Wermuth & Mertens, 1961); *Pseudemys dorbignyi brasiliensis* (Freiberg, 1969); *Pseudemys dorbignyi dorbignyi* (Freiberg, 1969); *Pseudemys scripta dorbigni* (Moll & Legler, 1971); y en la actualidad se denomina *Trachemys dorbigni* (Seidel, 1989). Seidel (2002) propuso mediante un análisis filogenético de caracteres morfológicos del género *Trachemys*, que *T. dorbigni brasiliensis* es una subespecie de *T. dorbigni*, siendo éstas dos formas muy similares que pueden entrar en contacto en el sur de Brasil. Sin embargo, Del Barco & Larriera (1993), Hahn (2005) y Bickham *et al.* (2007) consideran que *T. dorbigni* no posee diferenciación de subespecies.

Por mucho tiempo *T. dorbigni* estuvo considerada como una subespecie de *Trachemys scripta* (Moll & Legler, 1971). Por otro lado, Williams (1956), Wermuth & Mertens (1961, 1977); Seidel (1989); Del Barco & Larriera (1993), Hahn (2005) y posteriormente, Bickham *et al.* (2007) la propusieron como una especie distinta. Seidel (1990) considera que *T. dorbigni* y *T. scripta* están ampliamente separadas, en cuanto a su distribución, impidiendo el flujo genético entre las poblaciones, y justificándose así la entidad específica de *T. dorbigni* (De La Fuente *et al.*, 2002).

Existen escasos antecedentes en relación con la citogenética en este género. Bickham & Baker (1976) y posteriormente Bickham & Carr (1983) determinaron un cariotipo en *T. decorata* de $2n = 50$ constituido por 26 macrocromosomas (16 metacéntricos/submetacéntricos y 10 telocéntricos/subtelocéntricos) y 24 microcromosomas. Killebrew (1977) estableció para *Pseudemys* (= *Trachemys*) *scripta callirostris* un número de $2n = 50$. *Pseudemys* (= *Trachemys*) *ornata callirostris*, *Pseudemys scripta elegans* y *Pseudemys scripta callirostris* presentan un complemento cromosómico de $2n = 52$ según De Smet (1978). En otros géneros dentro de la familia Emydidae como *Graptemys barbouri* (Killebrew, 1977) y dos especies del género *Clemmys* (Bickham, 1975; 1976) se pudo observar un número diploide de 50 cromosomas.

En cuanto a la caracterización citogenética de *T. dorbigni* podemos citar a Cleiton & Giuliano-Caetano (2008) y Martínez *et al.* (2009) quienes establecieron un número diploide de $2n = 50$, distribuidos en 13 pares de macrocromosomas y 12 pares de microcromosomas. Los bandeos cromosómicos para *T. dorbigni* descritos por Martínez *et al.* (2009), indican para el bandeo C presencia de heterocromatina centromérica en varios de los macrocromosomas y para el bandeo NOR, presencia de la región organizadora nucleolar en sitios intersticiales de un par acrocéntrico. Estos resultados difieren de los

de Cleiton & Giuliano–Caetano (2008), quienes localizan esta región en sitios intersticiales en un par de los microcromosomas.

Debido a los escasos datos a nivel citogenético de esta especie, no sólo en el país, sino en toda el área de distribución, y a que está sujeta a la comercialización o tráfico para mascotismo, por ser confundida la coloración de su cabeza con una especie nativa de los Estados Unidos *T. scripta elegans* (Cleiton & Giuliano–Caetano, 2008), se considera que este trabajo constituye un aporte para la caracterización cromosómica de esta especie autóctona, que puede permitir la diferenciación a nivel genético de los ejemplares expuestos a esta metodología de explotación.

MATERIALES Y MÉTODOS

EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

Se emplearon catorce ejemplares de *T. dorbigni* alojados en instalaciones de la Estación Zoológica Experimental “Granja La Esmeralda” de la ciudad de Santa Fe que forman parte de una población establecida a partir de diferentes decomisos. La captura de los individuos se realizó en forma manual, siendo sexados teniendo en cuenta la forma de la cola y posición de la cloaca (Rueda Almonacid *et al.*, 2007). Se extrajo 1 ml de sangre por individuo utilizando una jeringa heparinizada (Heparina Sobrius), siguiendo la técnica de punción de los senos cervicales dorsales de Owen y Ruiz (1980).

