Rodrigo Araujo de Souza

Variação morfológica e molecular das populações de
Mesoclemmys vanderhaegei (Testudines: Chelidae)

Morphological and Molecular variation of the *Mesoclemmys*
vanderhaegei populations (Testudines: Chelidae)

São Paulo

2014

Rodrigo Araujo de Souza

Variação morfológica e molecular das populações de
Mesoclemmys vanderhaegei (Testudines: Chelidae)

Morphological and Molecular variation of the *Mesoclemmys*
vanderhaegei populations (Testudines: Chelidae)

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências, Programa Ciências Biológicas, na
Área de Zoologia.

Orientador: Hussam El Dine Zaher

São Paulo

2014

Souza, Rodrigo Araujo de

Variação morfológica e molecular das populações de *Mesoclemmys vanderhaegei* (Testudines: Chelidae) / Rodrigo Araujo de Souza; orientador Hussam El Dine Zaher. -- São Paulo, 2014.

70 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia.

1. Taxonomia. 2. Morfometria tradicional. 3. Morfometria geométrica. 4. Filogenia molecular. 5. Complexo de espécies. 6. Cágado. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Zoologia. II. Título.

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Hussam El Dine Zaher

Aos meus pais por todo apoio e amor!

“LA CIENCIA ES LA EXPRESIÓN DE UNA NECESIDAD INHERENTE AL SER HUMANO Y, EN TODO CASO, ESTÁ LIGADA A LA FUNCIÓN SUPERIOR DE SU NATURALEZA INTELIGENTE: LA CAPACIDAD DE CREAR.”

RENÉ GERÓNIMO FAVAROLO

Agradecimentos

À Dra. Erika Hingst-Zaher por me acolher em seu laboratório, me indicar ao Hussam, e estar sempre disposta a me ajudar com este projeto e a crescer como pesquisador. Muitíssimo obrigado! Ao prof. Dr. Hussam Zaher, orientador sempre disposto a discutir e instruir quando solicitado e que gentilmente me cedeu este excelente projeto e ofereceu todo suporte estrutural, financeiro e intelectual necessário para a conclusão dos trabalhos. Ao prof. Dr. Flavio Molina, por ceder seu tempo e paciência para auxiliar o desenvolvimento deste projeto com o seu vasto conhecimento em quelônios.

Ao diretor do Museu Biológico do Instituto Butantan, Giuseppe Puerto, por abrir as portas do Butantan e viabilizar o acesso e convivência na instituição. À Hana Suzuki pelos conselhos e diversas caronas na volta do MZUSP! À Mariana Soler e Michelle Campagner pela amizade e suporte, e aos educadores da Casa do Horto Lara Carolina, Caroline Figueredo, Adriana Mezini, Bruna Rodrigues, ‘Helô’ Passarelli, Camila Julia e Marcelo Lucas, além de Livia Chagas, Vanessa Ritschel e Viviane Garcia pelo companheirismo e alegrias neste tempo de Butantan.

Aos amigos e companheiros do laboratório de Herpetologia do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), Priscila Carvalho, Francisco da Silva, Diego Cavalheri, Rafael Henrique, André de Carvalho, Raissa Siqueira, Ambrosina Tomás, Fausto Barbo, Paulo Nascimento, Alberto de Carvalho, Giovana Montingelli, e, em especial, a Matheus Pires, Leonardo Oliveira, Juan Hurtado, Vivian Trevine, Paola Sanchéz, Felipe Grazziotin, Juan Arredondo e Roberta Graboski pela indispensável ajuda com conhecimento, apoio técnico, amizade e puxões de orelha. Sou imensamente sortudo e grato por ter feito parte deste grupo! Aos ‘tartarucólogos’ do MZUSP Flavio Molina, Scott Thomson e Natalia Friol por ajudas diversas, como auxílio à logística e ao trabalho de campo e visita a coleções, discussões e troca de experiências, e por formarem um grupo unido e dedicado à causa da sistemática dos cágados brasileiros.

Agradeço profundamente ao prof. Dr. Franco Souza, da UFMS, por me ajudar ativamente com a logística do campo no Mato Grosso do Sul e me colocar em contato com a Marja da Fundação Neotropica (Bonito/MS), que nos auxiliaram durante nossa estada em Bonito. Agradeço ainda àqueles que mesmo se voluntariaram e me ajudaram imensamente nas coletas, Raissa Siqueira, Natalia Friol, Fernando Tavares e Ageu Francisco, pois sem eles teria sido impossível registrar a presença de *M. vanderhaegei* (*sensu* Bour, 1973) no Brasil. Sou grato também ao pessoal do Butantan que se dispôs a me acompanhar nas coletas Paulo Machado, Bruno Rocha e Fernando Julio.

Aos que nos receberam muito bem em suas instituições como o prof. Dr. Ulisses Caramaschi, prof. Dr. José Pombal Jr. e Pedro Pinna do Museu Nacional (RJ); ao prof. Dr. Diego Baldo, prof. Dr. Dardo Marti, Elio Castillo, Dario Cardozo, Natalia Coutouné do Laboratorio de Genética Evolutiva da

FCEQyN – Universidad Nacional de Misiones e Maria Tabeni que foram muito amigáveis em minha ida à Argentina; e à curadora da coleção de Herpetologia do Museo Nacional de Historia Natural del Paraguai, Martha Motte e sua equipe Nicolas Martinez e Frederick Bauer, além de Ethel Rojas por todo apoio dado a minha estadia no Paraguai e André de Carvalho pela troca de conhecimento e grande oportunidade de realizar uma coleta de campo no Chaco Úmido do Paraguai!

Ao quadro de funcionários do Museu de Zoologia, Instituto de Biociências e Instituto Butantan que sempre foram bastante atenciosos e solícitos, em especial à Lilian Parpinelli, à Erika Takamoto, da secretaria do IB, M. Aparecida Giamusso, Dione Sripierri, Marta Grobel, Glaucia Bio, dentre muitos outros!

Sou extremamente grato aos amigos que emprestaram seu tempo e conhecimento para ajudar em partes importantes dessa Dissertação, como o Daniel Caplin por sua revisão do Abstract, Thiago Coelho pelo mapa da Figura 1, Caio Caciporé pela montagem da prancha de medidas da Figura 2, Scott Thompson pelo desenho da Figura 3. Às pessoas que se dispuseram a ler o presente texto e sei que perdi muito por não ter conseguido usufruir do auxílio de Roberta G., Vivian T., Paola S. e Juan(s).

Tenho profunda gratidão ao Fabio Machado que sempre se dispôs a me ajudar e instruir sobre as questões morfométricas de meu trabalho!

Sou grato ainda aos amigos Denis Machado, Camila dos Santos, Fabiane Iwai e Thaisa Vicente pelos conselhos, revisão e suporte em diversos momentos do mestrado; ao companheirismo dos alunos do MZUSP, em especial a ‘Carol’ Yamaguchi por sua maravilhosa pessoa e que serve de inspiração a qualquer um a sua volta! E, claro, às pessoas da Rep 69 que de alguma forma fazem parte desse trabalho: Marcio Yamashita, Ricardo Kenj, Juarez Cabral, Marcio Ohkawara e Renata Belo.

E aos amigos Marcela Freme, Yeda e Celso Marckowistch, André Marchesini, Bruno Okasaki, Bruno Cunha, Eglee Igarashi, Aline Zigiotto, Bianca da Hora, Milena Ribeiro e Erika Ciampone, e a todos os familiares que sempre estão presentes, por mais que eu me ausente!!

Meu muito obrigado a todos que contribuíram de alguma forma para gerar este documento e que por falta de organização e pela imensa falta de memória para coisas que realmente importam do autor não foram mencionadas aqui. Minhas sinceras desculpas!

