Juliana Costa Jordão

Estrutura populacional e história demográfica da
tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) no Atlântico
Oeste

Population structure and demographic history of
green turtle (*Chelonia mydas*) in the West Atlantic

São Paulo

2013

Juliana Costa Jordão

Estrutura populacional e história demográfica da
tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) no Atlântico
Oeste

Population structure and demographic history of
green turtle (*Chelonia mydas*) in the West Atlantic

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientador(a): Profa. Dra. Lurdes Foresti
de Almeida Toledo

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Jordão, Juliana Costa
Estrutura populacional e história
demográfica da tartaruga-verde (*Chelonia
mydas*) no Atlântico Oeste
112pp.

Dissertação (Mestrado) - Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

1. Tartaruga-verde 2. Estrutura
genética populacional 3. História
demográfica recente I. Universidade de
São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

Foto da capa: *Chelonia mydas*. Alberto Jurjo Costa.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Lurdes Foresti de Almeida Toledo
Orientador(a)

Aos meus pais, Márcia e Vanderley,
sem os quais nada seria possível.

“We are one of many appearances of the thing called Life; we are not its perfect image, for it has no perfect image except Life, and life is multitudinous and emergent in the stream of time.”

Loren Eiseley
(The Immense Journey: An Imaginative Naturalist
Explores the Mysteries of Man and Nature)

AGRADECIMENTOS

“Whatever you do, enjoy yourself”. Ouvi esta frase no começo de 2013 em Baltimore, no simpósio internacional de tartarugas marinhas. A palestra explorava as conexões entre as pessoas e o amor pelo que se faz, imprescindíveis em um campo de estudo multidisciplinar cada vez mais exigente: a conservação. Agradeço as conexões que me trouxeram até aqui, a experiência, a oportunidade de viver o novo, de novo, quantas vezes forem necessárias.

À professora Lurdes Toledo, por ter me aceitado em seu laboratório, por sua confiança em mim e por sempre me incentivar, com tanta gentileza. Muito obrigada! Aos amigos que fiz no laboratório de peixes, onde aprendi tanta coisa: Mari, Rivi, Anita, Ricardo, Rodrigo, Carlos, Fê, Carol; foi um prazer ter convivido com vocês, cada um à sua maneira. Mari, fazer PCRs em sua companhia significava uma tarde de boa conversa. Rivi, impossível ficar séria ao seu lado! Obrigada pelas sugestões que oferecia com tanto bom humor. Fê, sou muito grata à confiança e grande ajuda nos meus primeiros passos na pós-graduação. Seus ensinamentos foram fundamentais neste processo. Rodrigo e suas aventuras no laboratório, sempre motivo de muitas risadas! Carlos, obrigada pela ajuda em todos os momentos, nas coletas, no dia-a-dia, por ter sempre um sorriso no rosto e por torcer sinceramente por cada um de nós. Não é à toa que gostamos tanto de você! Carol, obrigada pela amizade, passeios, as coletas de que pude participar, almoços, cervejinhas, nossas longas conversas no laboratório. É muito bom saber que nossa amizade ultrapassou os limites do laboratório.

Aos amigos que fiz no departamento de genética: Ju, Rê, Lê, Lili, Danilo e Adam; obrigada pelo apoio no exame de ingresso, disciplinas, qualificação, projetos e conversas. Esta dissertação tem um pouquinho de vocês em suas páginas.

À Ana Cris Bondioli, que também aceitou o desafio de me orientar, sabendo que eu não tinha experiência prévia com genética nem com animais marinhos, mas que acreditou em mim. E acreditou tanto que com sua ajuda ampliei minhas perspectivas profissionais e pessoais; não tenho palavras para agradecer nossas conversas sobre biologia, viagens, culinária, arte, música, planos futuros, o seu cuidado e amizade! Além disso, ganhei mais duas companhias, Jeff Collacico e Juju, e vocês se tornaram minha segunda família em São Paulo.

Ao Benoit de Thoisy, pela orientação e por ter me recebido tão bem na Guiana Francesa. Lá eu tive a oportunidade de trabalhar dentro do Instituto Pasteur, viajar por praticamente toda a costa do país, conhecer a floresta amazônica, cruzar rios, presenciar a desova da tartaruga-verde de madrugada, dormir em uma tribo indígena, receber um jantar incrível de despedida, arriscar no francês e vivenciar uma cultura tão diferente e rica. Que sorte a minha! À Katia Slama, por sua amizade, pelos nossos almoços aos domingos, vinhos, trilhas, praias, músicas, conversas; sua companhia fez minha estadia tão agradável!

À Eugenia Naro-Maciél, por ter me indicado para a experiência na Guiana Francesa; também à Gisele Lobo Hajdu, por ter me recebido na UERJ e trazido tranquilidade quando meu projeto enfrentava dificuldades.

À Dani Torres, Leandro Gomes, Fernanda Rangel, Rodrigo Bramili, Jorge, Ivan, Angélica e toda a equipe do TAMAR Bacia de Campos (RJ), pela hospitalidade, incentivo e apoio nas coletas de campo. A participação de vocês foi essencial para o projeto. Obrigada por dividirem comigo suas histórias, pelos churrascos que fizemos, pelo nascimento de filhotes que presenciei, pela amizade e as surpresas boas que o Rio sempre proporciona.

Aos meus eternos mestres em Alfenas, Tio Vini, Flavio e Érica, o incentivo e apoio que recebi de vocês se fazem muito presentes em mim, mesmo à distância. Sinto tantas saudades!

Ao Alejandro Fallabrino, Luciana Alonso, Gustavo Martinez, Noel Caraccio, Jose Paola, Vicki Borrat, Naty Terida, Mauro Russomagno, Bruno Techera, Carlitos, toda a equipe de voluntários do Karumbé na temporada de 2011, e em especial à Flavia Brito: aprendi sobre monitoramento, necropsia, reabilitação, educação ambiental. Vivi de maneira intensa ensinamentos sobre o mar, tartarugas marinhas, nossa rica cultura latino-americana e experiência de vida. Vocês me ensinaram a ir sempre de coração aberto, qualquer que fosse o caminho.

À Alê Villas Boas, por ter me mostrado outros caminhos, quando eu mais precisei; à Maíra Concistré, com quem sempre tive longas conversas a respeito da vida acadêmica e perspectivas futuras; ao Max Maronna, pela amizade, conversas e conhecimento compartilhado; à Camila Clozato, pelo apoio e por sempre transmitir tranquilidade. Também à Sofia Marques e Nádia Moraes-Barros. Obrigada por me mostrarem pontos de vista diferentes para que eu pudesse refletir.

Ao Alberto Jurjo, que cedeu a foto da capa; sua disposição em começar de novo, viajar ao redor do mundo e buscar a sua felicidade me inspiram. Ao Daniel Duracell e a sua história de vida: felicidade, mais que um objetivo, é um caminho.

À Bio 2006/1, minha turma da faculdade que tive o prazer de conviver e guardar muitas histórias. À Su, por ter acompanhado de muito perto todos os meus passos em São Paulo com tanto carinho.

Caio, Dea, Má e Mel, obrigada pelos anos de amizade e pelo que representam em minha vida; a experiência não seria a mesma se não tivesse trazido comigo o olhar de vocês. Estar com vocês é viver um estado de admiração permanente, aconchego, sorrisos e muito amor.

À Nathalia, Cinthia, Glaucia, Ana Karla e Sabrina, que souberam respeitar as minhas (muitas) ausências. Aos meus pais, as pessoas que mais torcem por mim. À minha irmã Bia, que cansou de revisar meus textos em inglês. A compreensão e apoio de vocês às minhas escolhas tornam esta caminhada mais leve.

Ao auxílio financeiro da CAPES, FAPESP e CNPq.

Enfim, quero agradecer a todas as pessoas e instituições que, com suas histórias tão diferentes contribuíram para que eu pudesse construir uma parte da minha, nesses encontros entremeados de gratidão.

ÍNDICE

Introdução Geral.....	01
Objetivos.....	23
Capítulo 1. Estrutura populacional de <i>Chelonia mydas</i> em áreas de alimentação e desova no Oceano Atlântico, com base em sequências de mtDNA.....	24
Capítulo 2. Diversidade, estrutura e história demográfica de <i>Chelonia mydas</i> no oeste do Oceano Atlântico, com base em marcadores microsatélites	59
Discussão Geral e Conclusões.....	75
Resumo.....	80
Abstract	81
Referências Bibliográficas	82

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 TARTARUGAS MARINHAS

As tartarugas marinhas, terrestres e de água doce (Ordem Chelonia) compõem um dos clados mais fáceis de serem reconhecidos entre os répteis (Shaffer 2009), dado que nenhum outro tetrapoda possui uma carapaça óssea que envolva as cinturas pélvica e escapular como esses animais (Pritchard 1997, Zug *et al.* 2001, Guillon *et al.* 2012).

Os fósseis mais antigos da ordem incluem os do gênero *Odontochelys*, datados em 220 milhões de anos, e cujos depósitos em que foram encontrados indicam que esses animais habitavam áreas marginais dos deltas de um mar ou de rio (Li *et al.* 2008); e também os do gênero *Proganochelys*, de cerca de 210 milhões de anos (Gaffney 1990). Recentemente, entretanto, o fóssil *Eunotosaurus africanus*, datado de cerca de 260 milhões de anos, foi considerado um representante mais basal das tartarugas (Lyson *et al.* 2010), e a morfologia intermediária entre a carapaça deste e a morfologia de outros vertebrados pode ser um auxílio para o entendimento da evolução do quelônios (Lyson *et al.* 2013).

Os quelônios apresentam um mecanismo único de fechamento da mandíbula, onde o tendão adutor passa sob a tróclea (Gaffney 1975). Atualmente, a ordem divide-se em duas subordens, Pleurodira e Cryptodira, caracterizadas principalmente pelo mecanismo de retração do pescoço: Pleurodira, a retração é lateral; e Cryptodira, a cabeça se encaixa entre os ombros em uma forma de S (Zug *et al.* 2001, Shaffer 2009).

As tartarugas marinhas são um grupo monofilético da subordem Cryptodira (Meylan & Meylan 1999, Zug *et al.* 2001), e são distintas dos outros quelônios por apresentarem características morfológicas adaptadas à vida marinha. Todas as espécies compartilham particularidades como a nadadeira em formato de remo, em que todos os ossos distais são perdidos, e três ou quatro dígitos da nadadeira anterior são acentuadamente alongados (Pritchard 1997, Meylan & Meylan 1999, Wyneken 2003). As glândulas lacrimais são ampliadas e modificadas para remover o excesso de sais dos fluidos corporais provenientes da ingestão de água do mar

(Meylan & Meylan 1999). Os membros da radiação das tartarugas marinhas datam de 110 milhões de anos ao início do Cretáceo (Hirayama 1998, Zug *et al.* 2001). A diversificação dos quelônios é considerada um dos eventos mais importantes na história evolutiva dos répteis marinhos (Hirayama 1998). A carapaça é formada por uma quantidade reduzida de ossos das vértebras e costelas modificados, que são revestidos externamente por placas de queratina (Zug *et al.* 2001, Wyneken 2003). As espécies são identificadas a partir da coloração do corpo, da forma das mandíbulas, da posição e número dos escudos pré-frontais e da carapaça (Pritchard & Mortimer 1999, Wyneken 2003).

As tartarugas marinhas atuais possuem distribuição global e são classificadas em duas famílias, Cheloniidae e Dermochelyidae (Pritchard 1997, Naro-Maciel *et al.* 2008), em um total de sete espécies: *Dermochelys coriacea* (tartaruga-de-couro), *Lepidochelys olivacea* (tartaruga-oliva), *Lepidochelys kempii* (tartaruga-de-Kemp), *Caretta caretta* (tartaruga-cabeçuda), *Eretmochelys imbricata* (tartaruga-de-pente), *Natator depressus* (tartaruga-flatback) e *Chelonia mydas* (tartaruga-verde) (Bowen & Avise 1996, Meylan & Meylan 1999). *Chelonia agassizii*, também conhecida como tartaruga-negra, ainda é uma questão controversa na classificação de tartarugas marinhas. *C. agassizii* é identificada por um melanismo acentuado e tamanho menor em relação à *C. mydas* (Karl & Bowen 1999), está confinada a leste do Oceano Pacífico, ao contrário da tartaruga-verde, que está distribuída globalmente em águas tropicais (Bowen *et al.* 1993a). Alguns autores defendem a sua classificação como uma espécie válida, mas análises genéticas do citocromo b sugerem que a tartaruga-negra pode ser uma forma melânica da verde, separada apenas a nível populacional (Bowen *et al.* 1993a, Pritchard 1997, Karl & Bowen 1999, Avise 2007).

Estudos filogenéticos corroboram a posição basal da família Dermochelyidae em relação à Cheloniidae, e a divisão desta última família em duas tribos; Carettini, constituída por *C. caretta*, *L. olivacea*, *L. kempii* e *E. imbricata*; e Chelonini, composta por *C. mydas* e *N. depressus* (Bowen *et al.* 1993a, Bowen & Karl 1997, Naro-Maciel *et al.* 2008).

As espécies *D. coriacea*, *E. imbricata* e *L. kempii* são consideradas criticamente ameaçadas de extinção; *C. caretta* e *C. mydas* estão ameaçadas; *L.*

olivacea está vulnerável e *N. depressus* ainda carece de informações sobre seu status de conservação, segundo critérios utilizados pela IUCN - União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (do inglês, *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*) (Meylan & Meylan 1999, IUCN 2012). As tartarugas marinhas possuem um longo período de vida geralmente associado a uma baixa taxa de substituição de indivíduos na população, habitats reprodutivos restritos, e estão sujeitas a ameaças, tais como coleta ilegal, captura incidental na pesca comercial e destruição do seu habitat (Bolker *et al.* 2003).

1.2 CICLO DE VIDA

As tartarugas marinhas são animais de vida longa, maturidade tardia e realizam séries contínuas de migrações em seu ciclo de vida (Miller 1997, Dow *et al.* 2007). São criaturas que passam suas vidas em habitats marinho ou estuarino, e sua única ligação com o habitat terrestre é durante a desova (Musick & Limpus 1997).

Quando esses animais atingem a fase reprodutiva, copulam em alto mar e as fêmeas retornam aos locais onde nasceram para colocarem seus ovos, comportamento conhecido como filopatria (Carr & Ogren 1960, Carr *et al.* 1978). Os acasalamentos ocorrem aproximadamente a cada dois anos em águas rasas e as fêmeas depositam em média 110-130 ovos em cada estação reprodutiva (Ripple 1996, Pritchard & Mortimer 1999). O comportamento, morfologia, fisiologia ou a dieta podem contribuir para as variações do período reprodutivo (Broderick *et al.* 2003). Os principais locais reprodutivos possuem características favoráveis para a postura de ovos e o desenvolvimento dos filhotes, como acessibilidade para o mar, altitude suficiente e substrato adequado (Hendrickson 1982, Mortimer 1982). Entretanto, muitos aspectos da história de vida destas espécies ainda são pouco conhecidos. Estudos comportamentais e ecológicos são difíceis devido à sua natureza migratória e porque apenas as fêmeas reprodutoras são acessíveis quando em terra firme (Miller 1997).

A nidificação das tartarugas marinhas geralmente segue um padrão sazonal, e o seu início se dá de maneira abrupta, quando as fêmeas esperam o anoitecer para fazer a postura dos ovos (Carr & Ogren 1960). Ao emergir do mar, a fêmea seleciona o local para o ninho, livre da ação da maré, limpa a superfície com suas nadadeiras e então começa a escavar a areia para depositar seus ovos em uma profundidade que mantenha a temperatura e umidade necessárias durante todo o período de incubação (Carr & Ogren 1960, Miller 1997, Alvarado & Murphy 1999).

As tartarugas marinhas não apresentam cuidado parental (Broderick *et al.* 2003) e após a oviposição, a fêmea cobre o ninho para protegê-lo de predadores e retorna ao mar (Alvarado & Murphy 1999). A determinação do sexo é dependente da temperatura (*Temperature-dependent sex determination* – TSD), com temperatura pivotal – temperatura constante de incubação que produz 50% de cada sexo – entre 29°C e 30°C (Mrosovsky 1994, Mrosovsky *et al.* 2002). O padrão geral apresentado em tartarugas marinhas é de que temperaturas de incubação mais baixas resultam em machos, e as maiores, em fêmeas (Wibbels 1999, Godley *et al.* 2002, Wibbels 2003).

Os ovos possuem cascas moles e flexíveis, e o nascimento ocorre após cerca de 6 e 13 semanas de incubação (Miller 1997). O estudo conduzido por Carr e Ogren em 1960 sugere que após o período de incubação, a eclosão simultânea dos ovos é uma atividade em que o esforço do grupo é estimulado pela camada inferior de tartarugas quando o peso dos ovos da camada acima começa a incomodá-los. A emergência dos filhotes pode ser difícil, pois às vezes a areia sobre os ovos pode estar compactada (Lohmann *et al.* 1997). Assim que os ovos eclodem, os filhotes se orientam em direção ao mar, correndo principalmente para a zona de arrebentação (Bowen & Karl 2007, Bowen *et al.* 2007). A orientação parece ser através de diferenças na umidade do substrato e a diferenças de luminosidade sobre terra e mar (Carr & Ogren 1960, Carr *et al.* 1978). Esta etapa, em que os filhotes correm em direção ao mar, é conhecida como “anos perdidos” (do inglês *lost years*), pois não há muitas informações sobre este período; acredita-se que os filhotes permaneçam na zona pelágica, transportados por correntes oceânicas (Carr & Ogren 1960, Carr *et al.* 1978, Carr 1987, Bass *et al.* 2006).

A desova é restrita a certos locais utilizados (atual ou historicamente) pelas fêmeas, as áreas são localizadas junto a grandes correntes oceânicas que podem manter juvenis em segurança para crescer e ter mobilidade para nadar ativamente para habitats de desenvolvimento (Musick & Limpus 1997). Os juvenis apresentam uma dieta onívora, com forte tendência à carnivoría (Bjorndal 1985).

Fig. 1: Ciclo de vida generalizado de tartarugas marinhas. Modificado de Miller (1997).

As áreas de alimentação dos adultos podem ser fixas no espaço, tais como bancos de algas marinhas, ou transitórias, como quando estão relacionadas a um aumento populacional de águas-vivas e invertebrados bentônicos (Meylan & Meylan 1999). As tartarugas adultas passam a maior parte de suas vidas em áreas de forrageio, que normalmente estão separadas geograficamente da área de desova (Meylan & Meylan 1999, Bowen & Karl 2007). Os adultos migram para

áreas de alimentação até atingirem a maturidade reprodutiva, que pode variar entre 30 e 50 anos, e então iniciam as migrações entre áreas de alimentação e desova, reiniciando o ciclo (fig. 1) Miller (1997).

1.3 TARTARUGA-VERDE

A tartaruga-verde foi descrita primeiramente em 1758 por Linnaeus como *Testudo mydas*, e seu nome científico atual, *Chelonia mydas*, foi cunhado por Schweigger em 1812 (Fritz & Havas 2006, Rhodin *et al.* 2010). *C. mydas* é uma tartaruga marinha da família Cheloniidae com distribuição tropical e subtropical (fig. 2) (Bowen *et al.* 1992, Pritchard 1997, Pritchard & Mortimer 1999, Formia *et al.* 2006).

Fig. 2: Mapa de distribuição da família Cheloniidae, na qual a tartaruga-verde está inserida. Retirado de Vitt & Caldwell (2009).

A tartaruga-verde distingue-se das outras espécies de tartarugas marinhas por apresentar uma carapaça ovalada com um par de escudos pré-frontais, quatro pares de escudos pós-orbitais, quatro pares de escudos laterais e cinco escudos centrais (fig. 3) (Pritchard & Mortimer 1999). A sua cabeça é relativamente pequena, terminando em um bico ligeiramente serrilhado e as nadadeiras são longas, apresentando uma unha em suas extremidades (Pritchard & Mortimer 1999). Os filhotes nascem com cerca de 25g e uma coloração negra na carapaça

(Hendrickson 1980, Miller 1997), e quando adultos, a carapaça apresenta coloração castanha esverdeada ou acinzentada, medindo cerca de 1,20m de comprimento e pesando em média 250 kg (fig. 4) (Pritchard & Mortimer 1999).

A alimentação é predominantemente onívora enquanto são filhotes, e após este período, alimentam-se preferencialmente de algas, ocasionalmente formando grupos de alimentação em águas costeiras (Ernst *et al.* 1994). Quando a tartaruga-verde altera sua dieta para herbívora, estes animais passam a ocupar um nicho único entre as tartarugas marinhas (Bjorndal 1997).

Fig. 3: Localização de alguns caracteres diagnósticos de *Chelonia mydas*. Retirado e modificado de Pritchard & Mortimer (1999).

Relações filogenéticas entre sequências de DNA mitocondriais (mtDNAs) de colônias de tartaruga-verde distribuídas globalmente indicam uma bifurcação histórica dos complexos de *C. mydas* entre os oceanos Pacífico e Índico e oceano Atlântico e mar Mediterrâneo (Bowen *et al.* 1992, Naro-Maciel *et al.* 2008). Estimativas de divergência sugerem que esta seja de aproximadamente sete milhões de anos atrás, antecipando outros eventos vicariantes conhecidos por dividir taxa marinhos, como o istmo do Panamá (Naro-Maciel *et al.* 2008).

A tartaruga-verde é classificada como “Ameaçada de Extinção” (*Endangered* – *EN*) de acordo com os critérios da IUCN (IUCN 2012). A causa principal do declínio populacional da espécie é a sua vulnerabilidade aos impactos antrópicos durante todos os estágios de sua vida (Seminoff 2004). A pesca incidental, na qual as tartarugas ficam presas às redes de pesca, resultando em morte por afogamento, é considerada uma de suas principais ameaças, além da poluição marinha (Marcovaldi *et al.* 1999, Oravetz 1999, Seminoff 2004, Lewison *et al.* 2004, Donlan *et al.* 2010, Casale 2011).

Fig. 4: Fêmea adulta de *Chelonia mydas* desovando na costa da Guiana Francesa. Foto: Sébastien Barrioz.

1.4 A GENÉTICA E O ESTUDO DE TARTARUGAS MARINHAS, COM ÊNFASE EM TARTARUGAS-VERDES

Estudos ecológicos que avaliam a migração de organismos marinhos podem fornecer informações valiosas, mas geralmente são logisticamente difíceis: o habitat marinho cobre cerca de 70% da superfície terrestre, sendo um obstáculo para a observação e captura destas espécies (Waples 1998). As tartarugas marinhas são animais de grande interesse na genética da conservação devido ao

seu declínio populacional e história de vida complexa (Bowen *et al.* 1992, Bolker *et al.* 2003, Roden *et al.* 2009); são altamente migratórios, e frequentemente cruzam fronteiras internacionais durante seus ciclos de vidas (Frazier 1999, Blumenthal *et al.* 2009). Por estas razões, há um crescente interesse no uso de dados moleculares para fornecer informações relacionadas à ecologia, comportamento e evolução destes répteis marinhos (Bowen & Karl 1997, Waples 1998, Naro-Maciel *et al.* 2007, Alacs *et al.* 2007, Lee 2008).

A maioria dos estudos genéticos realizados com tartarugas marinhas utiliza como marcador molecular, sequências da região de controle do DNA mitocondrial (mtDNA) (Lahanas *et al.* 1994, Bass *et al.* 1996, Encalada *et al.* 1996, Bass & Witzell 2000, Bjorndal *et al.* 2005, Bass *et al.* 2006, Bjorndal *et al.* 2006, Formia *et al.* 2006, Bolker *et al.* 2007, Naro-Maciel *et al.* 2007, Frankham *et al.* 2009, Proietti *et al.* 2009, Monzón-Arguello *et al.* 2010, Ruíz-Urquíola *et al.* 2010, Naro-Maciel *et al.* 2012, Proietti *et al.* 2012, Prosdocimi *et al.* 2012).

A molécula de DNA mitocondrial é haploide, citoplasmática e transmitida maternalmente, e um dos atributos que a faz ser extensivamente utilizada para estudos microevolutivos é a sua rápida taxa de evolução (Avise 2009). Os genótipos de mtDNA são chamados de haplótipos, que diferem uns dos outros por mutações particulares acumuladas, e estas sequências podem ser usadas para estimar histórias matrilineares de indivíduos e populações (Avise 2007, Avise 2009). O DNA mitocondrial em vertebrados é normalmente representado por 37 genes ligados em uma molécula circular de cerca de 20 kb de comprimento; 2 genes codificam para RNAs ribossômicos, 22 para diferentes proteínas de RNA transportador, e 13 codificam subunidades de proteínas que colaboram com polipeptídeos nucleares na respiração celular (Avise 2009).

A região controle do mtDNA (D-loop) é o local de origem para a replicação da molécula de mtDNA (Bowen & Karl 1997), e mudanças nas bases nucleotídicas nesta região são mais rápidas que nos genes de rRNA e tRNA (Avise 2007), tornando o fragmento interessante para análises populacionais. Entretanto, a região controle em tartarugas marinhas apresenta baixa diversidade genética, e sugere-se que este padrão seja devido à baixa taxa metabólica e ao longo tempo de geração nestes animais (Avise *et al.* 1992, Karl *et al.* 1992).

Dois aspectos são normalmente abordados com relação à variabilidade intraespecífica de mtDNA: a extensão da divergência filogenética entre haplótipos e a distribuição geográfica dos agrupamentos ou clados filogenéticos de mtDNA (Avice 2007). Para contribuir com o estudo genético de tartarugas marinhas, uma nomenclatura padronizada para haplótipos de DNA mitocondrial é mantida pelo *Archie Carr Center for Sea Turtle Research* (disponível em <http://accstr.ufl.edu/resources/mtdna-sequences/>), o que permite que dados de diferentes estudos possam ser compilados e utilizados em análises em busca de um padrão global (Lee 2008).