Para la obtención de metafases se empleó la técnica de cultivo de sangre entera de Rohilla *et al.* (2006) con modificaciones, según se detalla a continuación:

Para cada muestra se utilizó un medio de cultivo conteniendo 4 ml de medio RPMI 1640 con L–glutamina y sin bicarbonato de sodio (HyClone), 0,1 ml de fitohemaglutinina (GIBCO BRL), 0,1 ml de penicilina/ estreptomina (GIBCO BRL) y 1ml de suero fetal bovino (SUERMER Biotecnológico R.A.). A éste se incorporaron 10 a 20 gotas de sangre y el período de incubación fue de 72 hs a 28 °C. Luego se agregaron 0,20 ml de Colcemid (GIBCO), con un tiempo de acción de 6 hs a 28 °C. Luego se realizó un tratamiento con 3 ml de solución hipotónica (CIK 0.075 M) dejando actuar una hora, a igual temperatura. A continuación se realizó una prefijación y luego tres lavados con fijador metanol–ácido acético (3:1).

Se realizaron goteos con las muestras fijadas y se tiñeron con colorante Giemsa al 10% en buffer fosfato a pH 6.8 durante 25 minutos. Para los bandeos diferenciales C se empleó la metodología de Sumner (1972): Se hidroliza el preparado en ácido clorhídrico (HCl) 0,2 N por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se lava con agua destilada, se seca y se sumerge durante 1 minuto en una solución de hidróxido de bario (BaOH) al 5% a 60° C. Posteriormente se incubaba en solución salina de citrato de sodio

(2xSSC) a 60 °C por una hora. Finalmente, el vidrio se colorea con una solución de Giemsa 10 % (pH 6.8) durante 10 minutos.

Para el bandeado NOR se siguió la metodología de Howell & Black (1980): sobre las preparaciones se añaden tres gotas de solución de gelatina (2 %) a pH 4 y dos gotas de solución acuosa de nitrato de plata (NO_3Ag) al 50 % y se lleva a baño termostático a 60 °C, de 13 a 15 minutos.

ANÁLISIS DE MUESTRAS

Las preparaciones fueron analizadas bajo microscopio óptico a 1000 aumentos totales y fotografiadas con microscopio Olympus trinocular (Modelo XSZ-011312) y cámara digital Olympus c-5000 200M (5.0 megapixels 3X).

Para el armado de los cariogramas, los cromosomas fueron clasificados según Levan *et al.* (1964) y Dos Santos Guerra (1986). Además se determinó el promedio de Índice Centromérico y de Relación de Brazos para cada par cromosómico utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Índice centromérico: } \frac{\text{longitud del brazo corto (p)}}{\text{longitud total del cromosoma (p+q)}} \times 100$$

$$\text{Relación de brazos: } \frac{\text{longitud del brazo largo (q)}}{\text{longitud del brazo corto (p)}}$$

Estos datos permitieron una clasificación morfológica más precisa de los cromosomas siguiendo las relaciones de Levan *et al.* (1964) y Dos Santos Guerra (1986). La medición de los cromosomas se llevó a cabo a través del Programa MotiC Images Plus 2.0 ML.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudió un total de 14 individuos de *Trachemys dorbigni*: tres machos, ocho hembras y tres a los que no se pudo determinar el sexo. Se logró ajustar la técnica de cultivo de linfocitos en relación con el tiempo y temperatura de incubación, como así también las condiciones de coloración de los cromosomas para la especie *T. dorbigni*. Se analizaron un total de 917 metafases mitóticas, utilizando 225 para la medición y el armado de los cariogramas (Fig. 1). Se determinó un complemento cromosómico diploide de 50 cromosomas, coincidiendo con Cleiton & Giuliano-Caetano (2008) y Martínez *et al.* (2009).

El complemento diploide de $2n = 50$ caracteriza a la familia Emydidae (Bickham, 1975

en Rohilla, 2006). Bickham & Baker (1976) y posteriormente Bickham & Carr (1983) determinaron un cariotipo para el género *Trachemys* (*T. decorata* y *T. scripta elegans*) de $2n=50$. Killebrew (1977) estableció para *Pseudemys* (= *Trachemys*) *scripta callirostris* un número de 50 cromosomas. Sin embargo De Smet (1978), determinó para *Pseudemys* (= *Trachemys*) *ornata callirostris*, *Pseudemys scripta elegans* y *Pseudemys scripta callirostris* un complemento cromosómico igual a 52.