Este trabalho só foi possível graças ao financiamento da CAPES e FAPESP (Proc. 2012/08639-8) através de bolsas de mestrado, e ao financiamento que o laboratório de Herpetologia do MZUSP possui por meio do Projeto Temático do Hussam Zaher (FAPESP Proc. 2011/50206-9).

Índice

<i>Resumo</i>	1
<i>Abstract</i>	2
1. Introdução	4
1.1. A família Chelidae	4
1.2. Mesoclemmys e o histórico taxonômico de M. vanderhaegei.....	7
2. Objetivos.....	10
3. Metodologia	11
3.1. Amostragem	11
3.1.1. <u>Morfometria</u>	11
3.1.2. <u>Molecular</u>	15
3.2. Obtenção de dados	16
3.2.1. <u>Dados de morfometria tradicional</u>	16
3.2.2. <u>Dados de morfometria geométrica</u>	22
3.2.3. <u>Dados de sequencias moleculares</u>	23
3.3. Análise dos dados	25
3.3.1. <u>Análise dos dados de morfometria tradicional</u>	25
3.3.2. <u>Análise dos dados de morfometria geométrica</u>	27
3.3.3. <u>Análise dos dados moleculares</u>	28
4. Resultados	29
4.1. Morfometria tradicional	29
4.2. Morfometria geométrica	37
4.3. Filogenia molecular.....	41
5. Discussão	45
5.1. Dimorfismo sexual	45
5.2. O complexo M. vanderhaegei	46
5.3. Filogenia de Mesoclemmys.....	48
5.4. Diagnose morfométrica das espécies do complexo M. vanderhaegei	49
6. Conclusões	54
7. Referências Bibliograficas	55
8. ANEXO I.....	I

Resumo

Mesoclemmys vanderhaegei Bour, 1973 pertence à família Chelidae, que apresenta maior riqueza de espécies de Testudines no Brasil. Apesar de não se suspeitar do monofiletismo da família, há muitas dúvidas sobre as relações entre os táxons de Chelidae, com a possibilidade de vários grupos se revelarem parafiléticos. *Mesoclemmys vanderhaegei* tem uma ampla distribuição no centro-sul do continente sul-americano, havendo sido estudada mais especificamente sob uma temática ecológica. Seus aspectos taxonômicos e filogenéticos, porém, ainda necessitam de uma investigação mais detalhada, visto que o grupo pode representar um complexo de espécies. O presente trabalho visa, portanto, estudar as populações de *M. vanderhaegei* sob um ponto de vista taxonômico e filogenético, buscando identificar e caracterizar as populações através das divergências evolutivas que venham a ser reveladas, justificando assim um eventual desmembramento da espécie. Sendo assim, as populações de *M. vanderhaegei* foram investigadas por meio de técnicas de morfometria tradicional, morfometria geométrica, e uma filogenia molecular foi proposta para o gênero. Para a morfometria tradicional foram analisadas medidas lineares do plastrão, carapaça e cabeça; enquanto que para a morfometria geométrica foram selecionados *landmarks* nos vértices dos escudos do casco e na linha média dorsal e ventral de cada espécime. Para o estudo de filogenia molecular, foram sequenciados três genes nucleares (RAG-2, R35 e c-mos), e dois mitocondriais (12S e NADH) de representantes da maioria das populações da espécie, e de todas as espécies do gênero. A análise discriminante tanto para os dados de medidas lineares quanto para os de *landmarks* separa a população do sul da Bacia do Paraguai (próxima à localidade tipo da espécie) das demais populações brasileiras. As análises morfométricas diferenciam outras duas populações: uma população composta por espécimes da Chapada dos Guimarães (MT), região de Cuiabá e um exemplar de Bonito (MS); enquanto a outra população é representada por espécimes de São João da Ponte (MG), na Bacia do São Francisco. A topologia resultante da análise de máxima verossimilhança aponta *M. vanderhaegei* como um grupo polifilético, com a possibilidade de ser dividida em quatro espécies: uma com os espécimes do sul da Bacia Amazônica; outra com os espécimes de Montes Claros (MG), na Bacia do São Francisco; uma terceira com os espécimes de São João da Lagoa e do interior de São Paulo (Bacia do Paraná, sub Bacia do Tietê); além daquela formada pelos espécimes próximos à localidade tipo. Sugere-se, portanto, (1) que a distribuição de *Mesoclemmys vanderhaegei* seja restringida ao norte da Argentina, Paraguai, e oeste do Mato Grosso do Sul até que novos estudos venham a elucidar o quanto a espécie adentra o território brasileiro; (2) que as populações da região da Chapada dos Guimarães e do interior de Minas Gerais sejam elevadas

ao nível de espécie; (3) e que se façam novos estudos para elucidar a relação das populações da Bacia do Tocantins-Araguaia e Paraná com os outros grupos do complexo.

Abstract

Mesoclemmys vanderhaegei Bour, 1973 belongs to the family Chelidae, which presents the greatest variety of species of Testudines in Brazil. In spite of theories that suggest that the family might be monophyletic, there are still areas of doubt over the relationships between the taxa that belong to the Chelidae, and the possibility that various groups might prove to be paraphyletic. *Mesoclemmys vanderhaegei* has a large distribution range along the central and southern regions of the South American continent, and has been most specifically studied through an ecological perspective. A more detailed investigation of its taxonomic and phylogenetic characteristics is still both relevant and necessary, since the complex might represent multiple species. The present work aims, therefore, to study the populations of *M. vanderhaegei* from a phylogenetic and taxonomic perspective, looking to identify and characterize the populations in accordance with the evolutionary divergences that may be observed, thus justifying the subdivision of the complex into multiple species. With this in mind, the populations of *M. vanderhaegei* were investigated using techniques of traditional and geometric morphometry, and a molecular phylogeny was proposed for the genus. The traditional morphometric data accounted for linear measurements of the plastron, carapace and head while geometric morphometric data were chosen as landmarks on the vertices of the scutes of the shells and on the dorsal and ventral midline of each specimen. Using samples of the majority of the populations of the species, and of all the species of the genus, three nuclear (RAG-2, R35 and c-mos) and two mitochondrial genes (12S and NADH) were sequenced for the study of the molecular phylogeny. Both the discriminant analysis of the linear measurements data and that of the landmarks separate the population found in the South of the Paraguay Basin (near the type locality of the species) from other Brazilian populations. The morphometric analyses show two other distinct populations: a population composed of specimens from Chapada dos Guimarães (MT), in the region of Cuiabá and one specimen from Bonito (MS); while the other population is represented by specimens taken from São João da Lagoa (MG), in the Basin of São Francisco. The resulting tree topology of the Maximum-Likelihood analysis derived from the molecular data suggests that *M. vanderhaegei* should be considered a polyphyletic group, that can be divided into four species: one species represented by the specimens from the South of the Amazonian Basin; another represented by the specimens from Montes Claros (MG), in the Basin of São Francisco; a third represented by the specimens from São João da Lagoa and the interior of São Paulo (Paraná Basin, sub Basin of the river Tietê); in addition to the one

formed of the specimens close to the type locality. This would suggest, therefore, (1) that the distribution of Mesoclemmys vanderhaegei is restricted to the North of Argentina, Paraguay, and the West of Mato Grosso do Sul, until further studies are made to elucidate the extent to which the species has spread into Brazilian territory; (2) that the population of the Chapada dos Guimarães region and of the interior of Minas Gerais should be elevated to the category of species; (3) and that new studies must be carried out to determine the relationship between the populations of the Basin of Tocantins-Araguaia and Paraná with the other groups of the complex.