Outro marcador molecular bastante utilizado para estudos populacionais são os microssatélites ou SSRs (do inglês *Simple Sequence Repeats*), que se constituem de sequências curtas de DNA, repetidas em tandem, geralmente com menos de 5 pb de tamanho, tais como (TG)_n ou (AAT)_n (Bruford & Wayne 1993, Li *et al.* 2002, Selkoe & Toonen 2006, Frankham *et al.* 2009, Grover *et al.* 2012).

Devido à sua abundância no genoma nuclear e altos níveis de polimorfismo, os microssatélites podem ser empregados em diversos estudos, como no uso em espécies que apresentam baixos níveis de variação em marcadores mitocondriais, populações que se recuperam de um evento de *bottleneck*, para inferir taxas de migração; devido às maiores taxas de mutação, permitem também estudos em escalas geográficas e temporais menores, quando comparados com outros marcadores (Wright & Bentzen 1994, Selkoe & Toonen 2006, Frankham *et al.* 2009, Kelkar *et al.* 2010).

A maioria dos microssatélites é considerada neutra, entretanto, estudos sugerem algumas funções para essas sequências repetitivas, como regulação da atividade gênica, de processos metabólicos e organização da cromatina (Li *et al.* 2002). Os polimorfismos dos microssatélites derivam principalmente da variabilidade no comprimento (Ellegren 2004), esses ganham e perdem unidades repetitivas devido ao *replication slippage*, um mecanismo de mutação que é específico para sequências repetidas em tandem, no qual há um alinhamento incorreto das duas cadeias complementares do DNA, levando ao ganho ou perda de unidades de repetição (Ellegren 2004, Schlötterer 2004).

Os marcadores microssatélites em tartarugas marinhas são usados em escala menor quando comparados com mtDNA (Fitzsimmons *et al.* 1997, Roberts *et al.* 2004, Bowen *et al.* 2005, Lee *et al.* 2007, Naro-Maciel *et al.* 2007), em parte devido aos custos de desenvolvimento destes marcadores (Selkoe & Toonen 2006). Apesar disso, é uma prática muito comum utilizar microssatélites desenvolvidos em outras espécies, já que os *loci* tendem a ser conservados para estas espécies (Fitzsimmons *et al.* 1995, Lee 2008).

Apesar de diferenças intrínsecas ao modo de herança, o uso de marcadores com diferentes taxas de mutação facilita a estimativa da importância relativa de fatores contemporâneos vs. históricos em níveis populacionais de diversidade genética (Alacs *et al.* 2007). Além disso, fornece um conhecimento mais amplo da estrutura populacional, demonstrando que muitas vezes, não só populações diferenciadas geneticamente merecem proteção, mas também aquelas em que há fluxo gênico (Carreras *et al.* 2007).

1.4.1 MIGRAÇÕES E ESTRUTURA POPULACIONAL EM ÁREAS DE DESOVA

Ao iniciar seus estudos de captura e marcação de indivíduos na Costa Rica em 1955, Carr pretendia observar se a tartaruga-verde era um animal migratório capaz de transpor longas distâncias. Suas observações demonstraram que sim, e também que as fêmeas marcadas voltavam periodicamente ao local em que nasceram para desovar novamente, em um comportamento conhecido como *natal homing* ou filopatria (Carr 1967, Carr *et al.* 1978). Em sua publicação de 1958, Hendrickson propôs uma hipótese alternativa àquela proposta por Carr, a de facilitação social, na qual fêmeas iniciantes seguiriam as fêmeas experientes das áreas de alimentação para as áreas de desova, e usariam esse local escolhido nos anos subsequentes. Devido à sua herança materna, haplótipos mitocondriais são muito úteis para determinar a estrutura populacional de espécies filopátricas, como as tartarugas marinhas (Bowen & Karl 1996, Fitzsimmons *et al.* 1999, Bjorndal *et al.* 2006).

Em 1992, Bowen *et al.* testaram a hipótese de filopatria por meio de ferramentas genéticas. Dados preliminares de captura e marcação (Carr 1975,

A capacidade de distinguir as colônias de tartarugas baseada em haplótipos de mtDNA permitiu esclarecer padrões de dispersão dos filhotes das praias de nidificação e os padrões de movimentação dos juvenis nas áreas de desenvolvimento (Bjorndal *et al.* 2006). Atualmente, está bem estabelecido que as tartarugas marinhas apresentam comportamento filopátrico (Lee *et al.* 2007).

Determinar a estrutura populacional destes répteis marinhos pode ser desafiador, dada sua habilidade de se dispersar em largas escalas (Shamblin *et al.* 2012). Em um estudo conduzido em três áreas de desova de *C. mydas* no litoral brasileiro (Ilha Trindade, Fernando de Noronha e Atol das Rocas), Bjorndal *et al.* (2006) observaram uma baixa estrutura populacional (de acordo com mtDNA) entre as duas áreas mais próximas (Atol das Rocas e Fernando de Noronha, com 125 km de distância), enquanto havia uma estrutura considerável a distâncias de 1800 km. De maneira geral, é mais difícil observar diferenciação genética significativa em colônias de *C. mydas* mais próximas geograficamente (Dethmers *et al.* 2006).

As tartarugas-verdes são normalmente subdivididas em colônias distintas geográfica e geneticamente (Formia *et al.* 2006). A partir de análises dos haplótipos encontrados em *Chelonia mydas*, Encalada *et al.* (1996) reuniram as colônias em dois grandes grupos no Atlântico e Mediterrâneo: um grupo representado pelas populações do Caribe Ocidental e uma única colônia do mar Mediterrâneo; o outro grupo é representado pelo Caribe Oriental, Atlântico sul e colônias do oeste Africano. Entretanto, em um estudo conduzido por Bourjea *et al.* (2007) com tartarugas-verdes do Oceano Índico, os autores registraram pela primeira vez a presença de haplótipos provenientes do Atlântico em colônias do Indo-Pacífico. O estudo sugere que houve fluxo gênico entre as bases oceânicas através do Cabo da Boa Esperança, África do Sul, conhecido por dividir taxa marinhos, devido à temperatura baixa que prevalece em suas águas.

A capacidade de colonizar locais muito distantes de sua origem, aliada às baixas taxas de evolução do mtDNA quando comparado com outros vertebrados levou a um compartilhamento de haplótipos (baseados em sequências entre 390 e 450 pb da região controle) entre colônias (Awise *et al.* 1992, Bowen *et al.* 1993b, Shamblin *et al.* 2012). Para aumentar a resolução destes marcadores,

pesquisadores estão utilizando primers que amplificam sequências maiores da região controle, de cerca de 800 pb (Abreu-Grobois *et al.* 2006). Vargas *et al.* (2008) publicaram um estudo com *Dermochelys coriacea* utilizando sequências maiores da região controle do mtDNA, e observaram que estas sequências aumentaram a resolução das análises, ao subdividir um haplótipo bastante comum na espécie em 3 distintos. De maneira semelhante, recentemente Shamblin *et al.* (2012) amostraram três colônias de *C. mydas* no sudeste da região do Caribe, que não eram distintas geneticamente com haplótipos de 490 pb; estas passaram a ser diferenciadas quando utilizado o genoma total da mitocôndria, sugerindo que o sequenciamento mitogenômico pode melhorar as inferências de estrutura populacional para estes animais migratórios.

Em busca de uma estrutura genética mais precisa, pesquisadores utilizam também marcadores moleculares nucleares, como os microssatélites, adicionando informações de ambos os genitores (Bowen & Karl 2007). Em 1992, Karl *et al.* publicaram o primeiro trabalho utilizando marcadores nucleares para inferir a estrutura populacional de tartarugas-verdes e o fluxo gênico mediado por machos. Ao contrário do padrão de alta estruturação populacional quando utilizado marcadores mitocondriais, o estudo revelou um fluxo gênico moderado entre colônias, indicando uma relação positiva entre proximidade geográfica e semelhança genética, provavelmente devido a cruzamentos em áreas de sobreposição geográfica ou corredores migratórios. Anos mais tarde, Roberts *et al.* (2004) publicaram um estudo global de estrutura populacional e fluxo gênico mediado por machos em *C. mydas*, utilizando como marcador molecular os microssatélites. Como o estudo anterior, os resultados indicaram uma baixa estruturação entre colônias, indicando existir fluxo gênico entre esses locais, padrão encontrado também por Fitzsimmons *et al.* (1997) e Bowen *et al.* (2005). Roberts *et al.* (2004) observaram uma relação genética próxima entre populações do leste do Atlântico e Indo-Pacífico, como também observado posteriormente por Bourjea *et al.* (2007), com marcadores mitocondriais.

A discrepância entre os resultados apresentados por marcadores mitocondriais e nucleares pode ter outras explicações além do fluxo gênico desviado pelo sexo (Lee 2008). O modo de herança de cada tipo de molécula

(maternal ou biparental) e a estatística utilizada para inferir diferenciação genética – a mais comum, estatística F (F_{st}) (Wright 1951, Lee 2008) também podem estar relacionados a estes resultados distintos.

1.4.2 ORIGEM E COMPOSIÇÃO DE INDIVÍDUOS EM ÁREAS DE ALIMENTAÇÃO

Muitas áreas de desova já foram identificadas, mas as áreas de alimentação e desenvolvimento, locais onde as tartarugas passam a maior parte de suas vidas, são ainda pouco conhecidas ou estudadas (Bowen & Karl 2007). As áreas de alimentação são conhecidas como estoques mistos, por serem compostas por tartarugas de diversas colônias de origem (Bowen & Karl 2007) e elucidar as ligações entre os grupos é importante para a proteção e entendimento da biologia populacional (Bowen & Karl 2007, Naro-Maciel *et al.* 2007, Bjorndal & Bolten 2008), assim como para planos de manejo regionais (Bolker *et al.* 2003, Hamann *et al.* 2010).

A presença de mudanças significativas na frequência de haplótipos entre populações nidificantes, assim como a presença de haplótipos endêmicos possibilitam a distinção entre os estoques genéticos de tartarugas marinhas e a identificação do local de origem destas, quando encontradas em áreas de alimentação (Bass 1999, Bjorndal *et al.* 2006, Bowen & Karl 2007).

Análises de Estoque Misto (MSA, do inglês *Mixed Stock Analysis*) são realizadas para quantificar a contribuição das áreas de desova para cada área de alimentação (Okuyama & Bolker 2005, Lee 2008). Estas análises foram conduzidas pela primeira vez na década de 1970, para estudo de populações reprodutoras de salmão (ribeirinhas) e sua contribuição para as populações que se alimentavam na costa (Grant *et al.* 1980). Este método mostrou-se adequado para estudos de vertebrados migratórios, como baleias (Baker *et al.* 2000, Lukoschek *et al.* 2009) e tartarugas marinhas (Bolker *et al.* 2003, Okuyama & Bolker 2005).

Um dos primeiros estudos a utilizar MSA em áreas de alimentação de tartarugas marinhas foi conduzido por Bolten *et al.* (1998), em que os autores analisaram tartarugas-cabeçudas juvenis usando a mesma região controle do

mtDNA dos estudos anteriores em colônias reprodutoras. As análises demonstraram que 92% dos haplótipos encontrados em áreas de alimentação no leste do Oceano Atlântico estavam presentes em áreas de desova a oeste do oceano.

O primeiro estudo com análises de estoque misto em juvenis de *Chelonia mydas* foi publicado em 1998, em que Lahanas *et al.* determinaram as contribuições relativas de várias colônias no Caribe para uma população que alimentava-se nas Bahamas. Após observar a evidência de origens múltiplas para essa população forrageadora, os autores testaram a importância de dois possíveis fatores que poderiam determinar a composição destes locais: o tamanho das colônias e a distância entre os locais de alimentação e reprodução. Seus resultados indicaram que o tamanho populacional era o principal fator para a determinação da composição genética nos agregados alimentares. Outros autores, entretanto, encontraram resultados diferentes ao testar quais fatores poderiam ser determinantes para a formação e composição de indivíduos em áreas de alimentação (Bass & Witzell 2000, Luke *et al.* 2004, Bass *et al.* 2006, Naro-Maciel *et al.* 2007). Dois anos após o primeiro trabalho ser publicado, Bass & Witzell (2000) amostraram juvenis de *C. mydas* em áreas de alimentação na Flórida, EUA, e observaram uma correlação positiva entre composição genética e proximidade com sítios de nidificação. Luke *et al.* (2004), por sua vez, foram os primeiros a relacionar as correntes oceânicas como potenciais contribuidoras para as migrações em determinadas áreas de alimentação.

Atualmente, acredita-se que os fatores mencionados – tamanho das colônias, distância geográfica e corrente marinha, além de outros fatores ecológicos e geográficos ainda desconhecidos – atuem de maneira sinérgica para a composição das áreas de forrageio, e autores defendem uma análise integrada de dados genéticos, marcação e recaptura e modelagem oceanográfica para uma melhor compreensão dos dados (Bass *et al.* 2006, Naro-Maciel *et al.* 2007). A incorporação da realidade biológica é importante para o entendimento da história de vida desses animais.

Outro estudo destacou a importância de se considerar variações temporais observadas na composição genética de uma área de alimentação (Bjorndal &

Bolten 2008). Os autores encontraram diferenças temporais significativas nas frequências haplotípicas durante os 10 anos de amostragem em agregados alimentares nas Bahamas, e essa discrepância pode estar relacionada com recrutamento diferencial entre os anos, decorrente dos ciclos reprodutivos.

As análises de estoque misto são muito importantes para avaliar a origem das tartarugas marinhas que ocorrem em áreas de alimentação, entretanto, existem algumas limitações, como a capacidade de se obter todas as colônias existentes (National Research Council 2010). Outra limitação é a presença de haplótipos “órfãos”, ou seja, haplótipos presentes em áreas de alimentação que ainda não foram registrados em áreas de desova não podendo, portanto, serem atribuídos a um local de origem; uma terceira limitação é a questão de que nem sempre as colônias são diferenciadas em frequências haplotípicas, como no caso de colônias próximas (Bowen & Karl 2007, National Research Council 2010). Esses fatores podem contribuir para os grandes intervalos de confiança que são observados nessas análises, indicando que esses valores podem fornecer estimativas qualitativas úteis, desde que utilizados em escala adequada (Bowen & Karl 2007).

De maneira geral, os dados genéticos mostram que embora as áreas de alimentação sejam um estoque misto, elas não se configuram em um caso de panmixia, já que populações regionais podem estar sujeitas a profundas subestruturações dentro das bases oceânicas (Lahanas *et al.* 1998, Godley *et al.* 2010).

Devido à natureza da composição de áreas de alimentação, é essencial determinar a composição do estoque populacional de tais áreas para estabelecer planos de manejo e estratégias de conservação efetivas que incorporem a história de vida destes répteis migratórios e contribuam para sua preservação (Encalada *et al.* 1996).

1.4.3 ESTRUTURA POPULACIONAL COMPLEXA

A maioria das espécies de tartarugas marinhas passa parte do seu ciclo de vida em grandes agregações alimentares que combinam indivíduos provenientes de populações reprodutoras separadas por grandes distâncias (Okuyama & Bolker 2005). Essa característica desafia as definições convencionais de estrutura de estoque: como definir estoques quando populações reprodutoras são mistas em um estágio de sua vida, e fortemente segregadas em outro (Bowen *et al.* 2005, Bowen & Karl 2007)? Além disso, como lidar quando informações do DNA de origem materna e biparental fornecem um perfil de estrutura populacional diferente (Bowen & Karl 2007)? Essas duas características prefiguram o que se conhece por estrutura populacional complexa, que pode ser aplicada a tartarugas marinhas, peixes, aves e mamíferos (Bowen *et al.* 2005, Bowen & Karl 2007).

Em 2005, Bowen *et al.* reuniram estudos de três populações de tartaruga-cabeçuda no Atlântico Norte, em amostras de indivíduos em diferentes estágios de vida – juvenis oceânicos, subadultos costeiros e fêmeas reprodutoras, utilizando marcadores mitocondriais (região controle do mtDNA) e nucleares (microssatélites). Com relação aos dados mitocondriais, os autores observaram três níveis de estrutura populacional, correspondendo aos três estágios de vida amostrados, e uma estruturação pronunciada à medida do avanço etário dos indivíduos. Ao avaliar os dados nucleares, a população reprodutora apresentou baixa estruturação, ao contrário do perfil gerado pelas análises com as mitocôndrias.

Estudos com tartarugas marinhas tem demonstrado baixa estruturação nuclear (Karl *et al.* 1992, Roberts *et al.* 2004), e parte destes resultados podem ser explicados pelas diferenças no comportamento reprodutivo entre machos e fêmeas; em tartarugas existe um fluxo gênico predominantemente mediado por machos (Bowen & Avise 1996, Bowen *et al.* 2005). A sobreposição de áreas de alimentação e corredores migratórios fornece oportunidades para acasalamento entre tartarugas de diferentes colônias (National Research Council 2010). Resultados semelhantes aos citados anteriormente já foram encontrados em análises mitocondriais e nucleares no oeste do Oceano Pacífico (Fitzsimmons *et al.* 1997).

As áreas de nidificação de tartarugas marinhas são tratadas como unidades de manejo, independentemente do fluxo gênico mediado por machos (Bowen *et al.* 1992, Bowen & Karl 2007), pois o perfil reprodutivo de cada colônia está ligado ao sucesso reprodutivo das fêmeas (Bowen & Avise 1996, Bowen & Karl 2007). Como exemplo, se machos fossem eliminados dos habitats reprodutores adjacentes às praias de desova, a população nidificante ainda existiria, pois algumas fêmeas são inseminadas em áreas de alimentação ou corredores migratórios; por outro lado, se as fêmeas fossem eliminadas, então a população reprodutora daquela colônia seria extinta (Bowen & Karl 2007).

Populações isoladas ou Unidades de Manejo (MU, do inglês *Management Units*) são definidas como populações com divergências significativas nas frequências alélicas em loci nucleares ou mitocondriais (Moritz 1994). Em estudos de pesca, populações são definidas como “estoques”, e em conservação como “unidades de manejo”. Embora não sejam exatamente sinônimos, esses termos partilham o conceito de independência reprodutiva e demográfica (National Research Council 2010), e são utilizados com frequência em estudos de tartarugas marinhas.

Em 2010, Wallace *et al.* realizaram uma compilação de todos os dados disponíveis na literatura para obter uma visão geral do conceito de populações de tartarugas marinhas, definido como Unidades Regionais de Manejo, ou RMU (do inglês, *Regional Management Units*). Segundo os autores, esta complexidade observada na estrutura populacional, uso do habitat, fatores ambientais e ameaças específicas a cada estágio de vida confundem a definição tradicional de unidade de manejo. A RMU parece ser uma solução ao desafio de como organizar as tartarugas marinhas em unidades de proteção acima do nível de populações reprodutoras, dentro de entidades regionais que podem estar em trajetórias evolutivas independentes: mais de uma colônia pode estar conectada por fluxo gênico via machos dentro de uma mesma RMU. Para colônias regionais de tartarugas marinhas, o DNA nuclear poderia indicar uma única unidade de manejo, o que nem sempre é o caso (Bowen & Karl 2007). Ainda é um desafio entender o grau de conectividade entre áreas de reprodução e de desenvolvimento, questão que possui implicações evolutivas e ecológicas importantes (Godley *et al.* 2010).

A resolução de unidades de manejo de animais marinhos migratórios depende de uma estratégia que considere a história de vida complexa que possuem, estudando todos os estágios de vida, com marcadores mitocondriais e nucleares, a fim de entender como a biologia de populações tem delineado a estrutura genética através do tempo e quais as perspectivas para o futuro (Lande 1988, Bowen & Karl 1996, Bowen *et al.* 2005, Reece *et al.* 2005, Bowen & Karl 2007, National Research Council 2010).

1.4.4 HISTÓRIA DEMOGRÁFICA

Para uma dada população, a abundância de indivíduos ao longo do tempo é determinada por cinco processos demográficos (nascimento, morte, crescimento, imigração, emigração) sujeitos a variações ambientais, demográficas e genéticas (Chaloupka & Musick 1997). Populações naturais podem responder às mudanças no habitat adaptando-se (por meio de seleção natural ou plasticidade fenotípica), movendo-se (para evitar habitats pouco favoráveis), ajustando seu tamanho populacional ou a combinação de mais de um dos fatores citados (de Bruyn *et al.* 2009). Em tartarugas marinhas, a ampla distribuição geográfica contrasta com a distribuição total dos eventos reprodutivos (Reece *et al.* 2005).

A investigação do padrão histórico e dinâmica populacional é crítica para acessar o status populacional, especialmente quando se trata de espécies ameaçadas de extinção (Plot *et al.* 2012).

Métodos distintos e em escalas de tempo diferentes são utilizados para inferir tamanhos populacionais ancestrais em populações de animais marinhos, como entrevistas com pescadores, dados zooarqueológicos, registros históricos de capturas, conhecimentos ecológicos, observações históricas de caça, distribuição fornecidas por naturalistas e dados moleculares (Lotze & Worm 2009, McClenachan *et al.* 2011). Entretanto, muitas vezes esses recursos históricos são escassos, sendo necessário desenvolver e aplicar métodos para verificar reduções demográficas, e uma maneira de fazê-lo é por meio do uso de marcadores genéticos neutros, como microssatélites (Hoffman *et al.* 2011).

Os eventos demográficos normalmente deixam uma assinatura genética temporária; em populações sujeitas a redução ou expansão, a distribuição alélica será diferente da esperada sob condições de equilíbrio entre deriva genética e mutação (Cornuet & Luikart 1996). Em uma população que presenciou um gargalo populacional (ou *bottleneck*) haverá uma redução de diversidade genética, com perda de alelos, especialmente os raros; e da mesma maneira, em caso de expansão populacional, é esperado um aumento de diversidade genética, devido ao excesso de alelos raros (Nei *et al.* 1975, Frankham *et al.* 2009, Hoffman *et al.* 2011).

A estrutura genética e história demográfica de uma espécie devem ser acessadas para aplicação de planos de conservação (Lande 1988), entretanto, poucos estudos ecológicos levam em conta padrões históricos e processos que resultaram em padrões atuais de estrutura genética (Jackson *et al.* 2001, Reece *et al.* 2005). O primeiro estudo de história demográfica recente em pequenas populações de tartarugas marinhas foi publicado em 2012 por Plot *et al.*; neste estudo foram avaliadas duas populações da tartaruga-oliva, e os resultados sugerem que a população atual seja descendente de uma população cerca de 130 vezes maior que o tamanho presente. Os dados são similares aos encontrados por McClenachan *et al.* (2006), nos quais as populações atuais de tartaruga-de-pente e tartaruga-verde no Caribe correspondem a 0,3% do seu tamanho ancestral.

Por outro lado, alguns trabalhos publicados sugerem que apesar desta redução, algumas populações parecem ser capazes de responder positivamente ao declínio, possivelmente devido à capacidade própria das espécies em se recuperarem das flutuações populacionais, ou ao sucesso de estratégias conservacionistas: em uma compilação de dados, Chaloupka *et al.* (2008) notaram um aumento nas populações reprodutoras de *Chelonia mydas* nas últimas três décadas; Plot *et al.* (2012) relataram que embora tenham observado um evento de *bottleneck* com base em dados genéticos, o monitoramento de sítios de desova sugeria uma recuperação das populações de *Lepidochelys olivacea*; resultados semelhantes foram encontrados em outro estudo mais recente, em populações de *Dermochelys coriacea* (Molfetti *et al.* 2013).

No entanto, a recuperação é um fenômeno recente, e muitas populações, especialmente aquelas de espécies de grande porte e taxas de crescimento lentas,

permanecem em uma abundância baixa relativa aos dados históricos (Lotze & Worm 2009), sujeitas a flutuações ainda desconhecidas.

Análises de dados ecológicos recentes e passados indicam um declínio nas subpopulações de tartaruga-verde em todas as bases oceânicas ao longo das três últimas gerações, como resultado da sobre-exploração de ovos e fêmeas adultas em praias de desova, juvenis e adultos em áreas de alimentação, e mortalidade incidental causada por pesca marítima e degradação do habitat, como poluição marinha (Seminoff 2004). A preocupação com a redução das tartarugas marinhas não se refere apenas a estes animais e ao fato de estarem ameaçados, como também ao nicho único que ocupam e sua função no ecossistema (Reece *et al.* 2005, McClenachan *et al.* 2006).

Perspectivas históricas podem fornecer uma melhor compreensão dos fatores que permitiram ou impediram a recuperação de populações passadas, assim como ser uma fonte de informação para interpretar tendências atuais e prever mudanças futuras de populações naturais (Reece *et al.* 2005, Lotze & Worm 2009).

OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar a diversidade genética e a história demográfica de populações de *Chelonia mydas* presentes em áreas de alimentação e desova no Atlântico Oeste, com base em marcadores dos genomas nuclear e mitocondrial. Os objetivos específicos estão organizados de acordo com os seguintes tópicos:

1. Diversidade genética em uma escala espacial

- Avaliar e comparar a diversidade genética de uma área de alimentação brasileira (São Francisco de Itabapoana, RJ) em relação às outras áreas de alimentação já descritas na literatura, utilizando a região controle do mtDNA ;
- Avaliar e comparar a diversidade genética de duas áreas de desova (Guiana Francesa e Guadalupe), com base em sequências da região controle do mtDNA;
- Inferir a origem dos indivíduos presentes na área de alimentação do estudo, utilizando a região controle do mtDNA;

2. Diversidade genética em uma escala temporal

- Avaliar diversidade genética, estrutura e o tamanho populacional atual de três populações (Guadalupe, Guiana Francesa e São Francisco de Itabapoana, RJ), com base em 10 loci de microssatélites;
- Avaliar oscilações demográficas passadas, utilizando 10 loci de microssatélites.