En el cariotipo de las tortugas puede darse además de los macrocromosomas, presencia o ausencia de microcromosomas (Noieto *et al.*, 2006). En nuestro estudio hallamos 16 pares de macrocromosomas y 9 pares de microcromosomas. Los macrocromosomas de acuerdo con Levan *et al.* (1964) se agruparon en 6 pares metacéntricos/submetacéntricos (M/SM) y 10 pares acrocéntricos/telocéntricos (A/T) (Fig. 2).

Teniendo en cuenta la relación de brazos y el índice centromérico (Dos Santos Guerra, 1986) resultaron dentro del grupo de metacéntricos los pares 1, 2, 3, 4, 5 y 6; dentro de los acrocéntricos los pares 7 y 8; y entre los telocéntricos los pares 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16. Estos datos corroboran la clasificación realizada mediante la nomenclatura de Levan *et al.*, 1964 y Dos Santos Guerra, 1986 (Tabla 1).

Nuestra clasificación difiere de la realizada por Cleiton & Giuliano–Caetano (2008) y Martínez *et al.* (2009), quienes agrupan los cromosomas en 13 pares de macrocromosomas (8 pares metacéntricos/submetacéntricos y 5 pares acrocéntricos/telocéntricos) y 12 pares de microcromosomas, empleando un software para la clasificación (Photoshop CS®) sin realizar ningún tipo de medición cromosómica. Las diferencias con nuestros resultados pueden deberse a diferentes criterios de clasificación o bien, a diferencias reales entre los cariotipos de los ejemplares analizados: Martínez *et al.* (2009) utilizan 4 ejemplares provenientes de las provincias de Entre Ríos y Corrientes; mientras que Cleiton & Giuliano–Caetano (2008) trabajaron con nueve ejemplares muestreados en Brasil, sin definición de las localidades de origen, como en nuestro caso. Consideramos que los datos para comparar nuestro cariotipo con los obtenidos por Martínez *et al.* (2009) y Cleiton & Giuliano–Caetano (2008), son insuficientes, pudiendo existir diferencias cromosómicas poblacionales y/o locales entre los individuos.

No se observaron diferencias entre los cariogramas de machos y hembras coincidiendo con los resultados de Cleiton & Giuliano–Caetano (2008), quienes no encontraron cromosomas sexuales en *T. dorbigni* ni en *T. elegans*, y con datos de Wibbels *et al.* (1994) y Humphrey *et al.* (2004), quienes indican en otra especie del mismo género (*T. scripta*) la existencia de diferenciación sexual por temperatura.

En cuanto al estudio de bandeos cromosómicos, se analizaron 24 metafases para establecer las bandas NOR y 51 metafases para las bandas C. Como en la mayoría de las muestras de reptiles, se presentaron dificultades en la obtención y observación tanto de las bandas C como de las NOR (Amavet *et al.*, 2003). El bandedo C reveló la existencia

de bandas heterocromáticas. Estas bandas se observaron regularmente en 5 pares de macrocromosomas: en el par 1 del grupo meta/submetacéntrico, las bandas se observan en los telómeros. Mientras que en el par 2 meta/submetacéntrico y los pares 7 y 8 correspondientes al grupo acrocéntrico/ telocéntrico, en uno de los cromosomas la heterocromatina se presenta en bloque, y en el cromosoma homólogo solamente con una disposición telomérica. Sin embargo en el par 9 del grupo acrocéntrico/ telocéntrico, las bandas se presentan únicamente en posición telomérica (Fig. 3).

Martínez *et al.* (2009) hallaron para *T. dorbigni* evidencia de heterocromatina centro-mérica en muchos de los macrocromosomas.