1. Introdução

1.1. A família *Chelidae*

A fauna recente de Pleurodira Cope, 1865 (Testudines) é composta por três famílias reconhecidas (Podocnemidae, Pelomedusidae e Chelidae), de hábito exclusivamente dulcícola ou semi-aquático, e de distribuição restrita ao Hemisfério Sul (Pritchard, 1979; Pritchard & Trebbau, 1984; Iverson, 1992; Cabrera, 1998; Bonin *et al.*, 2006; Ernst & Barbour, 1989). Esta subordem, porém, cujo fóssil mais antigo – *Proterochersis robusta* Gaffney, 2006 *apud* Fraas, 1913) – é datado do Triássico Superior, apresenta grande diversidade no Cretáceo Superior e Cenozóico Inferior, sendo reconhecidas ao menos nove famílias, com representantes em todos continentes (exceto Antártica), e ocupando os ambientes marinhos, dulcícolas e terrestres (Gaffney *et al.*, 2006).

Até o final da década de 1970, o registro fóssil conhecido do grupo era relativamente escasso e, conseqüentemente, pouco se sabia sobre sua origem e paleo-distribuição (Mittermeier, 1972). Broin (1988) é o primeiro a embasar a hipótese de uma origem gondwânica para Pleurodira e, em Broin & Fuente (1993), sul-gondwânica para Chelidae. Hoje, estimasse que os quelídeos tenham se diversificado do seu grupo irmão, a hiperfamília Pelomedusoidae (demais Pleurodira fóssil e recente (Gaffney *et al.*, 2006; Gaffney *et al.*, 2011)), no Jurássico Superior e se dispersado pela Austrália e América do Sul através da conexão com a Antártica. Essas afirmativas são baseadas na ausência de evidência (recente ou fossilífera) de quelídeos no Hemisfério Norte e África, somada ao fato dos fósseis mais antigos encontrados pertencerem ao Cretáceo Inferior (Aptiano/Albiano) da Patagônia e sudeste australiano (Borin & Fuente, 2001; Smith 2009; Fuente *et al.*, 2011).

A família Chelidae Gray, 1831 apresenta retração do pescoço no plano horizontal, cujo mecanismo é refletido na superfície articular orientada anteriormente da primeira vertebra torácica. Inclusão da décima vertebra torácica no complexo sacral e processo da vertebra caudal. Mandíbula articulada com a superfície troclear do pterigoide e com a presença de um ducto em formato de saco preenchido de fluído a partir da cavidade bucal ao invés de uma capsula sinovial. Nervo facial com ramo hiomandibular. Carapaça com 11 pares de suturas periferias ao longo de sua margem e nugal sem processo costal. Cintura pélvica fusionada ao plastrão e ílio sem um processo endotelial.

Plastrão com ausência de mesoplastra e com a ponte do plastrão bem desenvolvida e articulado com os costais. Crânio com ausência da epi-pterigoide; presença de um canal carotídeo interno no proótico e um forte contato parietal-esquamosal e pós-orbital-esquamosal. Membros anteriores e posteriores com articulação distinta na região do tornozelo, com quatro ou mais garras em cada membro e retração lateral da cabeça. Cariótipo $2n = 50$ ou 54 .

A fauna recente de Chelidae é representada por 16 gêneros e 56 espécies (Turtle Working Group, 2014), com distribuição pela Australasia (Austrália, Nova Zelândia e Indonésia) e América do Sul (desde a Venezuela-Colômbia até a Argentina) (Fritz & Havaš, 2007; Rhodin *et al.*, 2010; Georges & Thomson, 2010). O monofiletismo da família é suportado por evidência morfológica (fauna recente e fóssil) e molecular (de Broin & de la Fuente, 1993; Gaffney, 1977; Seddon *et al.*, 1997; George *et al.*, 1998, Krenz *et al.*, 2005; de la Fuente *et al.*, 2014), mas ainda há grandes incertezas sobre as relações filogenéticas a baixo do nível de família.

Gaffney (1972 e 1975) apresenta as primeiras análises filogenéticas para Testudines, recentes e fósseis, baseado em caracteres cranianos, onde apenas duas famílias são identificadas para Pleurodira (Podocnemidae e Chelidae). Gaffney (1977) foca suas análises na fauna recente de Chelidae, considerando apenas caracteres morfológicos dos oito gêneros reconhecidos na época – quatro sul-americanos (*Platemys*, *Phrynops*, *Chelus*, *Hydromedusa*) e quatro da australasianos (*Elseya*, *Emydura*, *Pseudemydura*, *Chelodina*). Em sua filogenia, o autor reafirma o monofiletismo da família, posiciona *Pseudemydura* como grupo irmão dos demais quelídeos e apresenta uma separação entre os táxons de pescoço longo, ou seja, aqueles com as vértebras cervicais mais longas do que as vertebrae dorsais (*Chelodina*, *Hydromedusa* e *Chelus*), e os de pescoço curto. Esse resultado contradiz os resultados obtidos por Friar (1964) a partir de dados sorológicos, cuja filogenia apresenta os táxons de cada continente mais relacionados entre si. Essa é uma discussão que ainda está em aberto.

A hipótese de Gaffney (1977) é suportada por dados morfológicos de Bona & Fuente (2005) e Fuente *et al.* (2010) ao estudarem fósseis de *Yaminuechelys*, pescoçudo extinto do Cretáceo Superior. Os resultados obtidos por estes autores apontam para *Yaminuechelys* como grupo irmão de *Hydromedusa*, que somados a *Chelodina* e *Chelus*, formam um clado monofilético de pescoçudos. As principais evidências, segundo os autores, seria o compartilhamento de cinco sinapomorfias entre os três gêneros (dos quais quatro são relacionados à estrutura das vertebrae), somado ao achado de *Yaminuechelys* para o Cretáceo Superior, comprovando a presença de quelídeos de pescoço cumprido na Gôndwana meridional anteriormente a sua separação com Austrália. A filogenia de Scheyer (2009), usando de ferramentas de morfologia interna (microestrutura da carapaça), também resulta na formação de

um clado de pescoçudos. O Scheyer (2009), porém, não refuta a hipótese de Friar (1964) pois não descarta a possibilidade das diferenças encontradas não serem resultantes apenas da filogenia do grupo.

A hipótese de Friar (1964), por outro lado, também encontra suporte em outros estudos sorológicos (Burbidge *et al.*, 1974; Frair, 1980; Shou-Hsian & Chen, 1982) e moleculares (Seddon *et al.*, 1997; Shaffer *et al.*, 1997). Burbidge *et al.* (1974) apresenta resultados preliminares de estudo sorológico entre os quelídeos sul-americanos *Mesoclemmys* e *Platemys*, e todas espécies da Australásia. Estes resultados mostram, segundo os autores, que os táxons de cada continente são mais relacionados entre si do que com um táxon de um outro continente, sendo que *Chelodina* representa o táxon de seu continente mais próximo dos sul-americanos analisados. Seddon *et al.* (1997) e Shaffer *et al.* (1997), usando dados moleculares e moleculares + morfológicos, respectivamente, também suportam que a formulação de dois clados monofiléticos separando os táxons de cada continente, o que sugere que a especiação observada nos clados recentes está mais relacionada com a divisão da Gôndwana, e não com a presença de filogenias distintas anterior a este evento. Outras referências sobre o tema podem ser encontradas, por exemplo, em Pritchard (1984), Georges *et al.* (1998), Fujita *et al.* (2004), Bickham *et al.* (2007), Wilson & Sánchez-Villagra (2011).