CAPÍTULO 1. Estrutura populacional de *Chelonia mydas* em áreas de alimentação e desova no Oceano Atlântico, com base em sequências de mtDNA

1.1 ABSTRACT

Sea turtles are reptiles globally distributed that exhibit complex life traits, such as long generation time, oceanic habitat of juveniles, female homing and wide-ranging migrations, which hinders ecological studies on the taxon. The migratory behavior outcomes in spatial segregation of feeding and nesting sites, resulting in successive stages of mixing and isolating genetic stocks, both spatially and temporally. The green turtle, *Chelonia mydas*, is threatened with extinction worldwide and it is important to understand its history in order to assess population dynamics and make future projections on the population trends. The use of molecular techniques has enabled progresses in species conservation, such as characterization of population structure, genetic diversity and natal origins. Thus, the aim of this study is to characterize the genetic composition of *C. mydas* in a feeding ground (hereafter FG) (at north coast of Rio de Janeiro state, Brazil, n=190) and two rookeries (French Guiana, n=46, and Guadeloupe, n=24) in West Atlantic Ocean, as well as the natal origins of juveniles at the FG, based on mitochondrial DNA sequences. The FG is composed by 13 haplotypes: CM-A8 (68%), CM-A5 (20%) and the others with a frequency less than 5% (CM-A1, CM-A3, CM-A6, CM-A9, CM-A10, CM-A23, CM-A24, CM-A32, CM-A42 and two previously undescribed haplotypes, CM-A69 and CM-A70). The nesting rookeries are composed by CM-A5 (95%) and CM-A3 (5%) in Guadeloupe, and by CM-A5 (93%), CM-A8 (4%) and CM-A22 (3%) in French Guiana. The mixed stock analyses (MSA) revealed a major genetic contribution to the FG from Ascension Island, an isolated island in South Atlantic; from French Guiana, in West Atlantic; and from Guinea Bissau. Given the genetic composition of feeding grounds, characterized by individuals from several natal origins, and the worldwide distribution of green sea turtles, it is essential to understand the dispersion patterns to increase efficiency of management plans. These results contribute to better understand the dynamic of green sea turtle population on Atlantic Ocean. This study highlights the

importance of connecting nesting and feeding areas that can be widely distributed according to ecological opportunities or constraints: conservation initiatives have to focus not only on those areas, but also on corridors between them.

1.2 RESUMO

As tartarugas marinhas são répteis com distribuição global que exibem características complexas como longo tempo de geração, habitat oceânico de juvenis, filopatria e migrações extensas, o que dificulta estudos ecológicos sobre o táxon. O comportamento migratório resulta na segregação espacial de locais de alimentação e reprodução, resultando em estágios sucessivos de mistura e isolamento de estoques genéticos, espacial e temporalmente. A tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) é um animal ameaçado de extinção, e entender a sua história é fundamental para avaliar a dinâmica populacional e realizar projeções futuras na tendência populacional. O uso de técnicas moleculares permitiu progressos na conservação da espécie, ao auxiliar a caracterização da estrutura populacional, diversidade genética e origens dos indivíduos. Desta forma, o objetivo deste trabalho é caracterizar a composição genética de *C. mydas* em uma área de alimentação (no litoral norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil, n=190) e duas áreas de reprodução (Guiana Francesa, n=46, e Guadalupe, n=24) no Oceano Atlântico, assim como as origens dos indivíduos presentes na área de alimentação, com base em sequências da região controle do DNA mitocondrial. A área de alimentação é composta de 13 haplótipos: CM-A8 (68%), CM-A5 (20%) e os outros com frequência inferior a 5% (CM-A1, CM-A3, CM-A6, CM-A9, CM-A10, CM-A23, CM-A24, CM-A32, CM-A42 e dois não descritos anteriormente, CM-A69 e CM-A70). As áreas de reprodução são compostas por CM-A5 (95%) e CM-A3 (5%) em Guadalupe, e por CM-A5 (93%), CM-A8 (4%) e CM-A22 (3%) na Guiana Francesa. As análises de estoque misto revelaram uma grande contribuição para a área de alimentação proveniente da Ilha Ascensão, uma ilha isolada no Atlântico Sul; da Guiana Francesa, no Oeste do Atlântico, e de Guiné Bissau. Dada a composição das áreas de alimentação, caracterizadas por indivíduos provenientes de diversas origens, e a distribuição global das tartarugas-verdes, é essencial entender os

padrões de dispersão para aumentar a eficiência dos planos de manejo. Estes resultados contribuem para uma melhor compreensão da dinâmica das populações de tartarugas-verdes que frequentam o Oceano Atlântico. Este estudo enfatiza a importância da conectividade entre áreas de alimentação e desova que podem estar amplamente distribuídas de acordo com oportunidades ou restrições ecológicas: as iniciativas de conservação devem focar não apenas nestas áreas, como também nos corredores entre estas.

1.3 INTRODUÇÃO

Tartarugas marinhas são répteis que apresentam comportamento migratório em diferentes etapas do seu ciclo de vida, ocupam uma diversidade de nichos ecológicos, e atualmente existem apenas sete espécies, a maioria delas distribuída de maneira desigual pelos oceanos tropicais (Bowen & Avise 1996, Pritchard 1997, Meylan & Meylan 1999, Bowen & Karl 2007). Estes animais possuem um alto valor econômico e grande vulnerabilidade, e sua inclusão nas listas de animais ameaçados de extinção é um reflexo primário da superexploração do passado e uma necessidade atual de conservação da espécie (Pritchard 1997).

A tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) possui uma história de vida complexa que dificulta seu estudo, principalmente devido às escalas temporais e espaciais envolvidas (Bowen *et al.* 1992). De maneira geral, a história de vida compreende quatro etapas principais, o filhote, juvenil, subadulto e adulto, quando atinge a maturidade sexual (Bowen & Karl 2007); as fêmeas migram longas distâncias entre áreas de alimentação e desova (Bowen & Avise 1996). A distribuição destes animais é uma consequência de suas necessidades alimentares e de habitat, resultando em uma distribuição desigual pelos oceanos (Balazs 1980). A tartaruga-verde é onívora enquanto filhote, e após este período, alimenta-se preferencialmente de algas, formando grupos de alimentação em águas costeiras (Ernst *et al.* 1994).

Os adultos retornam à sua praia natal para reprodução (Bowen & Avise 1996). Estudos de colônias reprodutoras de tartarugas-verdes com base no DNA

mitocondrial revelaram um agrupamento filogenético em dois grupos distintos, correspondentes às bases oceânicas do Atlântico e Mediterrâneo e oceanos Índico e Pacífico (Aulsebrook *et al.* 1992, Bowen *et al.* 1992, Karl *et al.* 1992, Encalada *et al.* 1996, Roberts *et al.* 2004). Este padrão genético é consistente com limites geográficos e climáticos que definem a distribuição de tartarugas-verdes (Bowen *et al.* 1992).

A presença de mudanças significativas na frequência de haplótipos entre populações reprodutoras, assim como a presença de haplótipos endêmicos possibilitam a distinção entre os estoques genéticos de tartarugas marinhas e a identificação do local de origem destas, quando encontradas em áreas de alimentação, ou estoques mistos (Bass 1999, Bjorndal *et al.* 2006). Esta identificação, conhecida como Análise de Estoque Misto, é realizada por métodos matemáticos para estimar a contribuição de cada fonte (área de desova) a uma área de alimentação, que é composta por indivíduos provenientes de diversas origens (Bolker *et al.* 2007).

As tartarugas marinhas são animais de grande interesse na genética da conservação devido ao seu declínio populacional e história de vida complexa (Bowen *et al.* 1992, Bolker *et al.* 2003, Roden *et al.* 2009). Quando as tartarugas se misturam em habitats de alimentação compartilhados, as populações de algumas colônias podem estar mais vulneráveis que outras (National Research Council 2010). Quantificar a conectividade espacial entre áreas de alimentação e de desova é essencial para a formulação de estratégias conservacionistas, especialmente para proteger uma espécie migratória como a tartaruga-verde por toda a sua distribuição (Bjorndal & Bolten 2008, National Research Council 2010).

Portanto, os objetivos deste trabalho incluem avaliar a diversidade genética de *Chelonia mydas* em áreas de alimentação e desova no Atlântico Oeste, inferir a origem dos indivíduos em áreas de alimentação e avaliar a estrutura populacional e a conectividade entre populações.

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

1.4.1 ÁREAS DE ESTUDO

O estudo foi conduzido em três locais: uma área de alimentação localizada no litoral norte do estado do Rio de Janeiro (município de São Francisco de Itabapoana, abreviado como SFI), e em duas áreas de desova, na Guiana Francesa (GF) e em Guadalupe (GD) (fig. 1).

Fig. 1: Localização das áreas de estudo: Guadalupe e Guiana Francesa, áreas de desova, e SFI (São Francisco de Itabapoana), área de alimentação.

ÁREA DE ALIMENTAÇÃO

O município de São Francisco de Itabapoana localiza-se no extremo norte do estado do Rio de Janeiro, na divisa com o Espírito Santo ($21^{\circ}28'12''S$ e

41°07'08"W) (fig. 2), e pertence à microrregião de Campos dos Goytacazes. SFI limita ao norte com o Rio Itabapoana e ao sul, com o Rio Paraíba do Sul, o que resulta em um grande aporte de água e sedimentos, fazendo com que esta região possua características estuarinas (Faria *et al.* 2001).

Algumas praias apresentam formações rochosas que favorecem a presença de bancos de algas, atraindo tartarugas marinhas para os locais (Nogueira 2011). O projeto TAMAR/ICMBio da Base Bacia de Campos e uma empresa de monitoramento ambiental atuam na região, verificando a ocorrência de tartarugas marinhas na praia, vivas ou mortas, em monitoramentos diários por 36 quilômetros de praia. Os dados utilizados neste estudo referem-se a coletas entre maio de 2011 e junho de 2012.

Fig. 2: Localização de SFI em relação ao estado do Rio de Janeiro. A coleta de dados realizou-se por toda a extensão das praias do município, destacadas pelas cores e legenda na figura.

ÁREAS DE DESOVA

As áreas de desova compreendem praias localizadas na Guiana Francesa, na América do Sul ($5^{\circ}3'48''\text{N}$ e $52^{\circ}26'55''\text{W}$), e o arquipélago de Guadalupe, nas Antilhas Francesas ($16^{\circ}12'27''\text{N}$ e $61^{\circ}34'57''\text{W}$) (fig. 3). Ambos os locais são territórios ultramarinos franceses.

Fig. 3: Mapa das áreas de desova amostradas no estudo: Guadalupe e Guiana Francesa, esta última, destaque para os dois pontos de coleta no país.

Na Guiana Francesa, foram coletadas amostras de fêmeas em pontos distintos e não contínuos, Awala e Cayenne. A região costeira no país é bastante dinâmica, sendo influenciada por bancos de lama do Amazonas, causando a perda de alguns locais de nidificação e a colonização de novos (BioInsight/DIREN Guyane 2003).

As amostras de tecido foram retiradas de fêmeas durante a oviposição, com auxílio de campo da ONG Kwata e do CNRS (do francês, *Centre National de la Recherche Scientifique*), entre as temporadas reprodutivas de 2011 e 2012.

1.4.2 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL

A extração do DNA foi realizada a partir de aproximadamente 3 mm de tecido digerido com 15 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 400 µL de tampão salino a 65°C durante uma noite (Sambrook *et al.* 2001). A extração foi realizada seguindo os protocolos de extração salina de (Aljanabi & Martinez 1997) ou o de fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.* 1989).

Sequências de cerca de 700 pb da região controle do DNA mitocondrial foram amplificadas através da técnica de PCR usando os *primers* LCM15382 (5' – GCTTAACCCTAAAGCATTGG – 3') e H950 (5' – GTCTCGGATTTAGGGGTTTG – 3') (Abreu-Grobois *et al.* 2006).

A reação de PCR incluiu 1X de (NH₄)₂SO₄ Buffer, 2,5 mM de MgCl₂ (Thermo Scientific®), 400 µM de dNTPs, 0,4 µM de cada primer, 0,1 U de *Taq* DNA Polymerase (Thermo Scientific®), 20 ng de DNA e água MilliQ para completar o volume final de 25µL. A amplificação foi realizada segundo o protocolo: 94°C a 2 min, seguido de 40 ciclos a 94°C (1 min), 57°C (1 min), e 72°C (1 min), e uma extensão final de 72°C a 10 min.

Os produtos de PCR amplificados foram sequenciados utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), e precipitados de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram submetidas à

corrida eletroforética nos sequenciadores automáticos ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzer.

1.4.3 ANÁLISE DOS DADOS

DIVERSIDADE GENÉTICA E DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL: ÁREAS DE ALIMENTAÇÃO

O alinhamento das sequências foi realizado com o auxílio dos programas BioEdit 5.0.6 (Hall 2001) e MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011). As sequências dos haplótipos foram comparadas com aquelas depositadas nos bancos de dados do *Archie Carr Center for Sea Turtle Research* (<http://accstr.ufl.edu/resources/mtdna-sequences/>) e no *GenBank* (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) para confirmação da amplificação correta das amostras.

As sequências haplotípicas foram analisadas pelo programa jModelTest (Posada 2008) para verificar qual o melhor modelo de substituição dos nucleotídeos. O modelo escolhido foi o Tamura & Nei (1993), sendo selecionado para as análises posteriores. Índices de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) foram obtidos através do programa Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.* 2005), utilizando 100.000 passos em cadeias de Markov. O programa TCS (Clement *et al.* 2000) foi utilizado para gerar uma rede haplotípica, determinando as relações entre os haplótipos encontrados.

Testes exatos de diferenciação (Raymond & Russet 1995) foram realizados pelo programa Arlequin para comparar amostras dos locais de alimentação com outros locais já descritos na literatura (Naro-Maciel *et al.* 2007).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi conduzida para determinar a estrutura populacional entre e dentro dos grupos de alimentação do Oceano Atlântico, por meio do F_{st} (utilizando apenas frequências haplotípicas) e o ϕ_{st} (utilizando o modelo de distância genética de Tamura & Nei). Essas análises também foram conduzidas com o auxílio do programa Arlequin. Os sítios de alimentação de *Chelonia mydas* no Oceano Atlântico que foram utilizados para comparação nas análises estão relacionados na tabela 1, e a localização geográfica de cada área está ilustrada na figura 4.

Tabela 1: Áreas de alimentação utilizadas no presente estudo.

Localidade	Número amostral	Referência
Carolina do Norte (CN)	106	Bass <i>et al.</i> 2006
Flórida (FL)	62	Bass & Witzell 2000
Bahamas (BH)	80	Lahanas <i>et al.</i> 1998
Barbados (BB)	60	Luke <i>et al.</i> 2004
Nicarágua (NI)	60	Bass <i>et al.</i> 1998
Almofala (AM)	117	Naro-Maciel <i>et al.</i> 2007
F. Noronha (FN)	117	Naro-Maciel <i>et al.</i> 2012
Atol das Rocas (AR)	101	Naro-Maciel <i>et al.</i> 2012
Bahia (BA)	45	Naro-Maciel <i>et al.</i> 2012
Espírito Santo (ES)	157	Naro-Maciel <i>et al.</i> 2012
Ubatuba (UB)	113	Naro-Maciel <i>et al.</i> 2007
Arvoredo (AD)	115	Proietti <i>et al.</i> 2012
Argentina (AG)	93	Prosdocimi <i>et al.</i> 2012
Cabo Verde (CV)	44	Monzón-Arguello <i>et al.</i> 2010
São Francisco Itabapoana (SFI)	190	Este estudo

Fig. 4: Localização das áreas de alimentação analisadas. Em cor destacada, a área amostrada neste estudo.

DIVERSIDADE GENÉTICA E DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL: ÁREAS DE DESOVA

As mesmas análises descritas anteriormente foram utilizadas para analisar a diversidade e diferenciação genética entre Guiana Francesa, Guadalupe e as outras áreas de desova (tabela 2, figura 5).

Tabela 2: Áreas de desova utilizadas como referência neste estudo.

Localidade	N	Referência
México (MX)	20	Encalada <i>et al.</i> 1996
Costa Rica (CR)	433	Bjorndal <i>et al.</i> 2005
Flórida (FL)	24	Encalada <i>et al.</i> 1996
Ilha Aves/Suriname	45	Encalada <i>et al.</i> 1996
Atol das Rocas (AR)	53	Encalada <i>et al.</i> 1996, Bjorndal <i>et al.</i> 2006
Ilha Trindade (TI)	99	Bjorndal <i>et al.</i> 2006
Ilha Ascensão (AI)	245	Encalada <i>et al.</i> 1996, Formia <i>et al.</i> 2006
Guiné Bissau (GB)	70	Encalada <i>et al.</i> 1996, Formia <i>et al.</i> 2006
São Tomé (ST)	20	Formia <i>et al.</i> 2006
Bioko (BI)	50	Formia <i>et al.</i> 2006
Chipre (CH)	26	Encalada <i>et al.</i> 1996, Kaska 2000
Cuba (CB)	28	Ruíz-Urquíola <i>et al.</i> 2010
Guiana Francesa (GF)	46	Este estudo
Guadalupe (GD)	24	Este estudo

Fig. 5: Localização das áreas de desova analisadas.

ORIGEM DE INDIVÍDUOS EM ÁREAS DE ALIMENTAÇÃO

Para analisar a origem dos indivíduos presentes em SFI, foi necessário verificar se o local constituía um estoque misto, ou seja, a hipótese de homogeneidade entre SFI e as áreas de desova presentes no Oceano Atlântico (listadas na tabela 2) deveria ser rejeitada (Chapman 1996). Para testar a hipótese, foram conduzidos testes exatos de diferenciação no programa Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.* 2005) e testes do Qui-Quadrado (χ^2) no programa CHIRXC (Zaykin & Pudovkin 1993).

Os haplótipos “órfãos” (haplótipos encontrados em áreas de alimentação, ainda não descritos em áreas de desova) foram excluídos das análises de estoque misto, por não ser possível determinar a sua origem nestes casos.

As análises de estoque misto (MSA) foram realizadas para avaliar e quantificar a contribuição das áreas de desova presentes no Atlântico e Caribe para as populações de SFI, a fim de entender a conectividade entre tais áreas. O MSA foi conduzido com o auxílio do algoritmo Bayesiano, por meio de dois programas distintos: Bayes (Pella & Masuda 2001) e o R (*R Development Core Team* 2005). O Bayes foi utilizado na abordagem “many-to-one” (abreviado como m2o), em que é estimada a contribuição de cada colônia para um único sítio de alimentação, enquanto o R foi implementado para “many-to-many” (abreviado como m2m), que considera as relações entre todas as colônias e sítios de alimentação conhecidos em uma base oceânica (fig. 6).

Fig. 6: Diagrama dos pressupostos de cada análise. R refere-se às colônias, e F, às áreas de forrageio. Retirado de Bolker *et al.* (2007).

A abordagem *many-to-one* analisou duas possibilidades: a primeira (m2o₁) considera a probabilidade de que cada área de desova contribua igualmente para os estoques mistos; a segunda (m2o₂) considera a probabilidade de contribuição proporcional ao número de fêmeas de cada possível colônia (Bass *et al.* 2004, Naro-Maciel *et al.* 2007).

As análises no Bayes foram implementadas com 90.000 MCMC (Monte Carlo em Cadeias de Markov), e os resultados só foram considerados após as cadeias convergirem, o que era verificado pelo Diagnóstico de Gelman & Rubin (1992), com valores inferiores a 1,2. Os resultados finais m2o₁ e m2o₂ foram comparados entre si por meio de estimativas de correlação linear de Pearson, no programa Bioestat 5.0 (Ayres *et al.* 2007).

O *many-to-many* avalia o movimento entre todas as colônias e estoques mistos ao invés de analisar todas as fontes para um estoque, portanto, é mais plausível assumir o pressuposto de que a contribuição das áreas de desova é proporcional ao seu tamanho efetivo (Bolker *et al.* 2007). O Diagnóstico de Gelman & Rubin foi constatado após 90.000 MCMC, e da mesma maneira, apenas após as cadeias convergirem os dados foram considerados.

As análises de *many-to-many* consideraram as seguintes situações: (1) todas as áreas de desova e de alimentação foram analisadas (m2m₁); (2) a área de desova do Chipre foi excluída, devido a análises anteriores demonstrarem baixa contribuição desta colônia para áreas de alimentação do Oceano Atlântico (m2m₂); (3) Guiné Bissau também foi excluída das análises, pois se acredita que esta possa ser uma população local conectada a uma área de alimentação ainda não amostrada (Godley *et al.* 2010) (m2m₃); e (4) Guiné Bissau foi incluída na análise, assim como uma área de alimentação hipotética, com haplótipo fixado em CM-A8 (n=120); como Guiné Bissau apenas apresenta este haplótipo, esta seria a composição hipotética de uma área de alimentação local, seguindo Naro-Maciel *et al.* (2012) (m2m₄).

Testes de regressão linear foram realizados em ambos os tipos de análise (m2o e m2m) com a finalidade de determinar se havia alguma relação de dependência entre a contribuição de cada colônia e a distância geográfica. Os testes

foram implementados no programa Bioestat 5.0. As distâncias geográficas das áreas de desova assim como o número de fêmeas reprodutoras de cada local estão relacionadas na tabela 3. Essas distâncias foram calculadas com o auxílio do *Great Circle Distance*, que leva em consideração a superfície esférica do planeta, importante para grandes migrações.

Tabela 3: Número de fêmeas de cada área de desova (retirado de Naro-Maciel *et al.* 2012, exceto para as colônias deste estudo) e a distância geográfica em relação à SFI.

Localidade	Número de fêmeas	Distância (em km)
México	1587	6756
Costa Rica	24000	5729
Flórida	779	6877
Ilhas Aves	850	4789
Suriname	1814	3413
Atol das Rocas	115	2102
Ilha Trindade	900	1229
Ilha Ascensão	3709	3233
Guiné Bissau	2523	4581
São Tomé	90	5705
Bioko	407	6084
Chipre	100	9966
Cuba	200	6451
Guadalupe	50	4727
Guiana Francesa	6000	3183

1.5 RESULTADOS

DIVERSIDADE GENÉTICA E DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL: ÁREAS DE ALIMENTAÇÃO

Após um ano de amostragem no litoral norte fluminense, foram sequenciados 190 indivíduos juvenis e subadultos (comprimento curvilíneo da carapaça CCC: média= 37,5 cm; dp= $\pm 8,4$) (Musick & Limpus 1997), de um total de 475 amostras de *Chelonia mydas* coletadas no período. Foram encontrados 13 haplótipos, sendo 11 previamente registrados em outras áreas, e dois registrados pela primeira vez. São eles: CM-A8, CM-A5, CM-A10, CM-A23, CM-A9, CM-A6, CM-A1, CM-A42, CM-A24, CM-A3, CM-A32, CM-A69 e CM-A70 (figura 7, tabela 4). As

sequências dos haplótipos novos, CM-A69 e CM-A70, foram depositadas no *Genbank* sob os números de acesso KC792574 e KC792575, respectivamente.

Fig. 7: Haplótipos presentes em São Francisco de Itabapoana e a relação entre estes. Os tamanhos são proporcionais às frequências encontradas na área de estudo.

Os 13 haplótipos registrados são definidos por 19 sítios polimórficos, sendo 15 substituições (razão transição-transversão de 14:1) e quatro inserções-deleções. As diversidades haplotípica e nucleotídica de SFI, quando avaliadas com sequências longas (cerca de 700 pb) foram, respectivamente, $0,4929 \pm 0,0381$ e $0,0014 \pm 0,0010$. Entretanto, para propósitos de comparação, apenas as sequências curtas (cerca de 480 pb) foram consideradas nas meta-análises (tabela 5).

Tabela 4: Haplótipos de *Chelonia mydas* em SFI e suas frequências relativas.

Haplótipo	Frequência relativa
CM-A8	0,684
CM-A5	0,200
CM-A9	0,021
CM-A6	0,016
CM-A24	0,016
CM-A42	0,016
CM-A10	0,011
CM-A32	0,011
CM-A23	0,005
CM-A1	0,005
CM-A3	0,005
CM-A69	0,005
CM-A70	0,005

Tabela 5: Diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) da região controle do mtDNA em áreas de alimentação no Oceano Atlântico.

Área de alimentação	N	Haplótipos	h	π
São Francisco (SFI)	190	13	0,4929 $\pm$ 0,0381	0,0023 $\pm$ 0,0017
Carolina do Norte	106	12	0,7294 $\pm$ 0,0301	0,0053 $\pm$ 0,0032
Flórida	62	6	0,4855 $\pm$ 0,0668	0,0035 $\pm$ 0,0023
Bahamas	80	7	0,3861 $\pm$ 0,0652	0,0064 $\pm$ 0,0037
Nicarágua	60	2	0,1831 $\pm$ 0,0621	0,0038 $\pm$ 0,0025
Barbados	60	8	0,7734 $\pm$ 0,0276	0,0103 $\pm$ 0,0056
Almofala	117	13	0,7168 $\pm$ 0,0306	0,0068 $\pm$ 0,0039
Fernando de Noronha	117	12	0,6497 $\pm$ 0,0280	0,0043 $\pm$ 0,0027
Atol das Rocas	101	8	0,6883 $\pm$ 0,0355	0,0048 $\pm$ 0,0029
Bahia	45	6	0,6475 $\pm$ 0,0529	0,0024 $\pm$ 0,0018
Espírito Santo	157	9	0,5954 $\pm$ 0,0306	0,0026 $\pm$ 0,0018
Ubatuba	113	10	0,4460 $\pm$ 0,0556	0,0020 $\pm$ 0,0015
Argentina	93	9	0,5526 $\pm$ 0,0511	0,0023 $\pm$ 0,0017
Arvoredo	115	12	0,5831 $\pm$ 0,0451	0,0025 $\pm$ 0,0018
Cabo Verde	44	5	0,5877 $\pm$ 0,0446	0,0042 $\pm$ 0,0027

Testes exatos de diferenciação global indicaram que as áreas de alimentação são diferentes entre si ($P < 0,0001$). Entretanto, em comparações par a

par esta diferenciação é menos pronunciada, e SFI não se distinguiu de algumas áreas de alimentação do Atlântico Sul: Bahia ($P=0,1772 \pm 0,0211$), Espírito Santo ($P=0,1046 \pm 0,0109$), Ubatuba ($P=0,2847 \pm 0,0120$), Argentina ($P=0,8832 \pm 0,0089$) e Arvoredo ($P=0,7328 \pm 0,0130$), após correção de Bonferroni. Resultados semelhantes foram obtidos nas análises de ϕ_{st} AMOVA ($\phi_{st}= 0,52$; $P<0,0001$) (tabela 6). Testes de χ^2 entre todas as áreas de alimentação apresentaram valores semelhantes ($\chi^2=1605,18$; $P<0,0001$), assim como nos testes par a par.