Las bandas NOR revelaron la existencia de una región organizadora nucleolar en uno de los cromosomas telocéntricos del par 13, siendo dichas marcas terminales en ambos telómeros (Fig. 4). Estos resultados no coinciden con los revelados por Cleiton & Giuliano–Caetano (2008) quienes ubican a la región organizadora nucleolar dentro de los microcromosomas, con bandas intersticiales. Además encontramos diferencias con la descripción de Martínez *et al.* (2009), quienes establecen para el organizador nucleolar una ubicación intersticial dentro de un par acrocéntrico. Esto, al igual que las diferencias en el bandeo C, puede deberse a las diferencias metodológicas ya que estos autores no realizan una descripción completa del protocolo empleado. Nuestras observaciones muestran que para *T. dorbigni*, tanto las bandas C como las NOR tienen una ubicación preferentemente terminal dentro de los macrocromosomas.

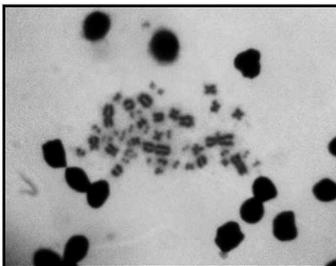


Figura 1. Metafase de *T. dorbigni* con coloración convencional de Giemsa.

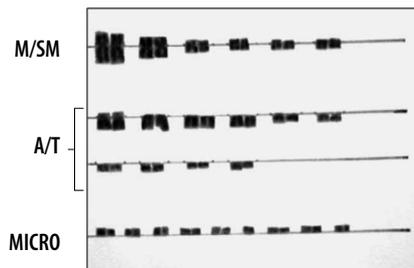


Figura 2. Cariotipo de *T. dorbigni* (M/SM:metacéntricos/submetacéntricos 6 pares; A/T: acrocéntricos/telocéntricos 10 pares; MICRO: microcromosomas 9 pares).

Par	Promedio Largo brazo q	Promedio Largo brazo p	Promedio q+p	Promedio Relación de Brazos	Promedio Índice Centromérico	Clasificación Morfológica
1	95,66	65,79	174,22	1,45	37,76	Meta/submetacéntrico
2	73,42	55,80	141,37	1,31	39,47	Meta/submetacéntrico
3	32,20	23,73	65,63	1,35	36,15	Meta/submetacéntrico
4	27,91	21,43	59,11	1,30	36,25	Meta/submetacéntrico
5	24,48	19,27	52,47	1,27	36,72	Meta/submetacéntrico
6	21,98	17,73	48,25	1,23	36,74	Meta/submetacéntrico
7	76,38	16,20	101,7	4,71	15,92	Acrocéntrico
8	55,10	17,7	78,84	3,10	22,48	Acrocéntrico
9	63,95	0	63,95	63,95	0	Telocéntrico
10	57,07	0	57,07	57,07	0	Telocéntrico
11	39,04	0	39,04	39,04	0	Telocéntrico
12	31,82	0	31,82	31,82	0	Telocéntrico
13	27,45	0	27,45	27,45	0	Telocéntrico
14	23,36	0	23,36	23,36	0	Telocéntrico
15	21,38	0	21,38	21,38	0	Telocéntrico
16	18,78	0	18,78	18,78	0	Telocéntrico

Tabla 1. Relación de Brazos e Índice Centromérico para la identificación correcta de macrocromosomas.

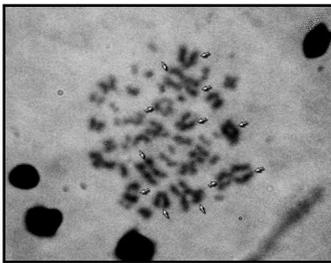


Figura 3. Metafase de *T. dorbigni* con bandeo C: las flechas indican regiones heterocromáticas en los pares 1, 2, 7, 8 y 9.

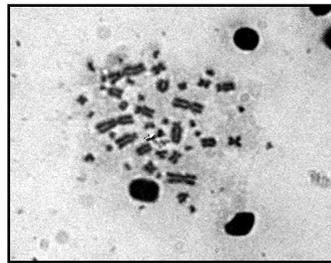


Figura 4. Bando NOR en *T. dorbigni*: la flecha indica un cromosoma marcado perteneciente al par 13.

CONCLUSIONES

Los datos que se han recabado constituyen una valiosa información acerca de las características citogenéticas de esta especie regional, perteneciente a un grupo taxonómico en permanente discusión.