Além das relações supra-genéricas de Chelidae, ainda encontra-se em debate algumas relações ao nível genérico e específico. Isso pode ser observado em relação a *Chelodina*, cuja discussão no nível subgenérico se inicia na década de 1960 e se estende até a atualidade. *Chelodina* é subdivido em três subgêneros (*Chelodina*, com oito espécies, *Macrochelodina*, com cinco, e *Macrodiremys* como monoespecífico) baseado em evidências morfológicas e sorológicas (Gode, 1967; Burbidge *et al.*, 1974; Legler, 1981; Rhodin, 1994), além de dados moleculares e eletroforese (Georges & Adams, 1992; Seddon *et al.*, 1997; Georges *et al.*, 1999; Georges *et al.*, 2002). Os grupos diferem na morfologia da cabeça, pescoço e casco, em aspectos que podem ser relacionados à predação de peixes, que é amplamente difundida no gênero (Thomson, 2003). Apesar da divisão de *Chelodina* em subgêneros ser um consenso entre os autores desde o trabalho de Gode (1967), a posição de *C. colliei*, e consequentemente o arranjo dos subgêneros, foi discutida até recentemente. Gode (1967) inclui *C. colliei* (a referindo como *C. oblonga*) ao grupo que hoje é considerado como subgênero *Macrochelodina*, o que foi seguido pelos trabalhos de, mas não se restringindo a, Legler (1981), Cann (1978) e Rhodin (1994). Burbidge *et al.* (1974), ao analisar dados de morfologia e sorologia, sugere que a espécie seja tratada como uma linhagem distinta e grupo irmão dos outros dois grupos do gênero. Dados de eletroforese obtidos por Georges & Adams (1992) aponta a espécie como grupo irmão das

espécies que compõem o subgênero *Chelodina*, o que é corroborado por análises de sequências de DNA nos trabalhos de Seddon *et al.* (1997) e Georges *et al.* (1998). Wells & Wellington (1985) e McCord & Joseph-Ouni (2007) consideram que os subgêneros devam ser elevados a gênero, mas os autores encontram pouco respaldo da comunidade científica especializada (Georges & Thomson, 2010; Kuchling, 2010; TTWG, 2012; ICZN, 2013) e atualmente *Chelodina* é considerado monofilético e subdividido em três subgêneros (***C. Chelodina*** – *C. (C.) longicollis*, *C. (C.) steindachneri*, *C. (C.) novaeguineae*, *C. (C.) reimani*, *C. (C.) mccordi*, *C. (C.) canni*, *C. (C.) gunaleni* e *C. (C.) pritchardi* –, ***C. Macrochelodina*** – *C. (M.) expansa*, *C. (M.) rugosa*, *C. (M.) walloyarrina*, *C. (M.) burrungandjii* e *C. (M.) parkeri* – e ***C. Macrodiremys*** – *C. (M.) collii*).

Outros exemplos de mudanças/revisões taxonômicas podem ser observadas pelo histórico de *Elseya*, *Emydura*, e descrições de novos gêneros como *Elusor*, *Rheodytes* e *Myuchelys* (Georges & Adams, 1996; Thomson, 1997; Thomson & Mackness, 2000; Thomson & Georges, 2009; Georges & Thomson, 2010; Fielder, 2013; Le *et al.*, 2013; Todd *et al.*, 2014; Freeman & Cann, 2014; Georges *et al.*, 2014).

Na América do Sul, os gêneros encontram maior estabilidade taxonômica, sendo que uma das grandes alterações genéricas ocorreu na divisão de *Platemys* (monoespecífico – *P. platycephala*) e *Acanthochelys* (com quatro espécies) (McBee *et al.*, 1985; Rhodin, 1985; Iverson, 1986), configuração que aparenta estar resolvida filogeneticamente (Rhodin *et al.*, 1984; Derr *et al.*, 1987; Huebinger *et al.*, 2009; Rhodin *et al.*, 2009). Outro grupo que necessita de uma investigação minuciosa do ponto de vista da Sistemática, e que provavelmente levará mais alguns anos para ser resolvido, é o comumente conhecido como quelídeos “cabeça de sapo”. Estes pertencem a um complexo taxonômico (*Phrynops*, *Mesoclemmys*, *Batrachemys* e *Rhinemys*) de dados morfológicos e moleculares (Bour & Zaher, 2005). Abaixo discorro brevemente sobre histórico da taxonomia do grupo, com enfoque em *Mesoclemmys*, e apresento a espécie alvo do atual trabalho e sua problemática a ser investigada.

1.2. *Mesoclemmys* e o histórico taxonômico de *M. vanderhaegei*

Mesoclemmys foi descrito monotípico (*Mesoclemmys gibba*) por Gray em 1873 e como quelídeo de “cabeça de tamanho moderado, achatada dorso-ventralmente, olhos em posição anterior, dorso da cabeça largo e se estendendo até o occipício, com lados levemente côncavos, coberta por escudos regulares (dois pares na frente, dois pares atrás e um hexagonal alongado no

centro), têmporas cobertas por escudos poligonais, tímpano largo e superficial, dorsal do pescoço granular e duas barbilhas no queixo. Carapaça rígida, levemente achatada, escudo nugal distinto, primeiro escudo vertebral alongado e mais largo atrás, presença de quilha no quarto e quinto escudos vertebrais.”

Essa descrição relativamente ampla permitiu que Zangerl & Mertens (1958), seguindo as recomendações de Williams & Vanzolini (que escreviam na época a revisão dos quelídeos sul-americanos, a qual nunca foi publicada), e autores posteriores considerassem *Mesoclemmys* muito similar a *Phrynops*, rebaixando-o a subgênero deste juntamente com *Batrachemys* e *Rhinemys* (incluindo *Phrynops*). Bour (1973) vai além e, tratando especificamente de *Batrachemys* e *Mesoclemmys*, considera os sub-gêneros mal definidos e opta por não manter essa categoria dentro de *Phrynops*. A literatura não apresenta um consenso na citação do complexo *Phrynops* até o início dos anos 2000, sendo possível encontrar trabalhos que não consideram a subdivisão do gênero (e.g. Gaffney, 1977; Gaffney, 1979; Vanzolini *et al.*, 1980; Rhodin *et al.*, 1982; Ernst & Barbour, 1989; Fritz & Pauler, 1992; Lema, 1994; Souza *et al.*, 2000 e Métrailler *et al.*, 2001), outros que citam os subgêneros (e.g. Pritchard, 1967; Pritchard, 1979; Pritchard & Trebbau, 1984; Waller & Chebez, 1987; Georges *et al.*, 1998), e ainda aqueles que os citam como gêneros distintos (e.g. Winokur & Legler, 1974; Freiberg, 1975; Albrecht, 1976; Winokur, 1982; Cabrera, 1998).

Ao estudar a filogenia molecular de Chelidae, Seddon *et al.* (1997) e Georges *et al.* (1998) optam por elevar *Mesoclemmys* e os demais sub-gêneros ao nível genérico. Em sua recente revisão do gênero *Phrynops*, McCord *et al.* (2001) utilizaram-se de morfometria tradicional (*sensu* Marcus, 1990) para avaliar a proposta taxonômica apresentada por estes autores, referindo seis espécies ao gênero *Batrachemys*, quatro a *Phrynops*, uma a *Mesoclemmys* e *Rhinemys* (gênero anteriormente em sinonímia a *Phrynops*), e criando dois gêneros, também monotípicos, *Ranacephala* e *Bufocephala*. Atualmente, porém, com exceção de *Phrynops* e *Rhinemys*, estes gêneros passaram para a sinonímia de *Mesoclemmys*, que permanece com sua filogenia não resolvida (Bour & Zaher, 2005).