Tabela 6: Diferenciação genética entre áreas de alimentação do Oceano Atlântico. O valor-p nos testes exatos de diferenciação está descrito acima da diagonal, e os valores de ϕ_{st} AMOVA, abaixo da diagonal. Valores em negrito indicam $P<0,05$.

	SFI	CN	FL	BH	NI	BB	AM	FN	AR	BA	ES	UB	AG	AD	CV
SFI		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,177	0,105	0,285	0,883	0,733	0,002
CN	0,779		0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FL	0,848	0,027		0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
BH	0,760	0,048	0,037		0,400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
NI	0,843	0,079	0,015	0,016		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
BB	0,474	0,228	0,302	0,177	0,293		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AM	0,090	0,559	0,625	0,514	0,615	0,168		0,001	0,236	0,025	0,000	0,000	0,000	0,001	0,075
FN	0,086	0,694	0,761	0,657	0,753	0,338	0,056		0,002	0,071	0,002	0,000	0,000	0,000	0,984
AR	0,040	0,644	0,717	0,604	0,708	0,258	0,005	0,030		0,149	0,067	0,000	0,019	0,020	0,032
BA	0,021	0,723	0,817	0,682	0,807	0,347	0,063	0,016	0,023		0,583	0,007	0,378	0,897	0,036
ES	0,019	0,755	0,825	0,731	0,819	0,433	0,075	0,024	0,026	-0,011		0,000	0,313	0,418	0,052
UB	0,006	0,750	0,834	0,726	0,827	0,413	0,077	0,120	0,044	0,065	0,054		0,227	0,228	0,000
AG	-0,006	0,754	0,840	0,726	0,833	0,413	0,076	0,065	0,031	0,007	0,007	0,014		0,931	0,002
AD	-0,005	0,750	0,829	0,724	0,822	0,414	0,072	0,063	0,028	0,005	0,007	0,011	-0,008		0,008
CV	0,156	0,683	0,769	0,632	0,756	0,291	0,063	-0,009	0,048	0,046	0,059	0,199	0,129	0,119	

DIVERSIDADE GENÉTICA E DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL: ÁREAS DE DESOVA

As amostras das áreas de desova totalizaram 24 indivíduos em Guadalupe, e 46 na Guiana Francesa. Ao se considerar as sequências longas, a população de Guadalupe exibiu 3 haplótipos, CMA-5.1, CMA-5.2 e CM-A3, apresentando 12 sítios polimórficos, dos quais 10 eram transições, 1 transversão e 1 inserção-deleção. Quando consideradas as sequências curtas, a população de Guadalupe apresentou

2 haplótipos, CM-A3 e CM-A5, definidos por 10 sítios polimórficos, sendo 10 transições, e nenhuma inserção-deleção foi identificada.

Na Guiana Francesa, a análise de sequências longas revelou 3 haplótipos, CM-A5, CM-A8 e CM-A22, constituídos de 15 sítios polimórficos: 14 transições e 1 transversão. Já para as sequências curtas, os mesmos haplótipos foram identificados por 13 sítios polimórficos (12 transições e 1 transversão) (tabela 7, figura 8).

Testes exatos de diferenciação indicaram não haver diferença significativa entre os dois sítios de amostragem na Guiana Francesa ($P=0,1141$), Cayenne e Awala. Portanto, os dados de ambos os locais passaram a ser integrados para análises posteriores.

As diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) de Guadalupe foram $h=0,2355 \pm 0,1093$ e $\pi=0,0012 \pm 0,0009$; para a Guiana Francesa, os valores foram $h=0,1266 \pm 0,0655$ e $\pi=0,0018 \pm 0,0013$, quando consideradas as sequências longas. Os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica para sequências curtas de todas as áreas de desova do Oceano Atlântico estão indicados na tabela 8.

Tabela 7: Frequência relativa dos haplótipos de *Chelonia mydas* em Guadalupe e Guiana Francesa.

	Haplótipo	Frequência relativa
Guadalupe	CM-A5	0,950
	CM-A3	0,050
Guiana Francesa	CM-A5	0,930
	CM-A8	0,040
	CM-A22	0,030

Fig. 8: Rede de haplótipos em Guadalupe e Guiana Francesa. As frequências são proporcionais ao tamanho na figura.

Tabela 8: Diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) da região controle do mtDNA nas áreas de estudo, e comparação com outras áreas de desova.

Área de desova	N	Haplótipos	h	Π
Guadalupe (GD)	24	2	$0,0833 \pm 0,0749$	$0,0017 \pm 0,0014$
Guiana Francesa (GF)	46	3	$0,1266 \pm 0,0655$	$0,0027 \pm 0,0019$
México (MX)	20	7	$0,8158 \pm 0,0575$	$0,0051 \pm 0,0032$
Costa Rica (CR)	433	5	$0,1627 \pm 0,0231$	$0,0033 \pm 0,0022$
Flórida (FL)	24	3	$0,5616 \pm 0,0468$	$0,0013 \pm 0,0012$
Ilhas Aves/Suriname (AV)	45	4	$0,2091 \pm 0,0789$	$0,0028 \pm 0,0020$
Atol das Rocas (AR)	53	7	$0,5196 \pm 0,0763$	$0,0019 \pm 0,0015$
Ilha Trindade (TI)	99	7	$0,5046 \pm 0,0522$	$0,0012 \pm 0,0010$
Ilha Ascensão (AI)	245	13	$0,3031 \pm 0,0384$	$0,0008 \pm 0,0008$
Guiné Bissau (GB)	70	1	$0,0000 \pm 0,0000$	$0,0000 \pm 0,0000$
São Tomé (ST)	20	7	$0,5842 \pm 0,1270$	$0,0030 \pm 0,0021$
Bioko (BI)	50	2	$0,1837 \pm 0,0681$	$0,0004 \pm 0,0006$
Chipre (CH)	26	2	$0,0769 \pm 0,0697$	$0,0002 \pm 0,0004$
Cuba (CB)	28	7	$0,6481 \pm 0,0890$	$0,0053 \pm 0,0033$

Testes exatos de diferenciação global entre todas as áreas de desova indicam que as áreas diferem estatisticamente entre si ($P < 0,001$). Quando se trata de análises par a par, não há estruturação entre Guadalupe e Guiana Francesa ($P = 1,0000 \pm 0,0000$), Guadalupe e Ilhas Aves/Suriname ($P = 1,0000 \pm 0,0000$) e Guiana Francesa e Ilhas Aves/Suriname ($P = 0,5902 \pm 0,0015$), após correções de Bonferroni.

A análise de ϕ_{st} AMOVA também apresentou diferenciação global ($\phi_{st} = 0,80$; $p < 0,0001$) com resultados menos pronunciados em comparações par a par (tabela 9). Testes de χ^2 entre todas as áreas de alimentação apresentaram valores semelhantes ($\chi^2 = 1605,18$; $P < 0,0001$), assim como nos testes par a par.

Tabela 9: Diferenciação genética entre áreas de desova do Oceano Atlântico. O valor-p nos testes exatos de diferenciação está representado acima da diagonal, e os valores de ϕ_{st} AMOVA, abaixo da diagonal. Valores em negrito indicam $P < 0,05$.

	GD	GF	MX	CR	FL	AV	AR	TI	AI	GB	ST	BI	CH	CB
GD		1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
GF	-0,027		0,000	0,000	0,000	0,590	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
MX	0,817	0,802		0,000	0,024	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
CR	0,828	0,821	0,194		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FL	0,922	0,884	0,070	0,115		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004
AV	-0,025	-0,020	0,798	0,818	0,882		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AR	0,741	0,659	0,841	0,810	0,925	0,654		0,005	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000
TI	0,746	0,684	0,861	0,815	0,921	0,680	0,018		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AI	0,826	0,777	0,925	0,851	0,954	0,774	0,046	0,069		0,350	0,000	0,747	0,000	0,000
GB	0,897	0,771	0,917	0,827	0,980	0,769	0,092	0,102	0,011		0,000	0,011	0,000	0,000
ST	0,573	0,512	0,750	0,804	0,882	0,504	0,069	0,093	0,104	0,170		0,004	0,000	0,000
BI	0,807	0,684	0,878	0,819	0,958	0,680	0,076	0,093	0,006	0,102	0,059		0,000	0,000
CH	0,950	0,902	0,569	0,635	0,872	0,902	0,945	0,932	0,959	0,997	0,915	0,979		0,000
CB	0,916	0,881	0,092	0,064	0,009	0,880	0,919	0,918	0,952	0,972	0,876	0,950	0,833	

ORIGEM DOS INDIVÍDUOS EM ÁREAS DE ALIMENTAÇÃO

Os testes de heterogeneidade indicaram que SFI é significativamente distinto de todas as áreas de desova analisada (tabela 10).

Tabela 10: Testes de heterogeneidade entre SFI e áreas de desova. Estão representados os valores de qui-quadrado, Φ_{st} AMOVA e valor- P nos testes exatos de diferenciação. Valores em negrito indicam $P < 0,05$.

SÃO FRANCISCO DE ITABAPOANA, RJ			
	χ^2	Φ_{st} AMOVA	TESTE EXATO DE DIFERENCIAÇÃO
GD	63,12	0,536	0,000
GF	92,16	0,504	0,000
MX	174,53	0,839	0,000
CR	530,42	0,820	0,000
FL	190,90	0,885	0,000
AV	112,20	0,496	0,000
AR	54,65	0,098	0,000
TI	67,66	0,115	0,000
AI	68,74	0,098	0,000
GB	26,53	0,103	0,000
ST	51,18	0,042	0,003
BI	24,22	0,053	0,001
CH	211,00	0,890	0,000
CB	192,35	0,884	0,000

As análises de *many-to-one* indicaram que a maior contribuição genética para SFI provém da Ilha Ascensão, seguida da Guiana Francesa e Guiné Bissau, tanto para contribuições iguais (tabela 11) quanto para as proporcionais (tabela 12). As análises não encontraram relações entre as contribuições e as distâncias geográficas ($R_1^2=0,098$, $p_1=0,14$; $R_2^2=0,064$, $p_2=0,19$).

As análises de *many-to-many* sugeriram Guiné Bissau, Ilha Ascensão, Guiana Francesa e Ilhas Aves/Suriname como os principais contribuidores para a composição genética de SFI (figuras 9, 10, 11 e 12).

Tabela 11: Estimativas da contribuição (*many-to-one*) de cada estoque para SFI, considerando a hipótese de que cada um contribua igualmente para o estoque misto (m2o₁).

Estoque	Média (%)	Desvio Padrão	2,5%	97,5%
México	0,0022	0,0050	0,0000	0,0177
Costa Rica	0,0010	0,0030	0,0000	0,0104
Flórida	0,0034	0,0061	0,0000	0,0212
Ilhas Aves/Suriname	0,0123	0,0340	0,0000	0,1324
Atol das Rocas	0,0067	0,0215	0,0000	0,0730
Ilha Trindade	0,0113	0,0285	0,0000	0,1033
Ilha Ascensão	0,5782	0,1774	0,2187	0,8051
Guiné Bissau	0,1362	0,1615	0,0000	0,4832
São Tomé	0,0023	0,0091	0,0000	0,0236
Bioko	0,0336	0,0870	0,0000	0,3384
Chipre	0,0004	0,0015	0,0000	0,0044
Cuba	0,0015	0,0039	0,0000	0,0139
Guadalupe	0,0205	0,0473	0,0000	0,1811
Guiana Francesa	0,1904	0,0636	0,0190	0,2832

Tabela 12: Estimativas da contribuição (*many-to-one*) de cada estoque para SFI, considerando a probabilidade de contribuição proporcional ao número de fêmeas de cada colônia (m2o₂).

Estoque	Média (%)	Desvio Padrão	2,5%	97,5%
México	0,0017	0,0044	0,0000	0,0156
Costa Rica	0,0068	0,0069	0,0000	0,0249
Flórida	0,0012	0,0038	0,0000	0,0132
Ilhas Aves/Suriname	0,0095	0,0297	0,0000	0,1111
Atol das Rocas	0,0002	0,0030	0,0000	0,0000
Ilha Trindade	0,0038	0,0177	0,0000	0,0539
Ilha Ascensão	0,6419	0,1582	0,2827	0,8155
Guiné Bissau	0,1145	0,1527	0,0000	0,4715
São Tomé	0,0002	0,0042	0,0000	0,0000
Bioko	0,0056	0,0373	0,0000	0,0596
Chipre	0,0000	0,0003	0,0000	0,0000
Cuba	0,0001	0,0012	0,0000	0,0002
Guadalupe	0,0001	0,0030	0,0000	0,0000
Guiana Francesa	0,2143	0,0440	0,1028	0,2897

Fig. 9: Estimativas da contribuição (*many-to-many*) de cada estoque para as áreas de alimentação ($m2m_1$).

Fig. 10: Estimativas da contribuição (*many-to-many*) de cada estoque para as áreas de alimentação, excluindo o Chipre ($m2m_2$).

Fig. 11: Estimativas da contribuição (*many-to-many*) de cada estoque para as áreas de alimentação, excluindo o Chipre e Guiné Bissau (m2m₃).

Fig. 12: Estimativas da contribuição (*many-to-many*) de cada estoque para as áreas de alimentação, excluindo o Chipre e acrescentando Guiné Bissau e uma área de alimentação hipotética (HP) na análise (m2m₄).

1.6 DISCUSSÃO

DIVERSIDADE GENÉTICA E DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL: ÁREAS DE ALIMENTAÇÃO

Os resultados encontrados em SFI fornecem a evidência de que esta é uma área de alimentação para tartaruga-verde, diferenciada de todas as outras previamente descritas (pelo teste de diferenciação global), e composta de indivíduos provenientes de origens distintas. De 475 amostras coletadas, foram sequenciadas 190: o estudo de Formia (2002) sugere que, dada a região controle do mtDNA ser usada rotineiramente em estudos de tartaruga-verde e assumindo níveis comparáveis de variabilidade, um número de 180-200 seria adequado para documentar a diversidade genética.

Os haplótipos identificados em SFI em sua maioria foram previamente encontrados no Atlântico Sul (CM-A8, CM-A6, CM-A9, CM-A10, CM-23, CM-A42, CM-A24 e CM-A32), três são principalmente do Atlântico Norte (CM-A5, CM-A1 e CM-A3) e os outros dois (CM-A69 e CM-A70) foram registrados pela primeira vez na área de estudo. O perfil genético de SFI é bastante semelhante a outras áreas de alimentação do Oceano Atlântico Sul (figura 13).

Como já observado em outras áreas de alimentação do Atlântico Sul, o haplótipo mais frequente foi CM-A8 (Naro-Maciel *et al.* 2007, Proietti *et al.* 2009, Prosdocimi *et al.* 2012, Proietti *et al.* 2012, Naro-Maciel *et al.* 2012), sendo característico principalmente de colônias localizadas na Ilha Ascensão, Guiné Bissau e Brasil (Encalada *et al.* 1996), mas também já registrado em áreas de alimentação na região do Caribe, do Atlântico Norte (Lahanas *et al.* 1998, Luke *et al.* 2004). Este é o haplótipo mais frequente no Oceano Atlântico, e a sua posição central nas redes haplotípicas sugere que ele seja o mais próximo de um haplótipo ancestral do Atlântico (Encalada *et al.* 1996, Bjorndal *et al.* 2006).

O haplótipo CM-A5, segundo mais frequente na amostra, foi descrito para a região do Caribe (Lahanas *et al.* 1994, Lahanas *et al.* 1998, Bass & Witzell 2000, Bjorndal *et al.* 2005), enquanto CM-A6 foi encontrado em Atol das Rocas (Lahanas *et al.* 1994). Esses haplótipos podem ter colonizado a costa nordeste da América do Sul (Encalada *et al.* 1996).

Fig. 13: Mapa do perfil genético dos sítios de alimentação do Oceano Atlântico. Apenas os haplótipos mais frequentes de cada área estão demonstrados.

O haplótipo CM-A23 é encontrado na Ilha Trindade (Bjorndal *et al.* 2006). Os haplótipos CM-A10 e CM-A9 são provenientes da Ilha Ascensão, Ilha Trindade, Atol das Rocas e já foram registrados em áreas de alimentação no Caribe (Encalada *et al.* 1996, Luke *et al.* 2004, Bjorndal *et al.* 2006). O haplótipo 42, até o momento, só foi encontrado em áreas de alimentação (Naro-Maciel *et al.* 2007).

O haplótipo CM-A69, encontrado neste estudo, apresenta uma mutação em relação ao haplótipo CM-A9; já o haplótipo CM-A70, também encontrado pela primeira vez, difere em uma base de CM-A8, o haplótipo mais difundido no Atlântico Sul.

As diversidades haplotípicas (h) e nucleotídicas (π) apresentaram valores similares a de outras áreas de alimentação do Atlântico Sul (Naro-Maciel *et al.* 2007, Proietti *et al.* 2009, Naro-Maciel *et al.* 2012, Proietti *et al.* 2012, Prosdocimi *et al.* 2012).

De maneira semelhante, não foi encontrada uma estrutura evidente entre SFI e Bahia, Espírito Santo, Ubatuba, Arvoredo e Argentina. Este padrão é concordante com o sugerido por Fallabrino *et al.* (2010), no qual os autores propõem a criação de um corredor marinho entre Brasil, Argentina e Uruguai, por compartilharem populações de juvenis. Ao se avaliar o perfil genético das áreas de alimentação já estudadas, é possível observar dois grandes agrupamentos (figura 13): o do Atlântico Sul (Naro-Maciel *et al.* 2007, Naro-Maciel *et al.* 2012, Proietti *et al.* 2012, Prosdocimi *et al.* 2012), e outro que compreende as áreas de alimentação do Caribe e Atlântico Norte (Bass *et al.* 1998, Lahanas *et al.* 1998, Bass & Witzell 2000, Luke *et al.* 2004, Bass *et al.* 2006). Essa informação é corroborada pelos resultados de estrutura populacional, fornecidos pelos testes exatos de diferenciação e Φ_{ST} AMOVA realizados neste trabalho.

As diferenças na composição genética entre as áreas de alimentação podem ser atribuídas à proximidade de potenciais colônias contribuidoras, ou a variados mecanismos de dispersão (Bass & Witzell 2000). As diferenças (ou semelhanças) entre as áreas de alimentação também podem ser devido a efeitos do período de amostragem. Amostragens em apenas uma estação reprodutiva não permitem a observação de mudanças na composição haplotípica ao longo do tempo (Bass & Witzell 2000, Bjørndal & Bolten 2008). Outros fatores podem influenciar a composição genética de áreas de alimentação, como a distância geográfica entre colônias reprodutoras e as áreas de alimentação (Bass & Witzell 2000), o número de fêmeas que desova em cada local (Lahanas *et al.* 1998) e as correntes marítimas (Luke *et al.* 2004).

Em um estudo baseado em informações de telemetria de oito juvenis de *Chelonia mydas* no Brasil, verificou-se que estes animais movem-se por águas costeiras; e que a maior diferença na área de vida deve-se à dieta predominante dos animais, se for de algas marinhas ou macroalgas, com maiores áreas utilizadas no caso das macroalgas (quando a área de alimentação é de cerca de 90 km) (Godley *et al.* 2003). Outro estudo, realizado com telemetria de juvenis no México, sugeriu que as tartarugas-verdes podem percorrer grandes distâncias enquanto residentes em áreas de alimentação, e podem visitar vários habitats (Seminoff & Jones 2006).

A distribuição de tartarugas-verdes ao longo do Caribe e Oceano Atlântico demonstra a ausência de fronteiras nacionais em ambientes marinhos (Bass *et al.* 2006), e portanto, a definição da estrutura genética nestes casos é complexa (Shamblin *et al.* 2012a). Apesar disso, o padrão apresentado no Atlântico Sul é consistente com dados de marcação e recaptura que mostram movimentos de tartarugas-verdes para o norte e o sul, em áreas de alimentação (Marcovaldi *et al.* 2000). Ainda que as áreas de alimentação sejam compostas por indivíduos de diferentes origens, agrupamentos regionais podem estar sujeitos a subestruturação dentro das bases oceânicas (Godley *et al.* 2010, Naro-Maciel *et al.* 2012).

Uma das questões mais complexas no estudo de animais migratórios marinhos é o esclarecimento dos movimentos de juvenis; geralmente este estágio é difícil de estudar devido ao tamanho corporal reduzido, migrações de longas distâncias, alto custo para estudos dentro d'água, maior dificuldade e número menor de indivíduos observados, dado a baixa densidade destes animais no mar (Lahanas *et al.* 1998, Bjorndal *et al.* 2005a).

Devido à natureza migratória e estrutura populacional complexa, é necessário amostrar cada estágio de vida das tartarugas-verdes para determinar a extensão da conectividade entre populações (National Research Council 2010). Os estudos genéticos são uma alternativa para elucidar questões que se referem à distribuição e dinâmica das populações destes répteis marinhos (Bowen & Witzell 1996). A preservação de juvenis de tartarugas marinhas, muitas das quais se alimentam por toda a extensão da costa brasileira, complementa outros esforços de conservação, além de proteger áreas de desovas situadas a milhares de quilômetros de distância (Naro-Maciel *et al.* 2007).

DIVERSIDADE GENÉTICA E DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL: ÁREAS DE DESOVA

Os haplótipos encontrados em Guadalupe e Guiana Francesa apresentam um perfil característico de sítios de reprodução presentes no Caribe (figura 14). Também é possível observar quatro agrupamentos, referentes às colônias do Atlântico Norte, Caribe, Atlântico Sul e Mediterrâneo. O haplótipo CM-A5, mais

frequente nessas populações, já foi descrito em outras áreas de desova do Caribe (Bjorndal *et al.* 2005, Bass *et al.* 2006). Segundo Encalada *et al.* (1996), precursores dos haplótipos CM-A5, CM-A6 e CM-A7 podem ter colonizado a costa nordeste da América do Sul (como o Suriname e outras colônias das Guianas).

Fig. 14: Mapa do perfil genético dos sítios de desova do Oceano Atlântico e mar Mediterrâneo. Apenas os haplótipos compartilhados mais frequentes estão demonstrados.

A figura 14 também permite observar que não há um gradiente genético entre os perfis do Atlântico Norte para o Atlântico Sul: observa-se nesta região a quase ausência de perfis “intermediários”, sugerindo haver poucas interações entre os grupos.

As diversidades haplotípica e nucleotídica encontradas na Guiana Francesa e em Guadalupe apresentaram resultados comparáveis à de outras áreas de desova do Oceano Atlântico, especialmente as localizadas no Caribe e Atlântico Sul.

A utilização de sequências longas nas colônias reprodutoras demonstrou uma partição do haplótipo CM-A5 (identificado nas sequências curtas) em CMA-5.1 e CMA-5.2 em Guadalupe, como já encontrado por Shamblin *et al.* (2012a) em outras colônias reprodutoras do Caribe. No estudo mencionado, os autores, por meio de sequências mitogenômicas de tartaruga-verde, encontraram perfis genéticos distintos em colônias do Caribe que tipicamente não apresentam estrutura evidente com sequências menores (Suriname e Ilhas Aves, por exemplo). O haplótipo longo definido como CMA-5.1 foi encontrado em todas as áreas amostradas, embora apenas no Suriname este haplótipo estivesse fixado. Situação semelhante foi encontrada na Guiana Francesa onde, ao se identificar os haplótipos longos, apenas CMA-5.1 foi identificado. Da mesma maneira, os haplótipos CMA-5.1 e CMA-5.2 foram encontrados nas Ilhas Aves, como também observado em Guadalupe. Estes dados, apesar do número reduzido, reforçam a importância de se utilizar sequências mais longas nas análises, para aumentar a resolução da estrutura e origens de tartarugas-verdes. Estudos com outras espécies de tartarugas com sequências longas apresentaram resultados e conclusões semelhantes (Vargas *et al.* 2008, Shamblin *et al.* 2012b, Dutton *et al.* 2013).

Estudos de genética de populações de animais marinhos enfatizam que a principal amostragem deve ser realizada em locais de reprodução e nascimento, ou o mais próximo possível geograficamente, visto que estas amostras não estão sujeitas aos estágios dispersivos da história de vida destes animais, que podem confundir as análises de genética de populações (National Research Council 2010). O conhecimento da extensão da estruturação de colônias, tanto em escalas temporais como espaciais, pode fornecer uma compreensão maior dos mecanismos de fidelidade ao local de nascimento, além de ser importante para programas de conservação que buscam a manutenção da diversidade genética (Bjorndal *et al.* 2005).

Guiana Francesa e Guadalupe mostraram-se independentes de todas as áreas de desova já amostradas no Atlântico e Mediterrâneo, exceto entre si ($P=1,000$) e entre ambas e Ilhas Aves/Suriname ($P=1,000$). A ausência de diferenciação entre algumas colônias pode indicar a presença de fluxo gênico entre pares de populações, ou ser um resultado de isolamento recente (Encalada *et al.*

1996). O pequeno número de haplótipos presentes nas áreas de desova pode indicar uma origem recente das linhagens de tartarugas-verdes no oceano Atlântico (Formia *et al.* 2006); assim como também ser um reflexo da baixa taxa de evolução do DNA mitocondrial nestes animais, cerca de 8 vezes menor quando comparado a outras linhagens de animais (Awise *et al.* 1992).

Estes primeiros dados podem ser úteis no que se refere ao conhecimento das áreas de desova e de alimentação para tartarugas-verdes no Oceano Atlântico, e permitirão uma maior resolução para as análises de estoque misto e o entendimento da conectividade entre essas diferentes áreas utilizadas.

ORIGEM DE INDIVÍDUOS EM ÁREAS DE ALIMENTAÇÃO

Muitos animais passam fases distintas de suas vidas em áreas separadas geograficamente, tanto migrando sazonalmente (aves de áreas tropicais ou temperadas, borboletas monarcas) como se movendo por mudanças ontogenéticas entre áreas de alimentação ou entre áreas de alimentação e de reprodução, com os adultos retornando ao local natal para reproduzir (salmão, tartarugas marinhas, baleias) (Bolker *et al.* 2007).