Los resultados obtenidos permitieron ampliar los escasos antecedentes genéticos en esta especie mediante la caracterización del cariotipo, aportando datos al conocimiento de su biología general.

Se logró estandarizar la metodología de cultivo de sangre entera, y el ajuste de las técnicas de suspensión celular y tiempos de tinción de los cromosomas.

Se estableció el promedio de relación de brazos e índice centromérico para esta especie.

Se comprobó que los cromosomas de la especie responden a las técnicas de bandeo C y NOR. Si bien resultó dificultoso obtener las bandas diferenciales, se logró estandarizar la metodología, determinando tiempos, temperatura y concentración de los reactivos para la obtención de las mismas.

Se evidenciaron diferencias tanto en el patrón de bandas C y NOR como en la clasificación de los cromosomas, en relación con los antecedentes citogenéticos encontrados en *T. dorbigni*. Por este motivo, consideramos de suma importancia profundizar este trabajo con un muestreo amplio, que abarque toda el área de distribución para corroborar o no la existencia de diferencias poblacionales en los cariotipos. Se debería continuar este estudio con la aplicación de técnicas de bandeo más específicas, como por ejemplo, bandeos con fluorescencia, para comparar y complementar los resultados obtenidos.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras deseamos expresar nuestro agradecimiento al equipo de trabajo del "Proyecto Yacaré" (Granja Esmeralda), por su colaboración en la captura de los ejemplares.

Recibido | Received: 27 de septiembre de 2012

Aceptado | Accepted: 07 de junio de 2013

REFERENCIAS

- Amavet, P., R. Markariani & A. Fenocchio.** 2003. Comparative Cytogenetic Analysis of the South American Alligators *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Reptilia, Alligatoridae) from Argentina. *Caryologia* 4: 489–493.
- Bickham, J. W.** 1975. A cytosystematic study of turtles in the genera *Clemmys*, *Mauremys* and *Sacalia*. *Herpetologica* 31: 198–204.
- Bickham, J. W.** 1976. A meiotic analysis of 4 species of turtles. *Genetica* 46: 193–198.
- Bickham, J. W. & R. J. Baker.** 1976. Chromosome homology and evolution of emydid turtles. *Chromosoma* 54: 201–219.
- Bickham, J. W. & J. L. Carr.** 1983. Taxonomy and phylogeny of the higher categories of cryptodiran turtles based on a cladistic analysis of chromosomal data. *Copeia* 4: 918–932.
- Bickham, J. W., J. B. Iverson, J. F. Parham, M. Philippen, A. Rhodin, H. B. Shaffer, P. Spinks & P. P. Van Dijk.** 2007. An Annotated List of Modern Turtle Terminal Taxa with comments on Areas of Taxonomic Instability and Recent Change. *Chelon. Res. Monogr.* 4: 173–199.
- Cabrera, M.** 1998. Las tortugas continentales de Sudamérica Austral. *Talleres gráficos BR Copias.* Córdoba, Argentina. 108 pp.
- Cleiton, F. & L. Giuliano–Caetano.** 2008. Cytogenetic characterization of two turtle species: *Trachemys dorbigni* and *Trachemys scripta elegans*. *Caryologia* 3: 253–257.
- De La Fuente, M., J. Noriega & C. Piña.** 2002. *Trachemys dorbigni* (Dumeril y Bibron, 1835) (Cryptodira: Emydidae) en el Pleistoceno Tardío de la Provincia de Entre Ríos, Argentina. *Cuad. Herpetol.* 16: 65–72.
- Del Barco, D. M. & A. Larriera.** 1993. Sobre la validez de las subespecies de *Trachemys dorbigni* y su distribución geográfica. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. del Litoral* 22: 11–17.
- De Smet, W. H. O.** 1978. The chromosomes of 11 species of chelonian (Reptilia). *Acta Zool. Pathol. Antverp.* 70: 15–34.
- Dos Santos Guerra, M.** 1986. Reviewing the Chromosome Nomenclature of Levan *et al.* *Rev. Brasil. Genet.* 4: 741–743.
- Duméril, A. M. C. & G. Bibron.** 1835. *Erpétologie générale ou histoire naturelle complete des reptiles.* Librairie Encyclopedique de Roret, Paris. 680 pp.
- Freiberg, M. A.** 1969. Una nueva subespecie de *Pseudemys dorbignyi* (Duméril et Bibron) (Reptilia, Chelonia, Emydidae). *Physis* 28: 299–314.
- Hahn, A. T.** 2005. Análise da Dieta de *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1853) no Sul Do Rio Grande Do Sul, Brasil (Testudines; Emydidae). *Dissertação de Mestrado*, UFRGS. Porto Alegre, RS. 62 pp.
- Howell, W. M. & D. A. Black.** 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1– step method. *Experientia* 36: 1014–1015.
- Humphrey, H. C. Y., L. Di Napoli & C. Blanche.** 2004. Cellular mechanisms of sex determination in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *Mech. Dev.* 121: 1393–1401.
- Killebrew, F. C.** 1977. An extra costal scute in one specimen of *Graptemys flavimaculata* Cagle (Testudines, Emydidae). *Southwest. Nat.* 22: 400–401.
- Levan, A., K. Fredga & A. A. Sandberg.** 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220.
- Martínez, P. A., J. M. Boeris, J. Sanchez, M. C. Pastori, A. D. Bolzán & M. A. Ledesma.** 2009. Karyotypic characterization of *Trachemys dorbigni* (Testudines: Emydidae) and *Chelonoidis (Geochelone) do-*