Mesoclemmys conta hoje com 10 espécies válidas. O gênero está distribuído em todos países da América do Sul, exceto Chile e Uruguai, sendo encontrado no Brasil em regiões do Pantanal, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Amazônia (Bour & Zaher, 2005). A espécie *M. vanderhaegei*, considerada pela IUCN como “quase ameaçada” (IUCN, 2013), apresenta histórico taxonômico confuso que possivelmente abrange um complexo de espécies crípticas, merecendo assim uma atenção filogenética especial. A espécie foi descrita em 1973 por Bour como uma subespécie de *Phrynops tuberculatus*, usando como holótipo um exemplar macho

coletado na região de Assunção, Paraguai. Entretanto, Bour já a considerou morfologicamente semelhante a *P. gibbus*, revelando uma dificuldade clara na distinção destas espécies. Pritchard (1979), apesar de considerá-la próxima de *P. (M.) gibbus*, acredita ser melhor elevar *P. (B.) t. vanderhaegei* ao nível de espécie dentro do subgênero *Batrachemys*, devido ao tamanho relativo entre a cabeça e a carapaça. McDiarmid & Foster (1987), por outro lado, levanta a hipótese de *P. (B.) t. vanderhaegei* representar uma variação geográfica de *P. (M.) gibbus*, considerando-a como tal em seu levantamento da fauna do Paraguai. Bour & Pauler (1987) encerram as dúvidas quanto à validade de *P. t. vanderhaegei*, elevando-a ao nível específico como *P. vanderhaegei*, ao apresentar uma redescrição da espécie baseada em 24 espécimes e 2 crânios de diferentes localidades no Paraguai e em Cuiabá/MT. Na revisão feita por McCord *et al.* (2001), a espécie é considerada igualmente próxima aos táxons de *Mesoclemmys* e *Batrachemys*, mas não intimamente ligada a eles, justificando, na visão dos autores, a criação de um gênero monotípico (*Bufocephala vanderhaegei*). Essa classificação foi questionada por Bour & Zaher (2005), que sugeriram a sinonimização dos gêneros *Batrachemys*, *Bufocephala* e *Ranacephala* com *Mesoclemmys*, destacando a ausência de dados consistentes para se estabelecer a filogenia do grupo. A espécie é hoje considerada como *Mesoclemmys vanderhaegei* (Rhodin *et al.*, 2010).

Ao analisar a descrição de um espécime coletado no estado de São Paulo por Mertens (1967), em sua primeira descrição da espécie, Bour & Pauler (1987) colocam como possível distribuição de *P. vanderhaegei* a bacia do rio Paraguai e do rio Paraná. Em 1986, Iverson amplia esta distribuição para o norte da Argentina, na província de Santa Fé. Waller & Chabez (1987) acrescentam um ponto interessante na distribuição de *P. vanderhaegei* ao confirmar sua presença em Misiones, nordeste da Argentina, próximo às fronteiras com o Paraguai e Brasil. A distribuição da espécie foi ainda mais ampliada recentemente: no Paraguai, a espécie foi formalmente descrita para os Departamentos de Amambay, San Pedro, Caaguazú, Central, Cordillera e Paraguari (Métrailler, 2005), mas sua distribuição real no país ainda não é certa (Vinke *et al.*, 2013); na Argentina, foram adicionadas as localidades Formosa e Corrientes (Baldo & Krauczuk, 2000; Yanosky *et al.*, 2000; Baldo *et al.*, 2007), e, no Brasil, em Itirapina/SP. (Souza *et al.*, 2000), Brasília/DF, norte de Goiás e centro de Tocantins (Brandão *et al.*, 2002; Villaça, 2002/2004) e Bacia do rio São Francisco, em Minas Gerais (Silveira, 2009). Atualmente considera-se que a espécie se distribui pelas bacias dos rios Paraguai, Uruguai, Paraná, Tocantins, e sul do Amazonas, ocupando principalmente áreas do Pantanal, Cerrado e Mata Atlântica (Brandão *et al.* 2002; Bour & Zaher, 2005; Souza, 2005 e Rueda-Almonacid *et al.*, 2007).

O histórico da espécie ilustra a dificuldade que os autores enfrentam ao tentar classificar *M. vanderhaegei* e correlacioná-la filogeneticamente aos táxons mais próximos. A sua ampla distribuição propiciou uma ampla exploração de sua ecologia (e.g. Molina *et al.*, 1998; Corazza & Molina, 2004; Souza, 2004; Brito, 2004; Brito *et al.* 2009a-b; Buhlmann *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2010). Entretanto, as populações de *M. vanderhaegei* carecem de uma investigação filogenética mais detalhada, podendo representar espécies distintas. A necessidade de revisão taxonômica do táxon é evidenciada por Mittermeier (1978), que não consegue alocar um espécime de quelídeo coletado em Cuiabá/MT em nenhuma espécie conhecida. Bour & Pauler (1987), em seu trabalho que reafirma *M. vanderhaegei* como espécie válida, também destacam que os espécimes dessa região diferem das características descritas para a espécie. Visto que estes autores, e nenhum dos que os sucederam, avaliaram o monofiletismo de *M. vanderhaegei*, o presente trabalho pretende caracterizar as populações da espécie em busca de uma resposta para a seguinte pergunta: as diferenças morfológicas presentes entre as populações de *M. vanderhaegei* indicam a presença de espécies crípticas ou são parte do espectro de variação morfológica apresentada pela espécie? Com este objetivo em mente, o atual trabalho abordou o tema sob o ponto de vista da morfometria da tradicional (*sensu* Marcus, 1990), morfometria geométrica do casco, e da filogenia molecular, pelo sequenciamento dos genes mitocondriais *Cyt-b*, *NADH4*, *12S RNA*, e os nucleares *R35*, *c-mos* e *RAG-2*.

2. Objetivos

O presente trabalho visa estudar as populações de *M. vanderhaegei* sob um ponto de vista taxonômico e filogenético, buscando identificar e caracterizar as populações através das divergências evolutivas que venham a ser reveladas, justificando assim um eventual desmembramento de *M. vanderhaegei* em duas ou mais espécies, caso haja evidência de divergências significativas entre as suas populações ao longo da sua ampla distribuição. Para tanto, pretende-se: [1] caracterizar, com o uso da morfometria geométrica, a morfologia externa da carapaça e do plastrão dos espécimes pertencentes às diferentes populações ao longo da distribuição de *M. vanderhaegei* e disponíveis nas diversas coleções brasileiras e sul americanas; [2] analisar e descrever a morfologia externa dos morfotipos de *M. vanderhaegei* por meio de medidas lineares e relações corporais; [3] compreender as variações genéticas entre as populações, com o intuito de testar o monofiletismo da espécie e sua posição na filogenia de *Mesoclemmys*; e [4] comparar os resultados obtidos e verificar se as variações populacionais moleculares apoiam as morfológicas, e se justificam uma subdivisão da espécie.

3. Metodologia

3.1. Amostragem

3.1.1. Morfometria

Foram amostrados 91 (19ind, 47♀ e 24♂) espécimes de *M. vanderhaegei*, representando grande parte da distribuição conhecida da espécie. Foram identificadas sete regiões geográficas para a amostragem de *M. vanderhaegei*, a saber (**Figura 1 e Tabela 1**): população do sul da Bacia do Paraguai (s-BPg), localizada próxima à localidade-tipo da espécie (Paraguai) e incluindo os exemplares do norte da Argentina e um exemplar de Bela Vista (MS), na divisa do Brasil com o Paraguai [n = 15]; população da Bacia do São Francisco (BSf), mais especificamente da região de Montes Claros e São João da Lagoa (MG) [n = 19]; população do norte da Bacia do Paraguai (n-BPg), composta em sua maioria por exemplares da Chapada dos Guimarães e grande Cuiabá, sendo o espécime mais ao sul coletado em Bonito/MS [n = 26]; população da Bacia do Tocantins-Araguaia (BTa), com exemplares da região da Serra da Mesa (GO) e Palmas (TO) [n = 11]; população do centro-oriental da Bacia do Paraná – sub-bacia do Tietê (BPt), com os exemplares do interior de São Paulo [n = 6]; população do norte-oeste da Bacia do Paraná – sub-bacia do Paranaíba (BPp) [n = 8]; e, por fim, a população do sul da Bacia Amazônica (BAm), com os exemplares do norte (Paranaíta) e oeste de Mato Grosso [n = 6].