A hipótese do estoque misto para SFI foi confirmada pelos testes exatos de diferenciação, ϕ_{st} AMOVA e análises de qui-quadrado. As principais colônias que contribuem para o perfil genético de SFI, segundo as análises de estoque misto, são Ilha Ascensão, Guiana Francesa e Guiné Bissau (figura 15).

As análises de estoque misto baseiam-se no uso de modelos matemáticos para estimar as contribuições de diferentes colônias para uma área de alimentação (Okuyama & Bolker 2005, Bolker *et al.* 2007), entretanto, certas limitações impedem uma maior resolução destas análises, como a falta de diferenciação de algumas colônias, presença de haplótipos órfãos e impossibilidade de todas as áreas de desova estarem amostradas – uma violação do método (Bowen & Karl 2007, National Research Council 2010). Tais limitações influenciam nos resultados, com a presença de intervalos de confiança muito grandes. Esse padrão foi encontrado tanto nas análises “*many-to-one*” e “*many-to-many*”.

Fig. 15: Principais colônias que possivelmente contribuem para a composição genética de SFI. Os haplótipos mais frequentes estão discriminados pelas cores.

Em *many-to-one*, o resultado da análise que considerava a informação do número de fêmeas de cada sítio de reprodução ($m2o_2$) apresentou intervalos de confiança menores que a $m2o_1$, que não analisava o tamanho das colônias como priori. Este é um resultado esperado, visto que o acréscimo de variáveis ecológicas (no caso, número de fêmeas) pode tornar a análise mais realista, e tal variável já foi considerada importante para o estoque misto (Lahanas *et al.* 1998). Da mesma maneira, as análises de *many-to-many* também apresentaram grandes intervalos de confiança. A variação no intervalo de confiança pode explicar as diferenças na porcentagem de contribuição de cada colônia: Ilha Ascensão ($m2o=64\%$, $m2m=25\%$), Guiana Francesa ($m2o=21\%$, $m2m=17\%$) e Guiné Bissau ($m2o=11\%$, $m2m=36\%$).

Ainda em relação às análises de *many-to-many*, os resultados oscilaram pouco nas diferentes combinações utilizadas, conforme comparado na tabela 13. A análise de $m2m_1$ considerou todas as áreas de desova estudadas no Atlântico e

Mediterrâneo; já m2m₂ excluiu o Chipre como potencial contribuidor, dado a sua composição haplotípica não ser compartilhada com a maioria das áreas de alimentação do Oceano Atlântico. Em m2m₃, a exclusão de Guiné Bissau das análises aumentou muito a contribuição de Ilha Ascensão e Guiana Francesa para SFI, corroborando estudos anteriores que mostraram uma grande contribuição de Ascensão para a costa brasileira (Naro-Maciel *et al.* 2007, Proietti *et al.* 2012, Naro-Maciel *et al.* 2012). Finalmente, a inclusão, em m2m₄, de uma área de alimentação hipotética tornou os resultados um pouco mais refinados, com uma maior contribuição de Ilha Ascensão, mas ainda menor em relação à Guiné Bissau. A inclusão de uma área de alimentação hipotética teve como objetivo testar a hipótese de que Guiné Bissau seja uma área de desova conectada a uma possível área de alimentação local, com a frequência haplotípica fixada em CM-A8, como sugerido por Godley *et al.* (2010) e Naro-Maciel *et al.* (2012). Para os resultados deste estudo, a inclusão de uma área de alimentação hipotética contribuiu pouco para o perfil genético de SFI, e as origens destes indivíduos.

Tabela 13: Comparação da contribuição relativa das principais áreas de desova para SFI entre as quatro análises de *many-to-many*.

	AI	GB	GF
m2m₁	25%	36%	17%
m2m₂	23%	39%	15%
m2m₃	53%	-	24%
m2m₄	27%	34%	19%

De maneira geral, os resultados das análises mostram-se consistentes, com exceção da Ilha Ascensão e Guiné Bissau; nestas colônias, os intervalos de confiança são maiores. Por se tratar de uma análise integrada com outros estudos, é necessário que se aumentem as resoluções das áreas de desova já descritas para tartaruga-verde, especialmente no que diz respeito às colônias de Ascensão e Guiné Bissau (Naro-Maciel *et al.* 2012). Esse tipo de cooperação já tem sido realizado pela rede ASO (disponível em <http://www.tortugasaso.org/>), uma rede de especialistas do Brasil, Uruguai e Argentina que tem o intuito de fornecer e padronizar informações sobre a biologia e conservação de tartarugas marinhas, já

que a região é conhecida por ser habitat de alimentação, desenvolvimento e corredor migratório de 5 das 7 espécies de tartarugas marinhas existentes atualmente (Fallabrino *et al.* 2004, Fallabrino *et al.* 2010).

Apesar da falta de robustez em alguns dos resultados, os estudos de marcação e recaptura auxiliam na interpretação dos dados gerados pelas análises genéticas (Carr 1975, Pritchard 1976); sabe-se, por exemplo, que apesar da baixa porcentagem de contribuição da Ilha Ascensão para SFI demonstrada nas análises de *many-to-many*, esta é uma das colônias mais importantes para as áreas de alimentação do Atlântico Sul (Naro-Maciel *et al.* 2007, Proietti *et al.* 2009, Naro-Maciel *et al.* 2012, Proietti *et al.* 2012, Prosdocimi *et al.* 2012).

Embora as análises de estoque misto apresentem grandes intervalos de confiança, os resultados devem ser interpretados de maneira qualitativa como já sugerido por Bowen & Karl (2007). As principais colônias identificadas no estudo bem como SFI compreendem três RMUs identificadas para *Chelonia mydas*: centro do Atlântico, sul do Caribe e sudoeste do Atlântico (Wallace *et al.* 2010). Essas RMUs foram determinadas a partir de dados de telemetria, genética, marcação e recaptura; e são úteis para definir a importância geográfica de algumas áreas para populações de tartarugas marinhas, em termos de presença, densidade e riqueza.

As análises de estoque misto podem revelar as conexões demográficas entre populações reprodutoras regionais e em áreas de alimentação, e indicar quais destas populações estão em risco devido a distúrbios no habitat e captura incidental (National Research Council 2010).

As figuras 14 (que sugere poucas interações entre áreas de desova) e 15 (que apresenta as contribuições genéticas de cada área de desova para uma área de alimentação) destacam a dificuldade em se definir um padrão genético claro em tartarugas marinhas, que permanece dependente das etapas de vida amostradas. Além disso, ressaltam a necessidade de se considerar diferentes etapas, como adultos em áreas de desova, juvenis e adultos em áreas de alimentação e desenvolvimento, para uma visão relevante sobre o tema. Os resultados encontrados neste estudo corroboram por meio de dados genéticos a

conectividade entre SFI e colônias do Atlântico e Caribe, e sua importância para populações de tartarugas-verdes que habitam o Oceano Atlântico.

CAPÍTULO 2. Diversidade, estrutura e história demográfica de *Chelonia mydas* no oeste do Oceano Atlântico, com base em marcadores microssatélites

2.1 ABSTRACT

Sea turtles are reptiles with a long lifespan that undertake wide-ranging migrations through geographically distinct habitats. They spend most of their life in the water, and much information regarding the ecology and behavior of the species are restricted to the observation of hatchlings and nesting females. The green sea turtle (*Chelonia mydas*) is an endangered herbivore susceptible to population declines due to many causes of mortality, such as incidental capture on fisheries and habitat degradation. Molecular methods have been used to study genetic structure and population dynamics of these animals. So, the objective of this study is to investigate the genetic diversity, population structure and demographic history of *C. mydas* sampled at Central (French Guiana, n=126 and Guadeloupe, n=49) and South Atlantic (Brazil, n=50), using 10 microsatellite loci. The genetic diversity is similar to others obtained in sea turtles studies based on microsatellites. The results revealed that all the three populations derived from two ancestral stocks. The populations present genetic structure, even with migrants among populations, especially from French Guiana to Brazil and to Guadeloupe. It was not observed an important migration flow on the opposite direction, suggesting there are other ecological traits that may influence the distribution and migration of these animals. The results exposed an important population decline on the three populations sampled. Marine turtles are individuals that comprise different habitats and face different anthropogenic threats: management actions should elucidate which populations are in danger of extinction and which are not. The connectivity amongst the sites sampled and their population declines reinforces the importance of these populations to the Atlantic Ocean demographic scenario.

2.2 RESUMO

As tartarugas marinhas são répteis com longo tempo de vida que realizam extensas migrações entre habitats distintos geograficamente. Elas permanecem a maior parte de suas vidas na água, e muitas das informações a respeito da ecologia e comportamento das espécies estão restritas às observações de filhotes e de fêmeas desovando. A tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) é um herbívoro ameaçado de extinção, suscetível a declínios populacionais devido a várias causas de mortalidade, como pesca incidental e degradação do habitat. Os métodos moleculares têm sido utilizados para estudar estrutura genética e dinâmica populacional destes animais. Portanto, o objetivo deste estudo é investigar a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica de *C. mydas* amostradas no Atlântico Central (Guiana Francesa, n=126 e Guadalupe, n=49) e Sul (Brasil, n=50), usando 10 loci de microssatélites. A diversidade genética encontrada é similar a de outros estudos de tartarugas marinhas que utilizaram microssatélites em suas análises. Os resultados encontrados revelaram que as três populações descendem de duas populações ancestrais. As populações são estruturadas entre si, apesar de haver um fluxo de migrantes entre elas, especialmente da Guiana Francesa para o Brasil e para Guadalupe. Não foi observado um fluxo de migrantes importante no sentido contrário, sugerindo haver fatores ecológicos que influenciam a distribuição e migração destes animais. Os resultados mostraram um declínio populacional importante nas três populações analisadas. Tartarugas marinhas são indivíduos que vivem em diferentes habitats e estão sujeitas a diferentes níveis de ameaças antrópicas: decisões de manejo deveriam elucidar quais populações estão bem, e quais estão em risco de extinção. A conectividade entre as áreas amostradas e declínio populacional nestes locais reforçam a importância dessas populações para o cenário demográfico no Oceano Atlântico.

2.3 INTRODUÇÃO

Demografia é um conceito que se refere a parâmetros ou taxas vitais de uma população, como reprodução, sobrevivência, dispersão e mortalidade; essas informações são fundamentais para interpretar tendências de abundância ao longo do tempo (National Research Council 2010). Enquanto a exploração e perda de habitat têm sido os principais motivos de declínios populacionais, a variação climática tem um papel importante em flutuações populacionais em longo prazo (Lotze & Worm 2009).

Um gargalo (ou *bottleneck*) é uma redução acentuada no tamanho populacional, que pode ser a curto ou longo prazo (Frankham *et al.* 2009). Entender os efeitos de gargalos populacionais na variação genética tem se tornado importante para estudos de genética de populações e biologia da conservação (Cornuet & Luikart 1996), dado que estes eventos podem levar a uma redução da variabilidade genética, perda de alelos raros e aumento dos níveis de endocruzamento (Hedrick & Miller 1992, Lynch *et al.* 1995, Frankham *et al.* 2009).

Entretanto, detectar e medir os impactos de tais mudanças é difícil principalmente pela ausência de conhecimento dos padrões históricos de abundância e níveis de variação genética (Cornuet & Luikart 1996, Hoffman *et al.* 2011). Devido a estas dificuldades, métodos que detectem *bottlenecks* na ausência de dados históricos são bastante úteis (Cornuet & Luikart 1996).

O nível de diversidade genética de uma população pode proporcionar uma estimativa sobre seu tamanho médio ao longo do tempo evolutivo (Lotze & Worm 2009): o excesso de heterozigosidade em uma população, quando comparado ao esperado em casos de equilíbrio, pode ser usado para testar a ocorrência de um *bottleneck* (Cornuet & Luikart 1996, Luikart *et al.* 1998).

Avaliando a frequência da distribuição do comprimento das variantes alélicas dos microssatélites sob uma perspectiva genealógica, é possível fazer inferências sobre as mudanças históricas no tamanho populacional efetivo (Storz & Beaumont 2002). Uma abordagem típica para inferir eventos demográficos a partir de loci neutros, como os microssatélites, utiliza métodos de verossimilhança

combinados com simulações de Monte Carlo (Storz & Beaumont 2002, Girod *et al.* 2011). Estes métodos baseiam-se na probabilidade de se observar o número de alelos ou sítios de DNA polimórficos em uma amostra, dado um modelo demográfico e mutacional (Girod *et al.* 2011).

Seis das sete espécies de tartarugas marinhas estão classificadas na lista das espécies ameaçadas de extinção (IUCN 2012). A biologia singular destes animais inclui uma história de vida complexa, caracterizada por fases distintas, cada uma com habitats e distribuição geográfica únicos (Reece *et al.* 2005). O manejo de tartarugas marinhas, de maneira geral, tem sido focado na redução das causas de mortalidade em todos os estágios de vida (National Research Council 2010).

A tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) apresenta declínio de suas subpopulações na maioria das bases oceânicas, como resultado da sobre-exploração de ovos e fêmeas em áreas de desova, juvenis e adultos em áreas de alimentação e mortalidade por captura incidental e degradação do habitat (Seminoff 2004). Inferir a história demográfica é uma questão central em biologia evolutiva e ecologia aplicada (Girod *et al.* 2011), especialmente quando se trata de espécies ameaçadas de extinção (Frankham *et al.* 2009).

Portanto, os objetivos deste estudo incluem avaliar a diversidade genética de *Chelonia mydas* em escala temporal, avaliando estrutura e tamanho populacional atual e as oscilações demográficas passadas de populações encontradas no Atlântico Oeste.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 ÁREAS DE ESTUDO

O estudo foi conduzido em três locais distintos do Oceano Atlântico: em São Francisco de Itabapoana (abreviado como SFI), localizado no litoral norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil; na Guiana Francesa (GF), América do Sul, em dois pontos distintos, Cayenne e Awala-Yalimapo; e em Guadalupe (GD), nas Antilhas

Francesas (fig. 1). Guiana Francesa e Guadalupe caracterizam-se por serem sítios de desova de *C. mydas*, enquanto SFI é uma área de alimentação para a espécie.

Fig. 1: Localização das áreas de estudo.

2.4.2 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES

A extração do DNA foi realizada a partir de aproximadamente 3 mm de tecido digerido com 15 μ L de proteinase K (10 mg/mL) e 400 μ L de tampão salino a 65°C durante uma noite (Sambrook *et al.* 2001). A extração foi realizada seguindo os protocolos de extração salina (Aljanabi & Martinez 1997) ou o de fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.* 1989).

No total, 10 loci de microssatélites já desenvolvidos para tartarugas marinhas foram utilizados nas análises. São eles: Nigra200 (Dutton 1995), Cm3, Cm58, Cm72, Cc117 (Fitzsimmons *et al.* 1995), Cc7 (Fitzsimmons 1998), OR2, OR7 (Aggarwal *et al.* 2004), LB141 (Roden & Dutton 2011) e Derm5 (Alstad *et al.* 2011).

As reações de PCR continham cerca de 10ng de DNA, 0,5U de *Taq* polymerase (BioLine®), 200 µM de dNTPs, buffer Tris-KCl 1X, 1,0–3,0 mM MgCl₂, e 1,0 µM de cada primer, em um volume final de 10µL. O perfil de termorregulação utilizado seguiu os autores citados para cada microssatélite. Os produtos de PCR foram genotipados em um sequenciador automático Beckman® Coulter.

2.4.3 ANÁLISE DOS DADOS

O programa Genepop 4.1.1 (Rousset 2008) foi utilizado para testar a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre pares de loci. A presença de alelos nulos – quando mutações ocorrem nos locais dos *primers*, e alguns alelos podem não ser amplificados, resultando em falsos homozigotos – foi verificada por meio do programa Microchecker 2.2.3 (Oosterhaut *et al.* 2004).

O programa Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.* 2005) foi utilizado para verificar as índices de diversidade e diferenciação entre populações. O Fstat (Goudet 1995) também foi utilizado para calcular as estatísticas F (F_{ST} , F_{IS} , F_{IT}) e índices de diversidade. Análises no programa Structure 2.3 (Pritchard *et al.* 2000) foram conduzidas para a identificação do número de populações ancestrais que formaram os estoques populacionais atuais. O método baseia-se em uma abordagem Bayesiana para inferir estrutura populacional a partir de dados de genótipos de marcadores não ligados: assume-se um modelo em que há K populações, e os indivíduos de uma amostra são atribuídos probabilisticamente a populações. Foram testados $K=1$ a $K=8$, utilizando 1.000.000 de iterações, sendo 250.000 descartadas. Os resultados são estimados pela probabilidade posterior dos dados para um valor de K; a probabilidade posterior representa a probabilidade de que a hipótese $Pr(X|K)$ seja verdadeira. O fator de Bayes é

utilizado para selecionar o modelo que melhor se ajusta à amostra; dado dois modelos, M_1 e M_2 , e a probabilidade destes modelos, D_1 e D_2 , $Pr(K=2)$ é calculado por:

$$K = \frac{Pr(D|M_2)}{Pr(D|M_1) + Pr(D|M_2)}$$

O resultado mais alto é o correspondente ao número “real” de populações dos dados analisados.

Testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg, excesso e déficit de heterozigosidade foram computados com o auxílio do programa Genepop 4.1.1, utilizando cadeias de Markov como algoritmo para as análises.

O programa Bottleneck (Cornuet & Luikart 1996) foi utilizado para verificar um sinal de gargalo nas populações, usando como critério o excesso de heterozigosidade. O programa oferece três testes distintos para verificar se a população apresenta um número significativo de loci com excesso de heterozigosidade: o teste de sinal (do inglês, *sign test*), baseado na diferença entre a heterozigosidade esperada e observada em todos os loci em uma população; o teste de diferenças padronizadas (do inglês, *standardized differences test*), que verifica se a média das diferenças observadas e esperadas são significativamente diferentes de zero; e o teste de Wilcoxon (do inglês, *Wilcoxon sign-rank test*), capaz de detectar diferenças entre populações que sofreram e as que não sofreram um evento de *bottleneck* (Cornuet & Luikart 1996, Luikart *et al.* 1998).

Análises no programa Migrate 3.2.1 (Beerli & Palczewski 2010) foram conduzidas para estimar taxas de migração das populações, utilizando dados genéticos através de uma abordagem bayesiana. O programa busca encontrar parâmetros de migração e sua probabilidade de distribuição dado que $Prob(P|D)$. Um dos parâmetros utilizados é $P=(M)$; em que M representa as taxas de imigração calibradas com taxas de mutação. A taxa de migração efetiva M é a taxa de imigração m dividida pela taxa de mutação μ , uma medida do quão importante é a imigração sobre a mutação, para trazer novas variantes à população.

O programa Msvr 0.4 (Beaumont 1999) foi utilizado para explorar a história demográfica mais provável das populações, baseada em simulações de Monte Carlo em Cadeia de Markov (MCMC): o programa é capaz de detectar oscilações no tamanho populacional ao longo do tempo. A taxa de mutação para *Chelonia mydas* utilizada como priori nas análises iniciais foi entre $5,7 \times 10^{-4}$ e $9,6 \times 10^{-3}$, seguindo Fitzsimmons (1998). O tempo de geração para *Chelonia mydas* varia entre 35,5 anos e 49,5 anos (Seminoff 2004), e nesse estudo foi utilizado 40 anos como média. Três análises independentes foram conduzidas, cada uma contendo comprimento de cadeia de 1.000.000, amostrando a cada 1.000 e descarte de 250.000. Para cada população, as três análises foram combinadas com o LogCombiner; os resultados foram visualizados e sua convergência foi checada com o programa Tracer v.14 (Rambaut & Drummond 2007). O resultado é apresentado sob a forma de $\log_{10}(r)$: sendo N_0 o tamanho populacional atual e N_1 , o passado, $r=N_0/N_1$. Portanto, valores de $r>1$ indicam uma população em expansão; $r=1$; a população permaneceu estável ao longo do tempo; $r<1$, a população está em declínio populacional (Beaumont 1999).

Nos casos em que a população não tenha se mantido estável, o programa Msvr 1.3 (Storz & Beaumont 2002) foi utilizado para estimar tamanhos populacionais efetivos ancestrais e atuais, bem como o tempo desde que a população começou a declinar/expandir. Também nas análises do Msvr 1.3, para cada população foram realizadas três análises independentes, cada uma com 1.000.000 de tamanho de cadeia, amostragem a cada 1.000 e descarte de 250.000. Os arquivos foram combinados com o LogCombiner, e o resultado checado e visualizado pelo Tracer v.14 (Rambaut & Drummond 2007).

2.5 RESULTADOS

As análises basearam-se em amostras de 225 indivíduos, sendo 126 coletadas na Guiana Francesa (Cayenne $n=39$, Awala-Yalimapo $n=87$), 49 em Guadalupe e 50 no Brasil.

Os resultados do Microchecker não detectaram a presença de alelos nulos nas amostras analisadas para nenhum dos *loci*. Os dados provenientes do Genepop indicaram não haver desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci* em todas as populações ($P>0,05$), após correções de Bonferroni (tabela 1).

Tabela 1: Comparação entre pares de *loci* (valores de P após correção de Bonferroni), para verificação de desequilíbrio de ligação.

Locus	Cm3	Cm58	Cm72	Cc7	Cc117	Derm5	LB141	OR2	OR7	Nigra200
Cm3										
Cm58	0,60									
Cm72	0,86	0,70								
Cc7	0,55	0,30	0,11							
Cc117	0,70	0,98	0,56	0,95						
Derm5	0,45	0,51	1,00	0,02	0,64					
LB141	0,38	0,72	1,00	1,00	0,37	1,00				
OR2	0,81	1,00	1,00	0,91	0,91	0,98	0,98			
OR7	0,86	0,33	0,27	0,40	0,55	0,26	0,75	0,50		
Nigra200	0,97	0,18	1,00	0,51	0,28	0,52	0,45	0,70	0,65	

Inicialmente, os quatro locais de amostragem (Cayenne e Awala, Guiana Francesa; Guadalupe e Brasil) foram analisados para verificar a diferenciação destas populações com o uso de microssatélites. Os resultados apresentados pelo Arlequin indicaram não haver diferença significativa entre Cayenne e Awala ($P=0,07$), portanto, para análises posteriores, os dados de ambos os locais foram tratados como uma população, a da Guiana Francesa (tabela 2).

Todos os microssatélites apresentaram altos níveis de polimorfismo, variando de 7 a 40 alelos. O locus OR7 apresentou o menor número de alelos (GF=12, GD=7 e BR=13), e Cm72, o maior número de alelos (GF=40, GD=31 e BR=27) (tabela 3). A heterozigosidade esperada (H_o) foi menor para o locus Nigra200 (GF=0,59; GD=0,52 e BR=0,55), e maior para Cc117 (GF=0,85; GD=0,79 e BR=0,90) (tabela 4). Nenhuma das populações e nenhum dos loci analisados encontraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 2: Diferenciação entre pares de populações (F_{ST}), inferida com o uso de microssatélites. Valores significativos ($P < 0,05$) estão destacados em negrito.

	Cayenne	Awala	Guadalupe	Brasil
Cayenne				
Awala	0,00411			
Guadalupe	0,01382	0,01104		
Brasil	0,02548	0,02195	0,02387	

Tabela 3: Resultados obtidos de 10 microssatélites para amostras de *Chelonia mydas* na Guiana Francesa (GF), Guadalupe (GD) e Brasil (BR).

	Número de alelos			Riqueza alélica			Intervalo do tamanho dos alelos (pb)		
Locus	GF	GD	BR	GF	GD	BR	GF	GD	BR
Cm3	28	13	09	19,34	12,79	8,83	132-208	130-190	160-176
Cm72	40	31	27	31,15	31,00	26,53	200-310	230-308	220-302
Cm58	22	10	12	15,00	9,98	11,68	120-176	120-146	124-148
Derm5	17	16	13	14,00	15,79	13,00	220-304	228-316	236-296
OR2	24	21	17	20,41	20,83	16,87	144-198	150-198	150-196
LB141	24	23	20	19,90	22,56	19,80	130-186	122-186	132-180
Cc7	24	16	14	18,08	16,00	13,81	138-220	154-218	162-200
Cc117	23	18	17	18,36	17,87	16,63	220-268	218-286	230-290
OR7	12	07	13	10,00	7,00	12,35	202-246	220-232	200-274
Nigra200	27	10	13	18,17	9,96	12,87	120-192	156-186	136-182

Tabela 4: Índices de diversidade para *Chelonia mydas* inferidos por 10 microssatélites, em amostras localizadas na Guiana Francesa (GF), Guadalupe (GD) e Brasil (BR). *Ho* e *He* - heterozigosidades observada e esperada, respectivamente; F_{IS} - coeficiente de endocruzamento.

	Diversidade Genética			<i>Ho</i>			<i>He</i>			F_{IS}		
Locus	GF	GD	BR	GF	GD	BR	GF	GD	BR	GF	GD	BR
Cm3	0,83	0,70	0,49	0,71	0,60	0,36	0,83	0,70	0,49	0,14	0,14	0,26
Cm72	0,96	0,96	0,93	0,79	0,76	0,81	0,96	0,96	0,93	0,18	0,21	0,12
Cm58	0,79	0,73	0,78	0,75	0,79	0,70	0,79	0,73	0,77	0,05	-0,07	0,10
Derm5	0,88	0,87	0,90	0,76	0,81	0,85	0,88	0,87	0,90	0,14	0,07	0,06
OR2	0,93	0,93	0,91	0,81	0,85	0,73	0,93	0,93	0,90	0,13	0,08	0,19
LB141	0,93	0,94	0,94	0,78	0,80	0,82	0,93	0,94	0,94	0,16	0,15	0,13
Cc7	0,91	0,90	0,82	0,73	0,87	0,82	0,91	0,90	0,82	0,20	0,03	0,01
Cc117	0,91	0,89	0,90	0,85	0,79	0,90	0,91	0,88	0,90	0,06	0,11	0,00
OR7	0,78	0,74	0,75	0,60	0,47	0,76	0,78	0,74	0,75	0,23	0,37	-0,01
Nigra200	0,80	0,68	0,74	0,59	0,52	0,55	0,80	0,68	0,74	0,26	0,24	0,26

O programa Structure indicou $K=2$ (fig. 2) como o mais provável número de estoques ancestrais nas amostras analisadas (Ln da probabilidade estimada dos dados: -11083,7 para $K=1$; -11244,5 para $K=2$; -10941,6 para $K=3$; -10960,6 para $K=4$; -10977,8 para $K=5$; -11001,9 para $K=6$; -11013,9 para $K=7$; -11001,3 para $K=8$).