- nosobarrosi* (Testudines: Testudinidae), two species of Cryptodiran turtles from Argentina. *Genetica* 137: 277–283.
- Moll, E. O. & J. M. Legler.** 1971. The life history of a neotropical slider turtle, *Pseudemys scripta* (Schoepff), in Panama. *Bull. Los Angeles Co. Mus. Natur. Hist. Sci.* 11: 1–102.
- Noieto, R. B., D. L. Kantek, A. C. Swarca, A. L. Dias, A. S. Fenocchio & M. M. Cestari.** 2006. Karyotypic characterization of *Hydromedusa tectifera* (Testudines, Pleurodira) from the upper Iguazu River in the Brazilian state of Paraná. *Genet. Mol. Biol.* 29: 263–266.
- Owens, D. W. & G. J. Ruiz.** 1980. New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. *Herpetologica* 36: 17–20.
- Rohilla, M. S., R. J. Rao & P. K. Tiwari.** 2006. Use of peripheral blood lymphocyte culture in the karyological analysis of Indian freshwater turtles, *Lissemys punctata* and *Geoclemys hamiltoni*. *Curr. Sci.* 90: 1130–1134.
- Rueda-Almonacid, J. V., J. L. Carr, R. A. Mittermeier, J. V. Rodríguez-Mahecha, R. V. Mast, R. C. Vogt, A. G. J. Rhodin, J. de la Ossa-Velásquez, J.N. Rueda & C. Goettsch Mittermeier.** 2007. Las Tortugas y los Cocodrilianos de los Países andinos del trópico. Serie de Guías Tropicales de Campo N° 6. Conservación Internacional. *Editorial Panamericana*. Bogotá D.C– Colombia, 538 pp.
- Seidel, M. E.** 1989. *Trachemys dorbigni*. *Cat. Amer. Amphib. Rept.* 486: 1–3.
- Seidel, M. E.** 1990. *Trachemys dorbigni* (Dumeril and Bibron) Orbiny's Slider. *Cat. Amer. Amphib. Rept.* 486: 1–3.
- Seidel, M. E.** 2002. Taxonomic Observations on extant Species and Subspecies of Slider Turtles, Genus *Trachemys*. *J. Herpetol.* 36: 285–292.
- Sumner, A. T.** 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304–306.
- Wermuth, H. & R. Mertens.** 1961. Schildkröten, Krocodyle, Bruchenechsen. G. Fischer, Jena. 422 pp.
- Wermuth, H. & R. Mertens.** 1977. Liste der rezenten Amphibien und Reptilien. Testudines, Crocodylia, Rhynchocephalia. *Das Tierreich*, Berlin, 28: 1–174.
- Wibbels, T., J. J. Bulls & D. Crews.** 1994. Temperature-dependent sex determination: a mechanistic approach. *J. Exp. Zool.* 270: 71–78.
- Williams, E. E.** 1956. *Pseudemys scripta callirostris* from Venezuela with a general survey of the scripta series. *Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard* 115: 145–160.