Além de *M. vanderhaegei*, foram tomadas medidas lineares de exemplares de outras sete espécies do gênero, exceto *M. dahli*, *M. nasuta* e *M. zuliae*, totalizando 228 espécimes (Anexo I, **Tabela A**). Essa ampla amostra do gênero permitiu situar novos táxons que venham a surgir de um eventual desmembramento de *M. vanderhaegei*.

Estes exemplares representam as principais coleções brasileiras, além do *Museo Nacional de Historia Natural del Paraguay*, *Museo de Zoologia “Francisco Schade” de la Universidad Nacional del Paraguay*, e *Laboratório de Genética Evolutiva y Molecular de la Universidad Nacional de Misiones* (Argentina). A lista completa de instituições encontra-se disponível na **Tabela 2**.

Figura 1: Localidades amostradas de *M. vanderhaegei*. s-BPg - quadrado vermelho; BSf – triângulo azul escuro; n-BPg – losângulo roxo; BTa – triângulo invertido verde; BPt – quadrado azul claro; BAm – estrela marrom.

Tabela 1: Exemplos amostrados de *M. vanderhaegei*. *MSUNA 296: esqueleto de um *M. vanderhaegei* adulto mas sem informações para o sexo. Populações: s-BPg – sul da Bacia do Paraguai; BSf – Bacia do São Francisco; n-BPg – norte da Bacia do Paraguai; BTa – Bacia do Tocantins-Araguaia; BPt – Bacia do Paraná, sub-bacia do Tietê; BPP – Bacia do Paraná, sub-bacia do Paranaíba; BAM – Bacia Amazônica. Legenda das coleções encontra-se na Tabela 2.

População	Tombo	Sexo	Localidade	UF	País
s-BPg	LGE1343	f	--	--	Argentina
	LGE219	f	--	--	Argentina
	DB6496	ind	--	--	Argentina
	DB5282	ind	Posadas	Misiones	Argentina
	DB5281	f	Ituzaingó	Corrientes	Argentina
	MNHNP2980	ind	Cerro Tobatí	Cordillera	Paraguai
	MNHNP11104	f	Parque Nacional Cerro Corá	Amambay	Paraguai
	MNHNP3007	m	Parque Nacional Cerro Corá	Amambay	Paraguai
	MNHNP3008	f	Parque Nacional Cerro Corá	Amambay	Paraguai
	MSUNA296	adulto	--	--	Paraguai
	MSUNA435	f	Nemby	Central	Paraguai
	MSUNA436	f	--	--	Paraguai
	MSUNA438	f	Nemby	Central	Paraguai
	MSUNA623	ind	San José de Los Arroyos	Caaguázu	Paraguai
	MZUSP4573	f	Bela Vista	MS	Brasil
BSf	MZUFV005-C	ind	Unaí	MG	Brasil
	MZUFV006-C	ind	Unaí	MG	Brasil
	MZUFV007-C	ind	Unaí	MG	Brasil
	MZUSP4526	m	Montes Claros	MG	Brasil
	MZUSP4527	ind	Montes Claros	MG	Brasil
	MZUSP4528	ind	Montes Claros	MG	Brasil
	MZUSP4529	ind	Montes Claros	MG	Brasil
	MZUSP4530	ind	Montes Claros	MG	Brasil
	MZUSP4531	ind	Montes Claros	MG	Brasil
	MZUSP4532	ind	Montes Claros	MG	Brasil
	MZUSP4600	m	Montes Claros	MG	Brasil
	MZUSP4601	f	Montes Claros	MG	Brasil
	MZUSP4533	f	São João da Lagoa	MG	Brasil
	MZUSP4534	f	São João da Lagoa	MG	Brasil
	MZUSP4535	f	São João da Lagoa	MG	Brasil
	MZUSP4536	f	São João da Lagoa	MG	Brasil
	MZUSP4537	f	São João da Lagoa	MG	Brasil
	MZUSP4538	f	São João da Lagoa	MG	Brasil
	MZUSP4539	f	São João da Lagoa	MG	Brasil
n-BPg	MNRJ3309	f	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	MNRJ3529	f	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	MNRJ3530	f	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	MNRJ3531	m	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	MNRJ3533	f	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	MZUSP2648	f	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	MZUSP2649	m	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	MZUSP2650	m	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	MZUSP2651	m	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	MZUSP2652	ind	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	MZUSP2653	f	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	MZUSP2654	m	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil

Tabela 1: Continuação.

População	Tombo	Sexo	Localidade	UF	País
n-BPg	MZUSP2655	f	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	MZUSP4442	m	Campo Verde	MT	Brasil
	MZUSP4448	m	Lambari D'Oeste	MT	Brasil
	UFMT335	f	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	UFMT336	f	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	UFMT339	f	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	UFMT340	f	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	UFMT1624	m	Cuiabá	MT	Brasil
	UFMT1626	f	Bonito	MS	Brasil
	UFMT6042	f	Araputanga	MT	Brasil
	UFMT6587	f	Santo Antônio do Leverger	MT	Brasil
	UFMT6680	m	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	UFMT6681	m	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
	ZUEC0726	ind	Chapada dos Guimarães	MT	Brasil
BTa	CHUNB14684	f	Palmas	TO	Brasil
	CHUNB18342	ind	Minaçu	GO	Brasil
	CHUNB24695	f	Brasília	DF	Brasil
	MNRJ19208	f	Colinas do Sul	GO	Brasil
	MZUSP3337	f	Serra da Mesa	GO	Brasil
	MZUSP3338	f	Serra da Mesa	GO	Brasil
	MZUSP3339	f	Serra da Mesa	GO	Brasil
	MZUSP3340	m	Serra da Mesa	GO	Brasil
	MZUSP3341	f	Serra da Mesa	GO	Brasil
	UFMG73	ind	Colinas do Sul	GO	Brasil
	UFMG74	ind	Colinas do Sul	GO	Brasil
BPt	MHNCI6527	f	Araraquara	SP	Brasil
	MZUSP4394	f	Luis Antônio	SP	Brasil
	MZUSP4395	f	Luis Antônio	SP	Brasil
	MZUSP4396	f	Santa Bárbara	SP	Brasil
	MZUSP4397	m	Santa Bárbara	SP	Brasil
	PUCMG3572	m	São Carlos	SP	Brasil
BPp	CHUNB22057	m	Brasília	DF	Brasil
	CHUNB24694	f	Pirenópolis	GO	Brasil
	CHUNB36275	f	Caldas Novas	GO	Brasil
	CHUNB36276	f	Caldas Novas	GO	Brasil
	CHUNB36277	f	Caldas Novas	GO	Brasil
	MNRJ10060	m	Corumbá de Goiás	GO	Brasil
	MPEG6	ind	Goiânia	GO	Brasil
	MZUSP4015	m	PARNA das Emas	GO	Brasil
BAm	MZUSP4312	m	Paranaíta	MT	Brasil
	MZUSP4313	m	Paranaíta	MT	Brasil
	MZUSP4444	f	Comodoro	MT	Brasil
	UFMT1625	m	Vale de São Domingos	MT	Brasil
	UFMT3036	m	Vila Bela da Santíssima Trindade	MT	Brasil
	UFMT6056	m	Juína	MT	Brasil

Tabela 2: Lista de instituições biológicas consultadas.