Fig. 2: Teste Bayesiano de atribuição de população, baseado em 10 loci de microsatélites, apresentando duas prováveis populações ancestrais em quatro pontos amostrados: 1- Cayenne, Guiana Francesa. 2- Awala, Guiana Francesa. 3- Guadalupe. 4- Brasil. Gráfico gerado pelo programa Structure.

Não foi detectado sinal de gargalo populacional em nenhuma das populações nos três testes analisados (*sign test*, *standardized differences test* e *Wilcoxon sign-rank test*), ao invés disso, observou-se deficiência de heterozigosidade. Indivíduos da Guiana Francesa foram responsáveis pelas maiores taxas de migração em direção a Guadalupe e o Brasil, e um fluxo inferior de migrantes destes dois países entre si, e para a Guiana Francesa (tabela 5).

Tabela 5: Parâmetros de taxas de migração (M) para as três populações: 1- Guiana Francesa, 2- Guadalupe e 3- Brasil. ($M_{x \rightarrow y}$ indica número de migrantes da população x para a população y).

Parâmetro	2,5%	Moda	97,5%	Média
$M_{2 \rightarrow 1}$	1,600	18,900	36,200	18,973
$M_{3 \rightarrow 1}$	0,000	13,900	30,200	13,898
$M_{1 \rightarrow 2}$	33,400	52,100	70,600	52,066
$M_{3 \rightarrow 2}$	3,600	20,900	38,200	20,905
$M_{1 \rightarrow 3}$	43,400	62,500	81,200	62,523
$M_{2 \rightarrow 3}$	6,600	24,100	41,200	24,070

O programa Msvar, ao contrário do Bottleneck, detectou declínio populacional nas três populações analisadas (Guiana Francesa: $\log_{10}(r)=-2,89$; Guadalupe: $\log_{10}(r)=-2,47$; Brasil: $\log_{10}(r)=-2,01$). Os resultados sugerem que o tamanho efetivo populacional atual é de cerca de 0,003%, 0,001% e 0,004% dos tamanhos ancestrais na Guiana Francesa, Guadalupe e Brasil, respectivamente. O declínio populacional provavelmente ocorreu há cerca de 100.000 anos.

2.6 DISCUSSÃO

Os microssatélites apresentaram índices de diversidade nas populações analisadas semelhantes a outros estudos que utilizaram parte dos loci deste trabalho (Fitzsimmons *et al.* 1995, Fitzsimmons *et al.* 1997b, Roberts *et al.* 2004, Naro-Maciel *et al.* 2007). As amostras provenientes da Guiana Francesa, Guadalupe e Brasil apresentaram baixa estrutura populacional ($F_{st}=0,015$), porém com valores de P significativos. Em um estudo global de *Chelonia mydas* utilizando DNA de cópia única, Karl *et al.* (1992) observaram baixa estrutura genética, quando comparada com dados mitocondriais. O mesmo padrão foi encontrado posteriormente, em um novo estudo com as mesmas amostras, desta vez utilizando quatro loci de microssatélites (Roberts *et al.* 2004). O fluxo gênico mediado por machos, modos distintos de herança, taxas de mutação diferentes e filopatria reduzida de machos podem ser explicações para as diferenças entre marcadores mitocôndrias e os nucleares (Baker *et al.* 1998). Fitzsimmons *et al.* (1997a, b) atribuíram este padrão à hipótese de acasalamento durante a migração entre áreas de alimentação para áreas de reprodução.

Apesar da baixa estrutura populacional e suas possíveis justificativas, há diferenças significativas entre as áreas amostradas. Quando os sítios de desova da Guiana Francesa e Guadalupe são comparados entre si, os dados de 10 microssatélites indicam haver estruturação genética ($F_{st}=0,011$; $P=0,000$), não detectada quando analisadas sequências da região controle do DNA mitocondrial ($\phi_{st}=-0,027$; $P=1,000$; capítulo 1). Esse resultado também foi encontrado para populações de tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriacea*) amostradas na mesma região: sequências de mtDNA não apresentaram estrutura significativa entre Cayenne e Awala-Yalimapo (ambas na Guiana Francesa), porém houve

diferenciação entre estes locais quando comparados 10 loci de microssatélites (Molfetti *et al.* 2013). Os microssatélites são considerados marcadores populacionais mais sensíveis para detectar estrutura populacional em escala fina (Goldstein & Pollock 1997), o que fica evidenciado no presente estudo.

Reconhecer populações reprodutivas independentes é imprescindível para o manejo adequado de tartarugas marinhas, uma vez que estas populações provavelmente não serão repostas caso sejam eliminadas (Dutton *et al.* 2013).

O fluxo gênico via macho entre áreas de alimentação e de desova sugerido pelas análises já foi identificado em dados de marcação e recaptura em que tartarugas marcadas na costa brasileira foram recapturadas no Atlântico Central (Marcovaldi *et al.* 2000, Lima & Troëng 2001). Essas informações corroboram a proposta de que as populações de tartarugas marinhas são compostas de várias RMU (Unidades de Manejo Regional, do inglês *Regional Management Units*), populações regionais independentes conectadas por fluxo gênico via machos (Wallace *et al.* 2010).

Vários fatores podem favorecer a composição genética das subpopulações de tartarugas marinhas, como o número de fêmeas reprodutoras, a distância geográfica entre áreas de alimentação e de desova e/ou correntes oceânicas (Lahanas *et al.* 1998, Bass & Witzell 2000, Luke *et al.* 2004). Estas informações, quando utilizadas em conjunto com os dados genéticos, permitem um resultado mais fidedigno nas análises.

A população da Guiana Francesa apresentou uma contribuição importante de migrantes para Guadalupe e Brasil; migrações no sentido contrário exibiram valores menores. É interessante notar a grande contribuição de migrantes da Guiana Francesa para as outras duas áreas de estudo, especialmente o Brasil: estes dados reforçam dados de mtDNA, que sugerem um fluxo significativo de indivíduos desse território ultramarino francês para a costa brasileira (análises de estoque misto, capítulo 1). Considerando os modos de herança, taxas de mutação e marcadores distintos, estes resultados são valiosos por reforçarem a conectividade entre a Guiana Francesa, uma área de desova no Atlântico Central, e Brasil, uma área de alimentação no Atlântico Sul.

A investigação da história demográfica recente de *C. mydas* baseou-se em três programas que utilizam inferência Bayesiana: Bottleneck, Migrate e Msvar.

Apesar do Bottleneck não ter detectado nenhum gargalo populacional, o Msvr detectou uma diminuição significativa nas três populações analisadas. Essa discrepância nos resultados pode estar relacionada a diferenças no poder das análises desses programas. Em comparações entre Bottleneck e Msvr, este último parece ser mais acurado estatisticamente para detectar expansões e/ou declínios populacionais utilizando microssatélites, independente do tempo e da intensidade do evento (Girod *et al.* 2011). O desempenho do Msvr em detectar história demográfica passada depende das informações contidas no conjunto de dados analisados, como a taxa de mutação fornecida, mas tem sido considerado um bom programa para analisar esse tipo de dado.

Declínios populacionais já foram detectados com marcadores moleculares em outras espécies, como baleias (Baker & Claphman 2004), tartaruga-oliva (Plot *et al.* 2012) e tartaruga-de-couro (Molfetti *et al.* 2013). Supõe-se que a maioria destes declínios tenha ocorrido no Holoceno, e parece ser um padrão para populações de grandes vertebrados no Atlântico Norte (Molfetti *et al.* 2013).

As populações podem responder a uma grande diminuição dos recursos alimentares e/ou ao colapso do sucesso reprodutivo (possivelmente devido à disponibilidade de sítios reprodutivos ou temperaturas adequadas, ou também a migrações populacionais em larga escala).

Além deste declínio populacional histórico, a maioria das subpopulações de tartarugas marinhas apresenta decréscimo populacional atualmente (Seminoff 2004).

Sob condições naturais, a tartaruga-verde adulta é um animal de grande capacidade reprodutiva, tendo os tubarões como único predador: dada a sua baixa mortalidade em adultos, e alta mortalidade nos primeiros anos de vida, é esperado que as populações de *C. mydas* não sejam capazes de se manterem viáveis quando os adultos são explorados, e a mortalidade dos filhotes é simultaneamente alta (Bjorndal 1980). Além das ameaças à população reprodutiva, a captura incidental em redes de pesca também é responsável pela mortalidade de um número considerável de indivíduos em áreas de alimentação (Lewison *et al.* 2004). Em um estudo sobre em captura incidental de tartarugas na costa brasileira, a maioria dos indivíduos de *C. mydas* eram juvenis ou subadultos (Sales *et al.* 2008), assim como os indivíduos capturados no Brasil neste estudo.

Para tartarugas marinhas, decisões de manejo para temas relativamente comuns, como redução de captura incidental e proteção de áreas de desova, necessitam de estudos sobre cada fase do ciclo de vida (Bowen *et al.* 2005), assim como informações a respeito do status de cada subpopulação que está sendo impactada (Seminoff & Shanker 2008). Um bom exemplo de ação regional é o caso da população de *C. mydas* do Havaí, formada por um único estoque, que quase foi dizimada devido à superexploração, e que começou a se recuperar na década de 1970, quando cessou a caça destes animais (Chaloupka & Balazs 2007).

Estudos de genética da conservação estiveram tradicionalmente associados à variação genética e depressão de endocruzamento; entretanto, com o avanço das técnicas moleculares, foi possível investigar outras questões importantes, como comportamento, demografia e aspectos da estrutura populacional espacial e temporal (Aulsebrook 1998, Schwartz *et al.* 2006). Espécies de tartarugas marinhas compreendem uma variedade de indivíduos e populações, que podem viver em habitats diferentes, sujeitos a diversas ameaças antrópicas e apresentar diferentes trajetórias de abundância (Seminoff & Shanker 2008).

Entender a ecologia espacial das tartarugas marinhas, identificar habitats de alimentação críticos assim como corredores migratórios são considerados prioritários na pesquisa desses animais, aliando genética, telemetria, interação com a pesca e dados de modelagem oceânica (Hamann *et al.* 2010).

Este estudo apresenta dados de estrutura populacional e história demográfica de *Chelonia mydas* em áreas de desova e alimentação não amostradas previamente, utilizando *loci* de microssatélites. Os dados reforçam a conectividade entre as populações, a exposição a ameaças que resultam em declínio populacional e a necessidade de que maior atenção seja dada aos locais amostrados.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

As tartarugas marinhas são pouco acessíveis para observações diretas de campo, devido às suas etapas de vida em habitats distintos (terrestre e marinho), ciclos de vida longos com maturidade tardia e por suas extensas migrações oceânicas (National Research Council 2010).

Assim como a maioria das espécies, a tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) apresenta estrutura populacional complexa, em que as populações reprodutoras são mistas em uma etapa de sua vida, e segregadas em outra (Bowen *et al.* 2005, Bowen & Karl 2007). Quando esses animais migram para áreas de alimentação compartilhadas, algumas populações reprodutoras podem estar mais vulneráveis do que outras a estressores comuns (National Research Council 2010).

A genética de populações é um campo de estudo crescente em biologia que utiliza abordagens de máxima verossimilhança e bayesiana (National Research Council 2010) para elucidar o comportamento, estrutura populacional e história demográfica atual e passada, dados estes relevantes para o entendimento de sua história de vida e para a conservação (Bowen & Witzell 1996, Avise 1998). Este estudo investigou diferentes estágios de vida (juvenil e adulto) de *Chelonia mydas*, utilizando a região controle do mtDNA e 10 *loci* de microssatélites, com o objetivo de obter um melhor entendimento da diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica de populações presentes no Atlântico Oeste.

As duas populações reprodutoras deste estudo, Guiana Francesa e Guadalupe, foram diferenciadas de todas as áreas de desova já descritas, exceto quando comparadas entre si com sequências de mtDNA. Também não houve estruturação entre ambas as áreas e as Ilhas Aves/Suriname, outras colônias próximas geograficamente (as distâncias entre as colônias variam entre cerca de 220 km e 1600 km). Este padrão, que contraria a ideia de independência reprodutiva, pode estar relacionado à proximidade geográfica entre as colônias, à baixa resolução do mtDNA relacionado a baixas taxas de mutação, ou ainda ao tamanho das sequências de DNA utilizadas. Um estudo conduzido em colônias na região do Caribe, com sequências mitogenômicas, apresentou diferenças entre áreas que normalmente não são diferenciadas (Shamblin *et al.* 2012a).

É importante notar que, para questões comparativas, foram consideradas sequências de cerca de 490pb disponíveis nos outros estudos já publicados em áreas de desova. Dado o exemplo citado acima, a dificuldade em se amostrar áreas de desova em todas as bases oceânicas e a necessidade de estudos padronizados para permitir tais comparações, é necessário aumentar o tamanho das sequências analisadas nas populações reprodutoras, para melhorar a resolução da estrutura genética e diversidade destes locais; assim como acrescentar a quantidade de áreas de desova amostradas, para melhorar as informações sobre dispersão e questões como a dos haplótipos órfãos.

Pesquisas com outras espécies de tartarugas marinhas demonstraram que a utilização de sequências mais longas forneceu informações mais acuradas sobre filogeografia e análises de estoque misto (Vargas *et al.* 2008, Shamblin *et al.* 2012b, Molfetti *et al.* 2013). Este estudo apresenta dois sítios de desova não descritos previamente, e contribui ao fornecer novos dados para a genética de populações de *Chelonia mydas*, além de prover dados de sequências de mtDNA mais longas, com o intuito de melhorar as análises de estoque misto, estrutura populacional e diversidade genética.

A população de juvenis amostrada em São Francisco de Itabapoana (abreviado como SFI) no estado do Rio de Janeiro apresentou um perfil genético (considerando sequências de mtDNA) bastante similar às outras áreas de alimentação já descritas na costa brasileira, e análises de estoque misto confirmaram a hipótese de que os indivíduos presentes nesse local são provenientes de origens distintas. SFI, em análises globais, apresentou diferenças de todas as áreas de alimentação consideradas. Além disso, foram encontrados dois haplótipos ainda não descritos na região. Em análises par a par, não houve estrutura significativa entre áreas de alimentação do Atlântico Sul (Bahia, Espírito Santo, Ubatuba, Arvoredo e Argentina), região conhecida por compor um corredor marinho para espécies de tartarugas marinhas (Fallabrino *et al.* 2010).

Análises de estoque misto consideraram os sítios reprodutivos de Ilha Ascensão, Guiné Bissau e Guiana Francesa como os locais que mais contribuíram para a composição e diversidade genética de indivíduos amostrados em SFI. A contribuição da Ilha Ascensão para a costa brasileira está bastante evidenciada em

estudos de mtDNA e satélites nucleares (Carr 1975, Bowen *et al.* 1992). Os dados da Guiana Francesa foram utilizados pela primeira vez em análises de estoque misto, mas sua grande contribuição para SFI pode ser esperada, visto que colônias do Suriname (que faz divisa com a Guiana Francesa) apresentaram altas contribuições para áreas de alimentação na costa brasileira em outros estudos publicados (Carr 1975, Naro-Maciel *et al.* 2007, Naro-Maciel *et al.* 2012, Proietti *et al.* 2012). Além disso, análises com microsatélites evidenciaram um movimento migratório importante da Guiana Francesa em direção à SFI. Apesar do grande intervalo de confiança típico das análises de estoque misto, a congruência dos resultados entre Guiana Francesa e Brasil com dados de mtDNA e microsatélites reforça os resultados obtidos, enfatizando a conectividade importante entre esses dois locais.

O resultado mais controverso na análise de estoque misto é a grande contribuição de Guiné Bissau, sítio reprodutivo com o haplótipo CM-A8 fixo em sua população (Encalada *et al.* 1996, Formia *et al.* 2006); mesmo haplótipo encontrado em grande frequência na Ilha Ascensão (Encalada *et al.* 1996, Formia *et al.* 2006) e no Atlântico Sul (Naro-Maciel *et al.* 2007, Naro-Maciel *et al.* 2012, Proietti *et al.* 2012, Prosdocimi *et al.* 2012). Em 2010, Godley *et al.* publicaram um estudo integrado de telemetria, modelagem de correntes oceânicas e genética de *C. mydas* na ilha de Poilão, Guiné Bissau. Apesar do número baixo de indivíduos rastreados por telemetria, foi possível observar que os sítios de alimentação desta população possivelmente estariam limitados ao sudoeste e leste do Oceano Atlântico; a modelagem das correntes oceânicas sugeriu que a maioria dos indivíduos manteve-se no Golfo da Guiné; os dados genéticos corroboraram os dados de modelagem, evidenciando que grande parte das tartarugas-verdes de Guiné Bissau são encontradas no leste do Atlântico.

Godley *et al.* (2010) também observaram que a composição haplotípica de áreas de alimentação de todo o oeste africano e norte de Guiné Bissau ainda não é conhecida; assim como as áreas de alimentação, algumas áreas de desova, tais como Angola ou Congo permanecem sem estudos publicados (Naro-Maciel *et al.* 2012).

As análises de estoque misto dependem, em grande parte, da amostragem adequada de áreas de alimentação e de desova, garantindo que virtualmente todas as áreas mapeadas sejam amostradas. Entender o grau de conectividade migratória entre áreas reprodutoras e não reprodutoras ainda é um desafio, e em se tratando de animais tão dispersos quanto tartarugas marinhas, é necessária a colaboração de diversos grupos de pesquisa para melhor entender a dinâmica desses animais. Este estudo teve como um dos objetivos analisar duas áreas de desova e outra de alimentação ainda não descritas com base em dados da região controle do mtDNA, acrescentando estas informações às publicadas anteriormente, de modo a contribuir para a pesquisa deste réptil ameaçado de extinção.

Visando entender a conectividade e dinâmica populacional em menores escalas geográfico-temporais, as três populações analisadas neste estudo também foram genotipadas para 10 *loci* de microssatélites, a fim de verificar a diversidade genética, fluxo gênico, estrutura populacional e flutuações no tamanho populacional.

Guadalupe e Guiana Francesa apresentaram estrutura genética entre si quando considerados os microssatélites, resultado não observado nas análises de mtDNA, reforçando a importância desses marcadores nucleares para estudos de estrutura populacional em escala fina. Apesar de haver um fluxo gênico entre os três locais estudados, há estrutura genética significativa. O fluxo de migrantes se dá principalmente de indivíduos da Guiana Francesa em direção ao Brasil e Guadalupe, e um fluxo menor na direção oposta.

Os resultados sugerem que as populações sofreram flutuações ao longo do tempo, apresentando declínio populacional severo, estimado em cerca de 100.000 anos atrás. As populações podem ter respondido a uma escassez nos recursos alimentares, e/ou a condições pouco favoráveis à reprodução, como temperaturas impróprias e pouca disponibilidade de locais adequados, ou ainda com migrações de longa escala.

Áreas de desova podem ser efêmeras ao longo do tempo evolutivo, surgindo e desaparecendo com eventos como vulcões, ou com mudanças em seu meio (mudanças climáticas, presença de predadores, competição para locais de desova,

ou doença) (Bowen *et al.* 1989). A distribuição das tartarugas-verdes está restrita a ambientes tropicais e subtropicais; durante a época das glaciações, o avanço das camadas de gelo e consequente aumento do nível do mar provavelmente reduziu a distribuição das áreas de alimentação e de desova para latitudes mais estreitas (Encalada *et al.* 1996).

A tartaruga-verde está ameaçada de extinção atualmente (IUCN 2012), com populações regionais em declínio (Seminoff 2004). Sabe-se que além de mudanças ambientais, esses animais estão sujeitos a ações humanas: relatos da época das grandes navegações de Colombo no Atlântico Oeste afirmam que as tartarugas-verdes eram tão abundantes que colidiam constantemente com os barcos; nos últimos cinco séculos, o número de adultos reduziu cerca de 99% no Caribe (Bowen & Avise 1996). Algumas subpopulações já apresentaram algum tipo de recuperação, como as localizadas na Costa Rica (Troëng & Rankin 2005) e no Havai (Chaloupka & Balazs 2007), graças a programas de conservação em longo prazo.

Este estudo apresentou dados de três locais utilizados como áreas de desova e alimentação pelas tartarugas-verdes no Atlântico Oeste, conectados entre si por fluxo gênico. Devido a esta conectividade, faz-se necessário que medidas de diminuição de impacto sejam tomadas não só nas áreas que visitam, bem como nos corredores migratórios.

RESUMO

As tartarugas marinhas são répteis de vida longa que realizam extensas migrações entre áreas de alimentação e desova, resultando em estágios sucessivos de mistura e isolamento de estoques genéticos, espacial e temporalmente. A tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) está ameaçada de extinção, e é fundamental entender sua dinâmica populacional e distribuição para o manejo e conservação da espécie. O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade genética, estrutura populacional, origens dos indivíduos e história demográfica de *C. mydas* em três locais do Oceano Atlântico (estado do Rio de Janeiro, Brasil – área de alimentação; Guadalupe e Guiana Francesa – áreas de desova), com base em sequências da região controle do DNA mitocondrial (mtDNA) e 10 loci de microssatélites. As análises de mtDNA demonstraram que a área amostrada no Brasil tem perfil genético semelhante às outras áreas de alimentação da costa brasileira. De maneira semelhante, o perfil genético das duas áreas de desova é bastante similar ao de outros sítios reprodutivos na região do Caribe. As análises de estoque misto revelaram que os indivíduos juvenis no Brasil são provenientes principalmente da Ilha Ascensão, Guiana Francesa e Guiné Bissau. Os microssatélites detectaram estrutura genética entre as três populações, apesar de haver um fluxo de migrantes entre elas, especialmente de indivíduos da Guiana Francesa em direção ao Brasil e Guadalupe. Guiana Francesa, Guadalupe e Brasil apresentaram declínio populacional severo, detectado pelos microssatélites. Apesar da distribuição global, as populações de tartarugas-verdes estão sujeitas a diferentes pressões nos habitats que ocupam, e é importante entender quais populações estão ameaçadas. Este estudo enfatiza a importância da conectividade entre áreas de alimentação e desova que podem estar amplamente distribuídas de acordo com oportunidades ou restrições ecológicas, adicionando informações a respeito da dispersão e a dinâmica de tartarugas-verdes que frequentam o Oceano Atlântico.