Sigla	Instituição/Coleção
CHUNB	Coleção Herpetológica da Universidade Nacional De Brasília
MNRJ	Museu Nacional do Rio de Janeiro
MZUFV	Museu de Zoologia da Universidade Federal de Viçosa
MZUSP	Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo
UFMT	Universidade Federal do Mato Grosso
ZUEC	Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas
LGE	Laboratório de Genética Evolutiva
DB	Coleção pessoal Diego Baldo
MNHNP	Museo Nacional de Historia Natural del Paraguay
MSUNA	Museo de Zoologia 'Francisco Shade' de la Universidad Nacional Asunción

3.1.2. Molecular

A amostragem de tecidos disponível para este trabalho contém ao menos um representante de cada espécie de *Mesoclemmys*, incluindo amostras das populações de *M. vanderhaegei* do norte da Argentina, São Paulo e Mato Grosso, possibilitando o estudo filogenético do gênero com a inclusão dos demais gêneros de Chelidae da América do Sul como grupo externo. Essa amostragem foi possível através de campanhas específicas para a coleta de cágados, especialmente *Mesoclemmys* e *Phrynops* em 2012-2013, doações de EIA/RIMA e monitoramentos e resgates de fauna, e parcerias com pesquisadores externos como o Prof. Dr. Uwe Fritz, do Museum für Tierkunde, Senckenberg, Dresden (Alemanha), que publicou recentemente sequências de *M. dahli* e *M. zuliae* (Vergas-Ramirez *et al.*, 2012) e nos cedeu sequências de *M. nasuta* e *M. raniceps*, e a Msc. Elisângela Silva de Brito, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), que acrescentou amostras de sangue da população de *M. vanderhaegei* da Chapada dos Guimarães (MT).

Para este estudo, foram sequenciados 24 exemplares representando as diversas populações de *Mesoclemmys vanderhaegei* (**Tabela 3**), amostradas em campanhas de coleta do laboratório, e as espécies *M. heliostemma*, *M. gibba*, *M. tuberculata*, *M. perplexa*, *M. hogei*, bem como *Phrynops geoffroanus*, *P. williamsi*, *Acanthochelys macrocephala* e *Pelomedusa subrufa* como grupos externos pertencentes ao clado Pleurodira. Para completar a amostragem de grupos externos foram incluídas as sequências do Genbank pertencentes aos seguintes táxons das

famílias Podocnemididae e Chelidae: *Podocnemis expansa*, *Podocnemis vogli*, *Podocnemis sextuberculata*, *Podocnemis erythrocephala*, *Podocnemis lewyana*, *Podocnemis unifilis*, *Hydromedusa tectifera*, *Chelus fimbriatus*, *Mesoclemmys nasuta*, *Platemys platycephala*, *Acanthochelys radiolata*, *Acanthochelys spixii*, *Acanthochelys pallidipectoris*, *Mesoclemmys dahli*, *Mesoclemmys zuliae*, *Phrynops geoffroanus*, *Phrynops hilarii*. Para enraizar a análise, foram sequenciados dois táxons pertencentes ao clado Cryptodira, *Rhinoclemmys punctularia* e *Kinosternon scorpioides* (**Tabela 3**).

3.2. Obtenção de dados

3.2.1. Dados de morfometria tradicional

Foram tomadas 26 medidas lineares da cabeça, carapaça e plastrão, de todos os exemplares de *Mesoclemmys* disponíveis no MZUSP. Grande parte das medidas são úteis para a caracterização das espécies do gênero, mas apenas um pequeno conjunto de variáveis foi usado nas análises a seguir, uma vez que há grande correlação entre as medidas e a presença de grupos pouco amostrados compromete o uso de um número grande de variáveis. Sendo assim, foi escolhido o Comprimento Carapaça (CC), desde a extremidade anterior do escudo nuchal até a extremidade posterior do escudo supra-caudal; a Largura Máxima da Carapaça (LMC), medida como a maior distância entre dois escudos marginais opostos; a Altura Máxima do Casco (AMC), obtida na meridiana de maior distância entre o teto da carapaça e o plano do plastrão; Comprimento Cefálico (CCF), tomado desde a extremidade anterior das narinas até a extremidade posterior do occipital; Largura Cefálica (LCF), dada pela distância entre os tímpanos; altura cefálica (ACF). A relação completa de medidas está disposta na **Tabela 4**, e a **Figura 2** ilustra a definição das 26 medidas. As medidas foram obtidas com o emprego de paquímetro de precisão 0.05 mm (para as medidas menores ou iguais a 155 mm) ou de precisão 1.0 mm (para as medidas maiores de 155 mm).

Tabela 3: Amostras de *Mesoclemmys* e grupos-externos usados na análise filogenética do presente trabalho. O gene associado ao número de acesso do GenBank encontra-se na Tabela 13. O número CTMZ refere-se aos tecidos depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Siglas das coleções encontra-se na Tabela 2.

Exemplar	Id. Tecido	Espécie	Localidade	UF	País	Referências
MZUSPf 2503	CTMZ14009	<i>Acanthochelys macrocephala</i>	Miranda	MS	BR	Presente estudo
GenBank	U40392	<i>Acanthochelys pallidipectoris</i>				Seddon <i>et al.</i> (1997)
	AF109204					Georges <i>et al.</i> (1999)
	EF535295					Huebinger <i>et al.</i> (2013)
GenBank	EF535302	<i>Acanthochelys radiolata</i>				Huebinger <i>et al.</i> (2013)
GenBank	EF535300	<i>Acanthochelys spixii</i>				Huebinger <i>et al.</i> (2013)
GenBank	CFU40636	<i>Chelus fimbriatus</i>				Seddon <i>et al.</i> (1997)
	AF109203					Georges <i>et al.</i> (1999)
	AY339640					Fujita <i>et al.</i> (2004)
	EF535303					Huebinger <i>et al.</i> (2013)
MZUSP 4374	CTMZ07351	<i>Hydromedusa maximiliani</i>	Santo André	SP	BR	Presente estudo
GenBank	U62017	<i>Hydromedusa tectifera</i>				Seddon <i>et al.</i> (1997)
	AF109207					Georges <i>et al.</i> (1999)
	JX139089	<i>Phrynops geoffroanus</i>				
	AF109205					Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (2012)
	JX139081					Georges <i>et al.</i> (1999)
	JX139076					
	JX139072					
MZUSP 4511	CTMZ08308	<i>Phrynops geoffroanus</i>	Januária	MG	BR	Presente estudo
GenBank	JN999705	<i>Phrynops hilarii</i>				Lourenço <i>et al.</i> (2012)
	JX139085					Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (2012)
	JX139077					
MZUSP 4565	CTMZ13511	<i>Phrynops williamsi</i>	Ouro	SC	BR	Presente estudo
	JX139086	<i>Mesoclemmys dahli</i>				
	JX139082					
	JX139078					Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (2012)
	JX139073					
	JX139071					

Tabela 3: Continuação.

Exemplar	Id. Tecido	Espécie	Localidade	UF	País	Referências
MZUSP 4411	CMTZ08353	<i>Mesoclemmys gibba</i>	Caracarái	RR	BR	Presente estudo
MZUSP 4412	CTMZ08933	<i>Mesoclemmys gibba</i>	Caracarái	RR	BR	Presente estudo
MZUSP 4377	CTMZ11653	<i>Mesoclemmys heliostemma</i>	Porto Velho	RO	BR	Presente estudo
MZUSP 4202	CTMZ03156	<i>Mesoclemmys hogei</i>			BR	Presente estudo
GenBank	U40645	<i>Mesoclemmys nasuta</i>				Seddon <i>et al.</i> (1997)
	AY339637					Fujita <i>et al.</i> (2004)
MZUSP 4273	CTMZ03167	<i>Mesoclemmys perplexa</i>	Bom Jesus	PI	BR	Presente estudo
DB 5281	CTMZ07566	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	Ituzaingó	Corrientes	AR	Presente estudo
DB 5282	CTMZ07567	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	Posadas	Misiones	AR	Presente estudo
MZUSP 4312	CTMZ06671	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	Paranaíta	MT	BR	Presente estudo
MZUSP 4394	CTMZ07569	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	Luiz Antônio	SP	BR	Presente estudo
MZUSP 4397	CTMZ07572	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	Águas de Santa Bárbara	SP	BR	Presente estudo
MZUSP 4527	CTMZ08285	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	Montes Claros	MG	BR	Presente estudo
MZUSP 4528	CTMZ08286	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	Montes Claros	MG	BR	Presente estudo
MZUSP 4532	CTMZ08290	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	Montes Claros	MG	BR	Presente estudo
MZUSP 4535	CTMZ08293	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	São João da Lagoa	MG	BR	Presente estudo
MZUSP 4539	CTMZ08297	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	São João da Lagoa	MG	BR	Presente estudo
MZUSP 4109	CTMZ03157	<i>Mesoclemmys tuberculata</i>	PARNA Serra das Confusões	PI	BR	Presente estudo
MZUSP 4515	CTMZ08326	<i>Mesoclemmys tuberculata</i>	Barra	BA	BR	Presente estudo
GenBank	JX139087					
	JX139083					
	JX139079	<i>Mesoclemmys zuliae</i>				Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (2012)
	JX139074					
	JX139070					

Tabela 3: Continuação.