ABSTRACT

Sea turtles are reptiles with a long lifespan that undertake wide-ranging migrations through feeding and nesting sites, resulting in successive stages of mixing and isolating genetic stocks, both spatially and temporally. The green sea turtle (*Chelonia mydas*) is threatened with extinction, and it is essential to understand its population dynamics and distribution in order to manage and preserve the species. The aim of this study was to analyze the genetic diversity, population structure, natal origins and demographic history of *C. mydas* in three sites in the Atlantic Ocean (Rio de Janeiro state, Brazil – feeding ground; Guadeloupe and French Guiana – nesting sites), based on sequences of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region and 10 microsatellites loci. The mtDNA analyses demonstrated that Brazilian samples have the same genetic profile of others collected in feeding grounds in the Brazilian coast. Similarly, the genetic profile of the nesting sites has resemblances to others in the Caribbean region. The mixed stock analyses revealed that most of the juveniles in Rio de Janeiro state come from Ascension Island, French Guiana and Guinea Bissau. Microsatellites detected genetic structure among the three populations, even with migration flows, especially in individuals from French Guiana to Brazil and Guadeloupe. French Guiana, Guadeloupe and Brazil presented a severe population decline, detected by the microsatellites analyses. Despite the worldwide distribution, green sea turtle populations undergo different pressures at the habitats they occupy, and it is important to understand which populations are threatened. This study emphasizes the importance of connecting nesting and feeding areas that can be widely distributed according to ecological opportunities or constraints, adding information on dispersion and population dynamics of green sea turtles on Atlantic Ocean.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Abreu-Grobois FA, Horrocks JA, Formia A, Leroux R, Velez-Zuazo X, Dutton P, Soares L, Meylan P, Browe D (2006) New mtDNA dloop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution capacity of mixed stock analyses. In: Book of Abstracts. Frick M, Panagopoulou A, Rees AF, Williams K (eds). 26th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. International Sea Turtle Society, Athens, Greece pp. 179
- Alacs EA, Janzen FJ, Scribner KT (2007) Genetic issues in freshwater turtle and tortoise conservation. *Chelonian Research Monographs* 4: 107-123
- Alvarado J, Murphy TM (1999) Nesting periodicity and internesting behavior. In: Research and management techniques for the conservation of sea turtles. Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Gobrois FA, Donnelly M (eds). IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication no. 4
- Avice JC (2007) *On Evolution*. The John Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, USA pp.186
- Avice JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3-15
- Avice JC, Bowen BW, Lamb T, Meylan AB, Bermingham E (1992) Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. *Molecular Biology and Evolution* 9(3): 457-473
- Baker CS, Lento GM, Palumbi SR (2000) Predicted decline of protected whales based on molecular genetic monitoring of Japanese and Korean markets. *Proceedings of the Royal Society B* 267: 1191-1199
- Bass AL (1999) Genetic analysis to elucidate the natural history and behavior of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Wider Caribbean: a review and re-analysis. *Chelonian Conservation and Biology* 3(2): 195-199
- Bass AL, Epperly SP, Braun-Mcneill J (2006) Green turtle (*Chelonia mydas*) foraging and nesting aggregations in the Caribbean and Atlantic: impact of currents and behavior on dispersal. *Journal of Heredity* 97 (4): 346-354
- Bass AL, Good DA, Bjorndal KA, Richardson JI, Hillis ZM, Horrocks JA, Bowen BW (1996) Testing models of female reproductive migratory behavior and population structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with mtDNA sequences. *Molecular Ecology* 5: 321-328
- Bass AL, Witzell WN (2000) Demographic composition of immature green turtles (*Chelonia mydas*) from the east central Florida coast: evidence from mtDNA markers. *Herpetologica* 56 (3): 357-367

- Bjorndal KA (1985) Nutritional ecology of sea turtles. *Copeia* 3: 736-751
- Bjorndal KA (1997) Foraging ecology and nutrition of sea turtles. In: The biology of sea turtles – vol. I. Lutz PL, Musick JA (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA pp. 432
- Bjorndal KA, Bolten AB (2008) Annual variation in source contributions to a mixed stock: implications for quantifying connectivity. *Molecular Ecology* 17: 2185-2193
- Bjorndal KA, Bolten AB, Moreira L, Bellini C, Marcovaldi MA (2006) Population structure and diversity of Brazilian green turtle rookeries based on mitochondrial DNA sequences. *Chelonian Conservation and Biology* 5 (2): 262-268
- Bjorndal KA, Bolten AB, Troëng S (2005) Population structure and genetic diversity in green turtles nesting at Tortuguero, Costa Rica, based on mitochondrial DNA control region sequences. *Marine Biology* 147: 1449-1457
- Blumenthal JM, Abreu-Gobrois FA, Austin TJ, Broderick AC, Bruford MW, Coyne MS, Ebanks-Petrie G, Formia A, Meylan PA, Meylan AB, Godley BJ (2009) Turtle groups or turtle soup: dispersal patterns of hawksbill turtles in the Caribbean. *Molecular Ecology* 18: 4841-4853
- Bolker B, Okuyama T, Bjorndal K, Bolten A (2003) Sea turtle stock estimation using genetic markers: accounting for sampling error of rare genotypes. *Ecological Applications* 13(3): 763-775
- Bolker BM, Okuyama T, Bjorndal KA, Bolten AB (2007) Incorporating multiple mixed stocks in mixed stock analysis: ‘many-to-many’ analyses. *Molecular Ecology* 16: 685-695
- Bolten AB, Bjorndal KA, Martins HR, Dellinger T, Biscoito MJ, Encalada SE, Bowen BW (1998) Transatlantic developmental migrations of loggerhead sea turtles demonstrated by mtDNA sequence analysis. *Ecological Applications* 8 (1): 1-7
- Bourjea B, Lapègue S, Gagnevin L, Broderick D, Mortimer JA, Ciccione S, Ross D, Taquet C, Grizel H (2007) Phylogeography of the green turtle, *Chelonia mydas*, in the Southwest Indian Ocean. *Molecular Ecology* 16 (1): 175-186
- Bowen B, Avise JC, Richardson JI, Meylan AB, Margaritoulis D, Hopkins-Murphy SR (1993b) Population structure of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in the Northwestern Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Conservation Biology* 7 (4): 834-844
- Bowen BW, Avise JC (1996) Conservation genetics of marine turtles. In: Conservation genetics: case histories from nature. Avise JC, Hamrick JL (eds). Chapman & Hall. New York, NY, USA pp. 512
- Bowen BW, Bass AL, Soares L, Toonen RJ (2005) Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology* 14: 2389-2402

- Bowen BW, Grant WS, Hillis-Starr Z, Shaver DJ, Bjorndal KA, Bolten AB, Bass AL (2007) Mixed-stock analysis reveals the migrations of juvenile hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean Sea. *Molecular Ecology* 16: 49-60
- Bowen BW, Karl SA (1997) Population genetics, phylogeography, and molecular evolution. In: *The biology of sea turtles – vol. I*. Lutz PL, Musick JA (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA pp. 432
- Bowen BW, Karl SA (2007) Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology* 16: 4886-4907
- Bowen BW, Meylan AB, Ross P, Limpus CJ, Balazs GH, Avise JC (1992) Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution* 46 (4): 865-881
- Bowen BW, Nelson WS, Avise JC (1993a) A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping, rate assessment, and conservation relevance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 5574-5577
- Broderick AC, Glen F, Godley BJ, Hays GC (2003) Variation in reproductive output of marine turtles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 288: 95-109
- Broderick D, Moritz C, Miller JD, Guinea M, Prince RIT, Limpus CJ (1994) Genetic studies of the hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata*: evidence for multiple stocks in Australian waters. *Pacific Conservation Biology* 1: 123-131
- Bruford MW, Wayne RK (1993) Microsatellites and their application to population genetics studies. *Current Opinion in Genetics & Development* 3 (6): 939-943
- Carr AF (1975) The Ascension Island green turtle nesting colony. *Copeia* 1975: 547-555
- Carr AF (1987) New perspectives on the pelagic stage of sea turtle development. *Conservation Biology* 1: 103-121
- Carr AF, Carr MH, Meylan AB (1978) The ecology and migrations of sea turtles, 7: The West Caribbean green turtle colony. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 162: 1-46
- Carr AF, Ogren L (1960) The ecology and migration of sea turtles, 4. The green turtle in the Caribbean sea. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 121: 1-48
- Casale P (2011) Sea turtle by-catch in the Mediterranean. *Fish and Fisheries* 12: 299-316
- Chaloupka M, Bjorndal KA, Balazs GH, Bolten AB, Ehrhart LM, Limpus CJ, Suganuma H, Troëng S, Yamaguchi M (2008) Encouraging outlook for recovery of a once severely exploited marine megaherbivore. *Global Ecology and Biogeography* 17: 297-304

- Chaloupka MY, Musick JA (1997) Age, growth, and population dynamics. In: The biology of sea turtles – vol. I. Lutz PL, Musick JA (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA pp. 432
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2011-2014
- deBruyn Mark, Hall BL, Chauke LF, Baroni C, Koch PL, Hoelzel AR (2009) Rapid response of a marine mammal species to Holocene climate and habitat change. *PLoS Genetics* 7(5): 1-11
- Donlan CJ, Wingfield DK, Crowder LB, Wolcox C (2010) Assessing anthropogenic threats to endangered sea turtles using surveys of expert opinion: a case study with sea turtles. *Conservation Biology* 24: 1586-1595
- Dow W, Eckert K, Palmer M, Kramer P (2007) An atlas of sea turtle nesting habitat for the Wider Caribbean region. The Wider Caribbean Sea Turtle Conservation Network and The Nature Conservancy. WIDECAST Technical Report No. 6. Beaufort, North Carolina pp. 267 plus electronic Appendices
- Dutton PH, Bowen BW, Owens DW, Barragan A, Davis SK (1999) Global phylogeography of the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *Journal of Zoology* 248: 397-409
- Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews* 5: 435-445
- Encalada SE, Lahanas PN, Bjorndal KA, Bolten AB, Miyamoto MM, Bowen BW (1996) Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Molecular Ecology* 5: 473-483
- Ernst C, Babour R, Lovich J (1994) Sea turtles of the United States and Canada. Smithsonian Institution. Washington and London pp. 682
- Fitzsimmons N, Moritz C, Bowen BW (1999) Population identification. In: Research and management techniques for the conservation of sea turtles. Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Gobrois FA, Donnelly M (eds). IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication no. 4
- Fitzsimmons NN, Limpus CJ, Norman JA, Goldizen AR, Miller JD, Moritz C (1997) Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial DNA markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 8912-8917
- Fitzsimmons NN, Moritz C, Moore SS (1995) Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* 12 (3): 432-440
- Formia A, Godley BJ, Dontaine JF, Bruford MW (2006) Mitochondrial DNA diversity and phylogeography of endangered green turtle (*Chelonia mydas*) populations in Africa. *Conservation Genetics* 7: 353-369

- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2009) Introduction to conservation genetics. 2nd ed. Cambridge University Press. New York, USA pp. 618
- Frazier JG (1999) Community-based conservation. In: Research and management techniques for the conservation of sea turtles. Eckert KL, Bjørndal KA, Abreu-Gobrois FA, Donnelly M (eds). IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication no. 4
- Fritz U, Havas P (2007) Checklist of Chelonians of the World. Vertebrate Zoology 57(2): 149-368
- Gaffney ES (1975) A phylogeny and classification of the higher categories of turtles. Bulletin of the American Museum of Natural History 155: 387-436
- Gaffney ES (1990) The comparative osteology of the Triassic turtle *Proganochelys*. Bulletin of the American Museum of Natural History 194: 1-263
- Godley BJ, Barbosa C, Bruford M, Broderick AC, Catry P, Coyne MS, Formia A, Hays GC, Witt MJ (2010) Unravelling migratory connectivity in marine turtles using multiple methods. Journal of Applied Ecology 47 (4): 769-778
- Godley BJ, Broderick AC, Glen F, Hays GC (2002) Temperature-dependent sex determination on Ascension Island green turtles. Marine Ecology Progress Series 226: 115-124
- Grant WS, Milner GB, Krasnowski P, Utter FM (1980) Use of biochemical genetic variants for identification of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stocks in Cook Inlet, Alaska. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 37(8): 1236-1247
- Grover A, Aishwarya V, Sharma PC (2012) Searching microsatellites in DNA sequences: approaches used and tools developed. Physiology and Molecular Biology of Plants 18(1): 11-19
- Guillon JM, Guéry L, Hulin V, Girondot M (2012) A large phylogeny of turtles (Testudines) using molecular data. Contributions to Zoology 81(3): 147-158
- Hamann M, Godfrey MH, Seminoff JA, Arthur K, Barata PCR, Bjørndal KA, Bolten AB, Broderick AC, Campbell LM, Carreras C, Casale P, Chaloupka M, Chan SKF, Coyne MS, Crowder LB, Diez CE, Dutton PH, Epperly SP, Fitzsimmons NN, Formia A, Girondot M, Hays GC, Cheng IJ, Kaska Y, Lewison R, Mortimer JA, Nichols WJ, Reina RD, Shanker K, Spotila JR, Tomás J, Wallace BP, Work TM, Zbinden J, Godley BJ (2010) Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. Endangered Species Research 11: 245-269
- Hendrickson JR (1980) The ecological strategies of sea turtles. American Zoologist 20: 597-608
- Hendrickson JR (1982) Nesting behavior of sea turtles with emphasis on physical and behavior determinants of nesting success or failure. In: Biology and conservation of sea turtles. Bjørndal K (ed). Smithsonian Institution Press. Washington, DC, USA pp. 583

- Hirayama R (1998) Oldest known sea turtle. *Nature* 392: 705-708
- Hoffman JI, Grant SM, Forcada J, Phillips CD (2011) Bayesian inference of a historical bottleneck in a heavily exploited marine mammal. *Molecular Ecology* 20: 3989-4008
- IUCN (2012) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em:<www.iucnredlist.org>. Acessado em 28 de fevereiro de 2013
- Jackson JBC, Kirby MX, Berger WH, Bjorndal KA, Botsford LW, Bourque BJ, Bradbury R, Cooke R, Erlandson J, Estes JA, Hughes TP, Kidwell S, Lange CB, Lenihan HS, Pandolfi JM, Peterson CH, Steneck RS, Tegner MJ, Warner R (2001) Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* 293: 629-638
- Karl SA, Bowen BW (1999) Evolutionary Significant Units versus geopolitical taxonomy: molecular systematic of an endangered sea turtle (genus *Chelonia*). *Conservation Biology* 13 (5): 990-999
- Karl SA, Bowen BW, Avise JC (1992) Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of anonymous nuclear loci. *Genetics* 131: 163-173
- Kelkar YD, Strubczewski N, Hile SE, Chiaromonte F, Eckert KA, Makova KD (2010) What is a microsatellite: a computational and experimental definition based upon repeat mutation behavior at A/T and GT/AC repeats. *Genome Biology and Evolution* 2: 620-635
- Lahanas PN, Bjorndal KA, Bolten AB, Encalada SE, Miyamoto MM, Valverde RA, Bowen BW (1998) Genetic composition of a green turtle (*Chelonia mydas*) feeding ground population: evidence for multiple origins. *Marine Biology* 130: 345-352
- Lahanas PN, Miyamoto MM, Bjorndal KA, Bolten AB (1994) Molecular evolution and population genetics of Greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Genetica* 94: 57-67
- Lande R (1988) Genetics and demography in biological conservation. *Science* 4872(241): 1455-1460
- Lee PLM (2008) Molecular ecology of sea turtles: new approaches and future directions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 356: 25-42
- Lee PLM, Luschi P, Hays GC (2007) Detecting female precise natal philopatry in green turtles using assessment methods. *Molecular Ecology* 16: 61-74
- Lewison RL, Freeman SA, Crowder LB (2004) Quantifying the effects of fisheries and threatened species: the impact of pelagic longlines on loggerhead and leatherback sea turtles. *Ecology Letters* 7: 221-231
- Li C, Xiao-Chun W, Olivier R, Li-Ting W, Li-Jun Z (2008) An ancestral turtle from the Late Triassic of southwestern China. *Nature* 456: 497-501

- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453-2465
- Lohmann KJ, Witherington BE, Lohmann CMF, Salmon M (1997) Orientation, navigation, and natal beach homing in sea turtles. In: *The biology of sea turtles – vol. I*. Lutz PL, Musick JA (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA pp. 432
- Lotze HK, Worm B (2009) Historical baselines for large marine animals. *Trends in Ecology and Evolution* 5(24): 254-262
- Luke K, Horrocks JA, Leroux RA, Dutton PH (2004) Origins of green turtle (*Chelonia mydas*) feeding aggregations around Barbados, West Indies. *Marine Biology* 144: 799-805
- Lukoschek V, Funahashi N, Lavery S, Dalebout ML, Cipriano F, Baker CS (2009) High proportion of protected minke whales sold on Japanese markets due to illegal, unreported or unregulated exploitation. *Animal Conservation* 12: 385-395
- Lyson TR, Bever GS, Bhullar BAS, Joyce WG, Gauthier JA (2010) Transitional fossils and the origin of turtles. *Biology Letters* 6: 830-833
- Lyson TR, Bever GS, Scheyer TM, Hsiang AY, Gauthier JA (2013) Evolutionary origin of the turtle shell. *Current Biology* 23: 1-7
- Marcovaldi G, Marcovaldi N, Thomé J, Patiri V (1999) *Revista do Tamar* 3: 1-28
- McClenachan L, Ferretti F, Baum JK (2011) From archives to conservation: why historical data are needed to set baselines for marine animals and ecosystems. *Conservation Letters* 5: 349-359
- McClenachan L, Jackson JBC, Newman MJH (2006) Conservation implications of historic sea turtle nesting beach loss. *Frontiers in Ecology and the Environment* 4(6): 290-296
- Meylan AB, Meylan PA (1999) Introduction to the evolution, life history, and biology of sea turtles. In: *Research and management techniques for the conservation of sea turtles*. Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Gobrois FA, Donnelly M (eds). IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication no. 4.
- Miller JD (1997) Reproduction in sea turtles. In: *The biology of sea turtles – vol. I*. Lutz PL, Musick JA (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA pp. 432
- Molfetti E, Vilaça ST, Georges JY, Plot V, Delcroix E, Scao RL, Lavergne A, Barrioz S, Santos FR, de Thoisy B (2013) Recent demographic history and present fine-scale structure in the northwest Atlantic leatherback (*Dermochelys coriacea*) turtle population. *PLoS ONE* 3(8): 1-11
- Monzón-Argüello C, López-Jurado LF, Rico C, Marco A, López P, Hays GC, Lee PLM (2010) Evidence from genetic and Lagrangian drifter data for transatlantic transport of small juvenile green turtles. *Journal of Biogeography* 37: 1752-1766

- Moritz C (1994) Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. *Tree* 9 (10): 373-375
- Mortimer JA (1982) Factors influencing beach selection by nesting sea turtles. In: *Biology and conservation of sea turtles*. Bjorndal K (ed). Smithsonian Institution Press. Washington, DC, USA pp. 583
- Mrosovsky N (1994) Sex ratios of sea turtles. *Journal of Experimental Zoology* 270: 16-27
- Mrosovsky N, Kamel S, Rees AF, Margaritoulis D (2002) Pivotal temperature for loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Kyparissia Bay, Greece. *Canadian Journal of Zoology* 80: 2118-2124
- Musick JA, Limpus CJ (1997) Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In: *The biology of sea turtles – vol. I*. Lutz PL, Musick JA (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA pp. 432
- Naro-Maciel E, Becker JH, Lima E, Marcovaldi MA, DeSalle R (2007) Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. *Journal of Heredity* 98: 29-39
- Naro-Maciel E, Bondioli ACV, Martin M, Almeida APA, Baptistotte C, Bellini C, Marcovaldi MA, Santos AJB, Amato G (2012) The interplay of homing and dispersion in green turtles: a focus on the Southwestern Atlantic. *Journal of Heredity* 103 (6): 781-792
- Naro-Maciel E, Le M, Fitzsimmons NN, Amato G (2008) Evolutionary relationships of marine turtles: a molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 659-662
- National Research Council (2010) *Assessment of sea turtle status and trends: integrating demography and abundance*. The National Academic Press. Washington, DC, USA pp. 143
- Nei M (1975) *Molecular Population Genetics and Evolution*. North-Holland Publishing Company. Amsterdam, Netherlands pp. 278
- Okuyama T, Bolker BM (2005) Combining genetic and ecological data to estimate sea turtle origins. *Ecological Applications* 15(1): 315-325
- Oravetz CA (1999) Reducing incidental catch in fisheries. In: *Research and management techniques for the conservation of sea turtles*. Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Gobrois FA, Donnely M (eds). IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication no. 4
- Plot V, de Thoisy B, Blanc S, Kelle L, Lavergne A, Roger-Bérubet H, Tremblay Y, Fossette S, Georges JY (2012) Reproductive synchrony in a recovering bottlenecked sea turtle population. *Journal of Animal Ecology* 81(2): 341-351
- Pritchard PCH (1976) Post-nesting movements of marine turtle. *Catalogue of American Amphibians and Reptiles* 238: 1-4

- Pritchard PCH (1997) Evolution, phylogeny, and current status. In: The biology of sea turtles – vol. I. Lutz PL, Musick JA (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA pp. 432
- Pritchard PCH, Mortimer JA (1999) Taxonomy, external morphology, and species identification. In: Research and management techniques for the conservation of sea turtles. Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Gobrois FA, Donnelly M (eds). IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication no. 4
- Proietti MC, Lara-Ruiz P, Reisser JW, Pinto LS, Dellagostin OA, Marins LF (2009) Green turtles (*Chelonia mydas*) foraging at Arvoredo Island in Southern Brazil: genetic characterization and mixed stock analysis through mtDNA control region haplotypes. *Genetics and Molecular Biology* 32 (3): 613-618
- Proietti MC, Reisser JW, Kinas PG, Kerr R, Monteiro DS, Marins LF, Secchi ER (2012) Green turtle *Chelonia mydas* mixed stocks in the western South Atlantic, as revealed by mtDNA haplotypes and drifter trajectories. *Marine Ecology Progress Series* 447: 195-209
- Prosdocimi L, Carman VG, Albareda DA, Remis MI (2012) Genetic composition of green turtle feeding grounds in coastal waters of Argentina based on mitochondrial DNA. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 412: 37-45
- Reece JS, Castoe TA, Parkinson CL (2005) Historical perspectives on population genetics and conservation of three marine turtle species. *Conservation Genetics* 6: 235-251
- Rhodin AGJ, van Dijk PP, Iverson JB, Shaffer HB (2010) Turtles of the world, 2010 update: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. *Chelonian Research Monographs* 5: 85-164
- Ripple J (1996) Sea Turtles. 1st ed. Voyage Press. Vancouver, British Columbia, Canada pp. 84
- Roberts MA, Schwartz TS, Karl SA (2004) Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green sea turtle (*Chelonia mydas*): analysis of microsatellite loci. *Genetics* 166: 1857-1870
- Roden SE, Dutton PH, Morin PA (2009) Characterization of single nucleotide polymorphism markers for the green sea turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology Resources* 9(3): 1055-1060
- Ruíz-Urquíola A, Riverón-Giro FB, Pérez- Bermúdez E, Abreu-Grobois FA, González- Pumariega M, James-Petric BL, Díaz-Fernández R, Álvarez-Castro JM, Jager M, Azanza-Ricardo J, Espinosa-López G (2010) Population genetic structure of Greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) based on mitochondrial DNA sequences, with an emphasis on rookeries from southwestern Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas* 31: 33-52
- Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews* 5: 63-69

- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629
- Seminoff JA (2004) *Chelonia mydas*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.4. Disponível em:<www.iucnredlist.org>. Acessado em: 28 de fevereiro de 2013
- Shaffer HB (2009) Turtles (Testudines). In: The timetree of life. Hedges SB, Kumar S (eds). Oxford University Press. Oxford, New York, USA pp. 551
- Shamblin BM, Bjorndal KA, Bolten AB, Hillis-Starr ZM, Lundgren I, Naro-Maciel E, Nairn CJ (2012) Mitogenomic sequences better resolve stock structure of southern Greater Caribbean green turtle rookeries. *Molecular Ecology* 21: 2330-2340
- Vargas SM, Araújo FCF, Monteiro DS, Almeida AP, Soares LS, Santos FR (2008) Genetic diversity and origin of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) from the Brazilian coast. *Journal of Heredity* 99(2): 215-220
- Vitt LJ, Caldwell JP (2009) Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. 3rd ed. Academic Press. Oxford, UK pp. 697
- Wallace BP, Dimatteo AD, Hurley BJ, Finkbeiner EM, Bolten AB, Chaloupka MY, Hutchinson BJ, Abreu-Grobois FA, Amoroch D, Bjorndal KA, Bourjea J, Bowen BW, Dueñas RB, Casale P, Choudhury BC, Costa A, Dutton PH, Fallabrino A, Girard A, Girondot M, Godfrey MH, Hamann M, López-Mendilaharsu M, Marcovaldi MA, Mortimer JA, Musick JA, Nel R, Pilcher NJ, Seminoff JA, Troëng S, Witherington B, Mast RB (2010) Regional Management Units for marine turtles: a novel framework for prioritizing conservation and research across multiple scales. *PloS ONE* 5 (12): e15465
- Wallace BP, Hutchinson BJ, Mast RB, Pilcher NJ (2011) Putting conservation priority-setting for marine turtles in context. *Animal Conservation* 14: 14-15
- Waples RS (1998) Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *The American Genetic Association* 89: 438-450
- Wibbels T (1999) Diagnosing the sex of sea turtles in foraging habitats. In: Research and management techniques for the conservation of sea turtles. Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Gobrois FA, Donnely M (eds). IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication no. 4
- Wibbels T (2003) Critical approaches to sex determination in sea turtles. In: The biology of sea turtles – vol. II. Lutz PL, Musick JA, Wyneken J (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA pp. 455
- Wright JM, Bentzen P (1994) Microsatellites: genetic markers for the future. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4: 384-388
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354

- Wyneken J (2003) The external morphology, musculoskeletal system, and neuro-anatomy of sea turtles. In: The biology of sea turtles – vol. II. Lutz PL, Musick JA, Wyneken J (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA pp. 455
- Zug GR, Vitt LJ, Caldwell JP (2001) Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. 2nd ed. Academic Press. San Diego, California, USA pp. 630

CAPÍTULO 1

- Abreu-Grobois FA, Horrocks JA, Formia A, Leroux R, Velez-Zuazo X, Dutton P, Soares L, Meylan P, Browe D (2006) New mtDNA dloop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution capacity of mixed stock analyses. In: Book of Abstracts. Frick M, Panagopoulou A, Rees AF, Williams K (eds). 26th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. International Sea Turtle Society, Athens, Greece pp. 179
- Aljabani SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acid Research 25: 4692-4693
- Awise JC, Bowen BW, Lamb T, Meylan AB, Bermingham E (1992) Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. Molecular Biology and Evolution 9(3): 457-473
- Ayres M, Ayres MJr, Ayres DL, Dos Santos AS (2007) Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM / MCT / CNPq, Belém, Brasil
- Balazs GH (1980) Synopsis of biological data on the green turtle in the Hawaiian Islands. NOAA Tech Memo NMFS SWFC-7, Honolulu, Hawaii
- Bass AL (1999) Genetic analysis to elucidate the natural history and behavior of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Wider Caribbean: a review and re-analysis. Chelonian Conservation and Biology 3(2): 195-199
- Bass AL, Epperly SP, Braun-Mcneill J (2004) Multi-year analysis of stock composition of a loggerhead turtle (*Caretta caretta*) foraging habitat using maximum likelihood and Bayesian methods. Conservation Genetics 5: 783-796
- Bass AL, Epperly SP, Braun-Mcneill J (2006) Green turtle (*Chelonia mydas*) foraging and nesting aggregations in the Caribbean and Atlantic: impact of currents and behavior on dispersal. Journal of Heredity 97 (4): 346-354
- Bass AL, Lagueux CJ, Bowen BW (1998) Origin of green turtles, *Chelonia mydas*, at "sleeping rocks" off the Northeast coast of Nicaragua. Copeia 4: 1064-1069
- Bass AL, Witzell WN (2000) Demographic composition of immature green turtles (*Chelonia mydas*) from the east central Florida coast: evidence from mtDNA markers. Herpetologica 56 (3): 357-367

- Bioinsight/DIREN Guyane (2003) Plan de Restauration des Tortues Marines en Guyane. Partie I - Inventaire et diagnostic. Direction Régionale de l'Environnement Guyane. Cayenne, Guyane pp. 90
- Bjorndal KA, Bolten AB (2008) Annual variation in source contributions to a mixed stock: implications for quantifying connectivity. *Molecular Ecology* 17: 2185-2193
- Bjorndal KA, Bolten AB, Chaloupka MY (2005a) Evaluating trends in abundance of immature green turtles, *Chelonia mydas*, in the Greater Caribbean. *Ecological Applications* 15(1): 304-314
- Bjorndal KA, Bolten AB, Moreira L, Bellini C, Marcovaldi MA (2006) Population structure and diversity of Brazilian green turtle rookeries based on mitochondrial DNA sequences. *Chelonian Conservation and Biology* 5 (2): 262-268
- Bjorndal KA, Bolten AB, Troëng S (2005b) Population structure and genetic diversity in green turtles nesting at Tortuguero, Costa Rica, based on mitochondrial DNA control region sequences. *Marine Biology* 147: 1449-1457
- Bolker B, Okuyama T, Bjorndal K, Bolten A (2003) Sea turtle stock estimation using genetic markers: accounting for sampling error of rare genotypes. *Ecological Applications* 13(3): 763-775
- Bolker BM, Okuyama T, Bjorndal KA, Bolten AB (2007) Incorporating multiple mixed stocks in mixed stock analysis: 'many-to-many' analyses. *Molecular Ecology* 16: 685-695
- Bowen BW, Avise JC (1996) Conservation genetics of marine turtles. In: *Conservation genetics: case histories from nature*. Avise JC, Hamrick JL (eds). Chapman & Hall. New York, NY, USA pp. 512
- Bowen BW, Karl SA (2007) Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology* 16: 4886-4907
- Bowen BW, Meylan AB, Ross P, Limpus CJ, Balazs GH, Avise JC (1992) Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution* 46 (4): 865-881
- Carr AF (1975) The Ascension Island green turtle nesting colony. *Copeia* 1975: 547-555
- Chapman RW (1996) A mixed stock analysis of the green turtle: the need for null hypotheses. In: *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. Bowen BW, Witzell WN (eds). NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396, Miami, FL, USA
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9 (10): 1657-1660
- Dutton PH, Roden SE, Stewart KR, LaCasella E, Tiwari M, Formia A, Thomé JC, Livingstone SR, Eckert S, Chacon-Chaverri D, Rivalan P, Allman P (2013)

- Population stock structure of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) in the Atlantic revealed using mtDNA and microsatellite markers. Conservation Genetics: DOI 10.1007/s10592-013-0456-0
- Encalada SE, Lahanas PN, Bjorndal KA, Bolten AB, Miyamoto MM, Bowen BW (1996) Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. Molecular Ecology 5: 473-483
- Ernst C, Babour R, Lovich J (1994) Sea turtles of the United States and Canada. Smithsonian Institution. Washington and London pp. 682
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.5: an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1: 47-50
- Fallabrino A, Estrades A, López-Mendilaharsu M, Laporta M, Prosdocimi L, Sales G, Drews C (2004) First Meeting on Research and Conservation of Sea Turtles in the Southwestern Atlantic Ocean (ASO). Marine Turtle Newsletter 104: 19
- Fallabrino A, González-Carman V, Becker JH, Bondioli ACV, Estima SC (2010) Corredor Azul: marine protected areas and sea turtles in the SW Atlantic. In: Proceedings of the Thirtieth Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. Blumenthal J, Panagopoulou A, Rees AF (eds). NOAA NMFS-SEFSC-396, Miami, FL, USA
- Faria VV, Novelli R, Gomes MP, Zalmon IR (2001) Potencial atrator de tubarões costeiros em recife artificial no norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia 18 (3): 813-821
- Formia A (2002) Population and genetic structure of the green turtle (*Chelonia mydas*) in West and Central Africa: implications for management and conservation. PhD Thesis. School of Biosciences, Cardiff University, England
- Formia A, Godley BJ, Dontaine JF, Bruford MW (2006) Mitochondrial DNA diversity and phylogeography of endangered green turtle (*Chelonia mydas*) populations in Africa. Conservation Genetics 7: 353-369
- Gelman A, Rubin DB (1992) Inference from iterative simulation using multiple sequences. Statistical Science 7 (4): 457-472
- Godley BJ, Barbosa C, Bruford M, Broderick AC, Catry P, Coyne MS, Formia A, Hays GC, Witt MJ (2010) Unravelling migratory connectivity in marine turtles using multiple methods. Journal of Applied Ecology 47 (4): 769-778
- Godley BJ, Lima EHSM, Akesson S, Broderick AC, Glen F, Godfrey MH, Luschi P, Hays GC (2003) Movement patterns of green turtles in Brazilian coastal waters described by satellite tracking and flipper tagging. Marine Ecology Progress Series 253: 279-288
- Hall TA (2001) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98

- Karl SA, Bowen BW, Avise JC (1992) Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of anonymous nuclear loci. *Genetics* 131: 163-173
- Kaska Y (2000) Genetic structure of Mediterranean sea turtle populations. *Turkish Journal of Zoology* 24: 191-197
- Lahanas PN, Bjorndal KA, Bolten AB, Encalada SE, Miyamoto MM, Valverde RA, Bowen BW (1998) Genetic composition of a green turtle (*Chelonia mydas*) feeding ground population: evidence for multiple origins. *Marine Biology* 130: 345-352
- Lahanas PN, Miyamoto MM, Bjorndal KA, Bolten AB (1994) Molecular evolution and population genetics of Greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Genetica* 94: 57-67
- Luke K, Horrocks JA, Leroux RA, Dutton PH (2004) Origins of green turtle (*Chelonia mydas*) feeding aggregations around Barbados, West Indies. *Marine Biology* 144: 799-805
- Marcovaldi MA, Silva ACCD, Gallo BMG, Baptistotte C, Lima EP, Bellini C, Lima EHSM, Castilhos JC, Thomé JCA, Moreira LMP, Sanches TM (2000) Recaptures of tagged turtles from nesting and feeding grounds protected by Projeto TAMAR-IBAMA, Brasil. In: *Proceedings of the Nineteenth Annual Symposium on Sea Turtle Conservation and Biology*. Kalb H, Wibbels T (eds). US Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC- 443, Miami, FL, USA
- Meylan AB, Meylan PA (1999) Introduction to the evolution, life history, and biology of sea turtles. In: *Research and management techniques for the conservation of sea turtles*. Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Gobrois FA, Donnelly M (eds). IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication no. 4.
- Monzón-Argüello C, López-Jurado LF, Rico C, Marco A, López P, Hays GC, Lee PLM (2010) Evidence from genetic and Lagrangian drifter data for transatlantic transport of small juvenile green turtles. *Journal of Biogeography* 37: 1752-1766
- Musick JA, Limpus CJ (1997) Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In: *The biology of sea turtles – vol. I*. Lutz PL, Musick JA (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA pp. 432
- Naro-Maciel E, Becker JH, Lima E, Marcovaldi MA, DeSalle R (2007) Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. *Journal of Heredity* 98: 29-39
- Naro-Maciel E, Bondioli ACV, Martin M, Almeida APA, Baptistotte C, Bellini C, Marcovaldi MA, Santos AJB, Amato G (2012) The interplay of homing and dispersion in green turtles: a focus on the Southwestern Atlantic. *Journal of Heredity* 103 (6): 781-792

- National Research Council (2010) Assessment of sea turtle status and trends: integrating demography and abundance. The National Academic Press. Washington, DC, USA pp. 143
- Nogueira BG (2011) Levantamento e análise de encalhes de tartarugas marinhas e sua relação com a pesca de espera na costa de São Francisco de Itabapoana, Rio de Janeiro. Trabalho de Conclusão de Curso. UNIRIO, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- Okuyama T, Bolker BM (2005) Combining genetic and ecological data to estimate sea turtle origins. *Ecological Applications* 15(1): 315-325
- Pella J, Masuda M (2001) Bayesian methods for analysis of stock mixtures from genetic characters. *Fishery Bulletin* 99: 151-167
- Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25:1253-1256
- Pritchard PCH (1976) Post-nesting movements of marine turtle. *Catalogue of American Amphibians and Reptiles* 238: 1-4
- Pritchard PCH (1997) Evolution, phylogeny, and current status. In: *The biology of sea turtles – vol. I*. Lutz PL, Musick JA (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA pp. 432
- Proietti MC, Lara-Ruiz P, Reisser JW, Pinto LS, Dellagostin OA, Marins LF (2009) Green turtles (*Chelonia mydas*) foraging at Arvoredo Island in Southern Brazil: genetic characterization and mixed stock analysis through mtDNA control region haplotypes. *Genetics and Molecular Biology* 32 (3): 613-618
- Proietti MC, Reisser JW, Kinas PG, Kerr R, Monteiro DS, Marins LF, Secchi ER (2012) Green turtle *Chelonia mydas* mixed stocks in the western South Atlantic, as revealed by mtDNA haplotypes and drifter trajectories. *Marine Ecology Progress Series* 447: 195-209
- Prosdocimi L, Carman VG, Albareda DA, Remis MI (2012) Genetic composition of green turtle feeding grounds in coastal waters of Argentina based on mitochondrial DNA. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 412: 37-45
- R Development Core Team (2005) R: A language and environment for statistical computing, reference index version 2.x.x. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Raymond M, Russet F (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283
- Roberts MA, Schwartz TS, Karl SA (2004) Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green sea turtle (*Chelonia mydas*): analysis of microsatellite loci. *Genetics* 166: 1857-1870

- Roden SE, Dutton PH, Morin PA (2009) Characterization of single nucleotide polymorphism markers for the green sea turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology Resources* 9(3): 1055-1060
- Ruíz-Urquíola A, Riverón-Giro FB, Pérez- Bermúdez E, Abreu-Grobois FA, González- Pumariega M, James-Petric BL, Díaz-Fernández R, Álvarez-Castro JM, Jager M, Azanza-Ricardo J, Espinosa-López G (2010) Population genetic structure of Greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) based on mitochondrial DNA sequences, with an emphasis on rookeries form southwestern Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas* 31: 33-52
- Sambrook E, Fritsch F, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY
- Sambrook KJ, Russel DW, Sambrook J (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY
- Seminoff J, Jones TT (2006) Diel movements and activity ranges of green turtles (*Chelonia mydas*) at a temperate foraging area in the Gulf of California, Mexico. *Herpetological Conservation and Biology* 1 (2): 81-85
- Shamblin BM, Bjorndal KA, Bolten AB, Hillis-Starr ZM, Lundgren I, Naro-Maciel E, Nairn CJ (2012a) Mitogenomic sequences better resolve stock structure of southern Greater Caribbean green turtle rookeries. *Molecular Ecology* 21: 2330-2340
- Shamblin BM, Bolten AB, Bjorndal KA, Dutton PH, Nielsen JT, Abreu-Grobois FA, Reich KJ, Witherington BE, Bagley DA, Ehrhart LM, Tucker AD, Addison DS, Arenas A, Johnson C, Carthy RR, Lamont MM, Dodd MG, Gaines MS, LaCasella E, Nairn CJ (2012b) Expanded mitochondrial control region sequences increase resolution of stock structure among North Atlantic loggerhead turtle rookeries. *Marine Ecology Progress Series* 469: 145-160
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10(3): 512-526
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10): 2731-2739
- Vargas SM, Araújo FCF, Monteiro DS, Almeida AP, Soares LS, Santos FR (2008) Genetic diversity and origin of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) from the Brazilian coast. *Journal of Heredity* 99(2): 215-220
- Wallace BP, Dimatteo AD, Hurley BJ, Finkbeiner EM, Bolten AB, Chaloupka MY, Hutchinson BJ, Abreu-Grobois FA, Amorochio D, Bjorndal KA, Bourjea J, Bowen BW, Dueñas RB, Casale P, Choudhury BC, Costa A, Dutton PH, Fallabrino A, Girard A, Girondot M, Godfrey MH, Hamann M, López-Mendilaharsu M, Marcovaldi MA, Mortimer JA, Musick JA, Nel R, Pilcher NJ, Seminoff JA, Troëng S, Witherington B, Mast RB (2010) Regional Management Units for marine turtles:

a novel framework for prioritizing conservation and research across multiple scales. PLoS ONE 5 (12): e15465

Zaykin DV, Pudovkin AI (1993) Two programs to estimate significance of Chi-square values using pseudo-probability test. Journal of Heredity 84:152

CAPÍTULO 2

Aggarwal RK, Velavan TP, Udaykumar D, Hendre PS, Shanker K, Choudhury BC, Singh I (2004) Development and characterization of novel microsatellite markers from the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). Molecular Ecology Notes 4(1): 77-79

Aljabani SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acid Research 25: 4692-4693

Alstad TI, Shamblin BM, Bagley DA, Ehrhart LM, Nairn CJ (2011) Isolation and characterization of tetranucleotide microsatellites from the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). Conservation Genetics Resources 3: 457-460

Awise JC (1998) Conservation genetics in the marine realm. The American Genetic Association 89: 377-382

Baker CS, Clapham PJ (2004) Modelling the past and future of whales and whaling. Trends in Ecology and Evolution 19(7): 365-371

Baker CS, Medrano-Gonzalez L, Calambokidis J, Perry A, Pichler F, Rosenbaum H, Straley JM, Urban-Ramirez J, Yamaguchi M, von Ziegeler O (1998) Population structure of nuclear and mitochondrial DNA variation among humpback whales in the North Pacific. Molecular Ecology 7: 695-707

Bass AL, Witzell WN (2000) Demographic composition of immature green turtles (*Chelonia mydas*) from the east central Florida coast: evidence from mtDNA markers. Herpetologica 56 (3): 357-367

Beaumont MA (1999) Detecting population expansion and decline using microsatellites. Genetics 153: 2013-2029

Beerli P, Palczewski M (2010) Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. Genetics 185(1): 313-326

Bjorndal KA (1980) Demography of the breeding population of the green turtle, *Chelonia mydas*, at Tortuguero, Costa Rica. Copeia 3: 525-530

Bowen BW, Bass AL, Soares L, Toonen RJ (2005) Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). Molecular Ecology 14: 2389-2402

Chaloupka M, Balazs G (2007) Using Bayesian state-space modeling to assess the recovery and harvest potential of the Hawaiian green sea turtle stock. Ecological Modelling 205: 93-109

- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014
- Dutton PH (1995) Molecular evolution of sea turtles with special reference to leatherback, *Dermochelys coriacea*. PhD Thesis. Department of Zoology, Texas A&M University, USA
- Dutton PH, Roden SE, Stewart KR, LaCasella E, Tiwari M, Formia A, Thomé JC, Livingstone SR, Eckert S, Chacon-Chaverri D, Rivalan P, Allman P (2013) Population stock structure of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) in the Atlantic revealed using mtDNA and microsatellite markers. *Conservation Genetics*: DOI 10.1007/s10592-013-0456-0
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.5: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50
- Fitzsimmons NN (1998) Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology* 7: 575-584
- Fitzsimmons NN, Limpus CJ, Norman JA, Goldizen AR, Miller JD, Moritz C (1997a) Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial DNA markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 8912-8917
- Fitzsimmons NN, Moritz C, Limpus CJ, Pope L, Prince R (1997b) Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow. *Genetics* 147: 1843-1854
- Fitzsimmons NN, Moritz C, Moore SS (1995) Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* 12 (3): 432-440
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2009) Introduction to conservation genetics. 2nd ed. Cambridge University Press. New York, USA pp. 618
- Girod C, Vitalis R, Leblois R, Fréville H (2011) Inferring population decline and expansion from microsatellite data: a simulation-based evaluation of the Msvar method. *Genetics* 188: 165-179
- Goldstein DB, Pollock DD (1997) Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity* 88: 335-342
- Goudet J (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86 (6): 485-486
- Hamann M, Godfrey MH, Seminoff JA, Arthur K, Barata PCR, Bjørndal KA, Bolten AB, Broderick AC, Campbell LM, Carreras C, Casale P, Chaloupka M, Chan SKF, Coyne MS, Crowder LB, Diez CE, Dutton PH, Epperly SP, Fitzsimmons NN, Formia A, Girondot M, Hays GC, Cheng IJ, Kaska Y, Lewison R, Mortimer JA, Nichols WJ, Reina RD, Shanker K, Spotila JR, Tomás J, Wallace BP, Work TM, Zbinden J, Godley BJ (2010) Global research priorities for sea turtles: informing

- management and conservation in the 21st century. *Endangered Species Research* 11: 245-269
- Hedrick PW, Miller PS (1992) Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecological Applications* 2(1): 30-46
- Hoffman JI, Grant SM, Forcada J, Phillips CD (2011) Bayesian inference of a historical bottleneck in a heavily exploited marine mammal. *Molecular Ecology* 20: 3989-4008
- IUCN (2012) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em:<www.iucnredlist.org>. Acessado em 28 de fevereiro de 2013
- Karl SA, Bowen BW, Avise JC (1992) Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of anonymous nuclear loci. *Genetics* 131: 163-173
- Lahanas PN, Bjorndal KA, Bolten AB, Encalada SE, Miyamoto MM, Valverde RA, Bowen BW (1998) Genetic composition of a green turtle (*Chelonia mydas*) feeding ground population: evidence for multiple origins. *Marine Biology* 130: 345-352
- Lewison RL, Freeman SA, Crowder LB (2004) Quantifying the effects of fisheries and threatened species: the impact of pelagic longlines on loggerhead and leatherback sea turtles. *Ecology Letters* 7: 221-231
- Lima EHSM, Troëng S (2001) Link between green turtles foraging in Brazil and nesting in Costa Rica? *Marine Turtle Newsletter* 94: 9
- Lotze HK, Worm B (2009) Historical baselines for large marine animals. *Trends in Ecology and Evolution* 5(24): 254-262
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *The American Genetics Association* 89: 238-247
- Luke K, Horrocks JA, Leroux RA, Dutton PH (2004) Origins of green turtle (*Chelonia mydas*) feeding aggregations around Barbados, West Indies. *Marine Biology* 144: 799-805
- Lynch M, Conery J, Bürger R (1995) Mutation accumulation and the extinction of small populations. *The American Naturalist* 146(4): 489-518
- Marcovaldi MA, Silva ACCD, Gallo BMG, Baptistotte C, Lima EP, Bellini C, Lima EHSM, Castilhos JC, Thomé JCA, Moreira LMP, Sanches TM (2000) Recaptures of tagged turtles from nesting and feeding grounds protected by Projeto TAMAR-IBAMA, Brasil. In: *Proceedings of the Nineteenth Annual Symposium on Sea Turtle Conservation and Biology*. Kalb H, Wibbels T (eds). US Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC- 443, Miami, FL, USA
- Molfetti E, Vilaça ST, Georges JY, Plot V, Delcroix E, Scao RL, Lavergne A, Barrioz S, Santos FR, de Thoisy B (2013) Recent demographic history and present fine-

- scale structure in the northwest Atlantic leatherback (*Dermochelys coriacea*) turtle population. PLoS ONE 3(8): 1-11
- Naro-Maciel E, Becker JH, Lima E, Marcovaldi MA, DeSalle R (2007) Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. Journal of Heredity 98: 29-39
- National Research Council (2010) Assessment of sea turtle status and trends: integrating demography and abundance. The National Academic Press. Washington, DC, USA pp. 143
- Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4: 535-538
- Plot V, de Thoisy B, Blanc S, Kelle L, Lavergne A, Roger-Bérubet H, Tremblay Y, Fossette S, Georges JY (2012) Reproductive synchrony in a recovering bottlenecked sea turtle population. Journal of Animal Ecology 81(2): 341-351
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959
- Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.4. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Reece JS, Castoe TA, Parkinson CL (2005) Historical perspectives on population genetics and conservation of three marine turtle species. Conservation Genetics 6: 235-251
- Roberts MA, Schwartz TS, Karl SA (2004) Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green sea turtle (*Chelonia mydas*): analysis of microsatellite loci. Genetics 166: 1857-1870
- Roden SE, Dutton PH (2011) Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci in the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) and cross-species amplification. Conservation Genetic Resources 3: 49-52
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources 8 (1): 103-106
- Sales G, Giffoni BB, Barata PCR (2008) Incidental catch of sea turtles by the Brazilian pelagic longline fishery. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 88(4): 853-864
- Sambrook E, Fritsch F, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY
- Sambrook KJ, Russel DW, Sambrook J (2001) Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY
- Schwartz M, Luikart G, Waples RS (2006) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. Trends in Ecology and Evolution 22(1): 25-33

- Seminoff JA (2004) *Chelonia mydas*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.4. Disponível em:<www.iucnredlist.org>. Acessado em: 28 de fevereiro de 2013
- Seminoff JA, Shanker K (2008) Marine turtles and IUCN Red Listing: a review of the process, the pitfalls, and novel assessment approaches. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 356: 52-68
- Storz JF, Beaumont M (2002) Testing for genetic evidence of population expansion and contraction: an empirical analysis of microsatellite DNA variation using a hierarchical Bayesian model. *Evolution* 56(1): 154-166
- Wallace BP, Dimatteo AD, Hurley BJ, Finkbeiner EM, Bolten AB, Chaloupka MY, Hutchinson BJ, Abreu-Grobois FA, Amorochio D, Bjorndal KA, Bourjea J, Bowen BW, Dueñas RB, Casale P, Choudhury BC, Costa A, Dutton PH, Fallabrino A, Girard A, Girondot M, Godfrey MH, Hamann M, López-Mendilaharsu M, Marcovaldi MA, Mortimer JA, Musick JA, Nel R, Pilcher NJ, Seminoff JA, Troëng S, Witherington B, Mast RB (2010) Regional Management Units for marine turtles: a novel framework for prioritizing conservation and research across multiple scales. *PloS ONE* 5 (12): e15465

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

- Avise JC (1998) Conservation genetics in the marine realm. *The American Genetic Association* 89: 377-382
- Bowen BW, Avise JC (1996) Conservation genetics of marine turtles. In: *Conservation genetics: case histories from nature*. Avise JC, Hamrick JL (eds). Chapman & Hall. New York, NY, USA pp. 512
- Bowen BW, Bass AL, Soares L, Toonen RJ (2005) Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology* 14: 2389-2402
- Bowen BW, Karl SA (2007) Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology* 16: 4886-4907
- Bowen BW, Meylan AB, Avise JC (1989) An odyssey of the green turtle: Ascension Island revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 573-576
- Bowen BW, Meylan AB, Ross P, Limpus CJ, Balazs GH, Avise JC (1992) Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution* 46 (4): 865-881
- Bowen BW, Witzell WN (1996) Introduction: sea turtle conservation genetics. In: *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. Bowen BW, Witzell WN (eds). NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. Miami, Florida, USA pp. 173

- Carr AF (1975) The Ascension Island green turtle nesting colony. *Copeia* 1975: 547-555
- Chaloupka M, Balazs G (2007) Using Bayesian state-space modeling to assess the recovery and harvest potential of the Hawaiian green sea turtle stock. *Ecological Modelling* 205: 93-109
- Encalada SE, Lahanas PN, Bjorndal KA, Bolten AB, Miyamoto MM, Bowen BW (1996) Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Molecular Ecology* 5: 473-483
- Fallabrino A, González-Carman V, Becker JH, Bondioli ACV, Estima SC (2010) Corredor Azul: marine protected areas and sea turtles in the SW Atlantic. In: Proceedings of the Thirtieth Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. Blumenthal J, Panagopoulou A, Rees AF (eds). NOAA NMFS-SEFSC-396, Miami, FL, USA
- Formia A, Godley BJ, Dontaine JF, Bruford MW (2006) Mitochondrial DNA diversity and phylogeography of endangered green turtle (*Chelonia mydas*) populations in Africa. *Conservation Genetics* 7: 353-369
- Godley BJ, Barbosa C, Bruford M, Broderick AC, Catry P, Coyne MS, Formia A, Hays GC, Witt MJ (2010) Unravelling migratory connectivity in marine turtles using multiple methods. *Journal of Applied Ecology* 47 (4): 769-778
- IUCN (2012) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acessado em 28 de fevereiro de 2013
- Molfetti E, Vilaça ST, Georges JY, Plot V, Delcroix E, Scao RL, Lavergne A, Barrioz S, Santos FR, de Thoisy B (2013) Recent demographic history and present fine-scale structure in the northwest Atlantic leatherback (*Dermochelys coriacea*) turtle population. *PLoS ONE* 3(8): 1-11
- Naro-Maciel E, Becker JH, Lima E, Marcovaldi MA, DeSalle R (2007) Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. *Journal of Heredity* 98: 29-39
- Naro-Maciel E, Bondioli ACV, Martin M, Almeida APA, Baptistotte C, Bellini C, Marcovaldi MA, Santos AJB, Amato G (2012) The interplay of homing and dispersion in green turtles: a focus on the Southwestern Atlantic. *Journal of Heredity* 103 (6): 781-792
- National Research Council (2010) Assessment of sea turtle status and trends: integrating demography and abundance. The National Academic Press. Washington, DC, USA pp. 143
- Proietti MC, Reisser JW, Kinas PG, Kerr R, Monteiro DS, Marins LF, Secchi ER (2012) Green turtle *Chelonia mydas* mixed stocks in the western South Atlantic, as revealed by mtDNA haplotypes and drifter trajectories. *Marine Ecology Progress Series* 447: 195-209

- Prosdocimi L, Carman VG, Albareda DA, Remis MI (2012) Genetic composition of green turtle feeding grounds in coastal waters of Argentina based on mitochondrial DNA. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 412: 37-45
- Seminoff JA (2004) *Chelonia mydas*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.4. Disponível em:<www.iucnredlist.org>. Acessado em: 28 de fevereiro de 2013
- Shamblin BM, Bjorndal KA, Bolten AB, Hillis-Starr ZM, Lundgren I, Naro-Maciel E, Nairn CJ (2012a) Mitogenomic sequences better resolve stock structure of southern Greater Caribbean green turtle rookeries. *Molecular Ecology* 21: 2330-2340
- Shamblin BM, Bolten AB, Bjorndal KA, Dutton PH, Nielsen JT, Abreu-Grobois FA, Reich KJ, Witherington BE, Bagley DA, Ehrhart LM, Tucker AD, Addison DS, Arenas A, Johnson C, Carthy RR, Lamont MM, Dodd MG, Gaines MS, LaCasella E, Nairn CJ (2012b) Expanded mitochondrial control region sequences increase resolution of stock structure among North Atlantic loggerhead turtle rookeries. *Marine Ecology Progress Series* 469: 145-160
- Troëng S, Rankin E (2005) Long-term conservation efforts contribute to positive green turtle *Chelonia mydas* nesting trend at Tortuguero, Costa Rica. *Biological Conservation* 121: 111-116
- Vargas SM, Araújo FCF, Monteiro DS, Almeida AP, Soares LS, Santos FR (2008) Genetic diversity and origin of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) from the Brazilian coast. *Journal of Heredity* 99(2): 215-220