Exemplar	Id. Tecido	Espécie	Localidade	UF	País	Referências
GenBank	AM943822 AM943845 AM943841 FM165621	<i>Podocnemis erythrocephala</i>				Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (2012)
GenBank	AM943820 AF109209 AY42456 AM943839 FM165620					
GenBank	AM943817 AM943826 AM943825 FM165617					
GenBank	GU213781 GU213861 EF535297					
GenBank	AM943819 AM943844 AM943840 FM165616	<i>Podocnemis sextuberculata</i>				Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (2012)
GenBank	AM943818 AY339634 AM943842 FM165623					
GenBank	AM943821 AM943846 AM943838 FM165818					
-	CTMZ03161	<i>Pelomedusa subrufa</i>				Presente estudo
MZUSPf 1691	CTMZ08299	<i>Kinosternum scorpioides</i>	São João da Ponte	MG	BR	Presente estudo
MZUSP 4365	CTMZ09748	<i>Rhinoclemmys punctularia</i>	Porto de Moz	PA	BR	Presente estudo

Tabela 4: Siglas e descrição das medidas lineares.

Sigla	Descrição
CC	Comprimento da carapaça
CMC	Comprimento máximo da carapaça
LMC	Largura máxima da carapaça
AMC	Altura máxima do casco
CCF	Comprimento cefálico
LCF	Largura cefálica
ACF	Altura cefálica
LPAR	Largura mínima do osso parietal
LIO	Largura da região inter orbital
AT	Altura da membrana timpânica
APT	Altura parcial da membrana timpânica
CMP	Comprimento máximo do plastrão
CSMV	Comprimento da sutura médio-ventral do plastrão
LP	Largura do plastrão
LLAP	Largura do lobo anterior do plastrão
LLPP	Largura do lobo posterior do plastrão
LPTE	Largura máxima da ponte
LG.H	Largura da sutura entre os escudos gular-humeral
LF.A	Largura da sutura entre os escudos femoral-anal
G	Comp. do escudo gular
IG	Comp. do escudo intergular
IU	Comp. da sutura entre os escudos umerais
IP	Comp. da sutura entre os escudos peitorais
IAB	Comp. da sutura entre os escudos abdominais
IF	Comp. da sutura entre os escudos femorais
IAN	Comp. da sutura entre os escudos anais

Figura 2: Diagrama ilustrativo das medidas lineares. Significado das siglas disposto na Tabela 2.

3.2.2. Dados de morfometria geométrica

Os *landmarks* da carapaça e plastrão foram obtidos com o auxílio do braço digitalizador Microscribe MLX (Immersion Corporation - San Jose, California) ligado diretamente a um computador. Os exemplares foram fixados lateralmente na bancada com o uso de uma massa de modelar, de forma a permitir a digitalização dos *landmarks* na carapaça e plastrão do lado exposto. Foram selecionados 109 *landmarks* que delimitam todos os escudos da carapaça e do plastrão, dos quais 25 (18 da carapaça e sete do plastrão) são visíveis para os dois conjuntos de dados, o que permitiu a união da vista dorsal e ventral de cada espécime com o menor erro possível (**Figura 3**).

Figura 3: Representação esquemática dos 109 landmarks usados na morfometria geométrica 3D.

3.2.3. Dados de sequencias moleculares

Foram usadas amostras de músculo e sangue para a extração de material genético, seguindo o protocolo padrão de extração de DNA de tecido animal pressuposto por Hillis *et al.* (1996). Para amostras de músculo, foram utilizados 10mg do tecido aos quais foram adicionados 500µl do tampão STE (100m M NaCl; 50 mM Tris-HCL, pH 8,0; 1 mM EDTA), 25 µl de proteinase K (10mg/ml) e 75 µl de SDS 10%. A solução foi agitada e incubada por 2 horas a 55°C. Um volume igual de clorofórmio:fenol (1:1) foi adicionado e, após agitação cuidadosa, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 14000rpm. Recolheu-se o sobrenadante e adicionou-se 1 volume de clorofórmio:álcool iso-amílico (24:1). Após os passos de agitação e centrifugação que seguem a desproteinização, o DNA foi precipitado com 1 volume de Isopropanol, pré-resfriado a 20° C, e ressuspenso em 50 µl de H₂O milliQ. A qualidade e quantificação do DNA foi verificada em gel de agarose 1% e, quando verificado degradação por RNA, este foi tratado com ribonuclease (RNase), enzima que degrada o RNA. As amostras obtidas de sangue seguiram também esse mesmo protocolo com algumas modificações.

Duas regiões do DNA mitocondrial - 12S e NADH Dehydrogenase Subunit 4 (ND4) - e três regiões do DNA nuclear – oócito fator de maturação (c-mos); fragmento de RNA 35 (R35), *Recombination-Activating genes* (RAG-2) – foram amplificadas para fins deste trabalho. Estes genes foram selecionados de modo a ser possível associar as nossas amostras às sequências de *M. dahli* e *M. zuliae* publicadas recentemente por Vergas-Ramirez *et al.* (2012). Para amplificação desses fragmentos foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos iniciadores para esses genes já foram adquiridos e encontram-se descritos na **Tabela 5**. Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 1% marcados por GelRed e quantificados através do marcador de peso molecular Low Mass Invitrogen®. Os produtos do PCR foram purificados usando o kit Agencourt AMPure XP®.

Tabela 5: Lista de genes sequenciados e sequencia de cada oligonucleotídeo iniciador (*Primers*).

<i>Gene</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' a 3')</i>
Cyt-b	E-gludg-F	TGATTTGAARAACCAAYCGTTG
	CB649-R	GGGTGGAATGGGATTTTGTC
ND4	ND4-F	CACCTATGACTACCAAAAGCTCATGTAGAAGC
	Hist-R	CCTATTTTTAGAGCCACAGTCTAATG
R35	R35-EX1	ACGATTCTCGCTGATTCTTGC
	R35-EX2	GCAGAAAACTGAATGTCTCAAAGG
12S	L1091mod	CAAACCTAGGATTAGATACCCTACTAT
	H1557mod	GTACRCTTACCWTGTTACGACTT
c-mos	G73	GCGGTAAAGCAGGTGAAGAAA
	G74	TGAGCATCCAAAGTCTCCAATC
Rag2	F2-1	TTCCAGAGCTTCAGGATGG
	R2-1	CAGTTGAATAGAAAGGAACCCAAGT

Os fragmentos genômicos selecionados foram amplificados por PCR. O DNA amplificado foi usado no preparo de bibliotecas para sequenciamento de próxima geração (*Next Generation Sequence*, NGS) usando o kit Nextera XT[®]. As bibliotecas foram amplificadas em um sequenciador Illumina[®] HiSeq 2000 no LaCTAD.

A solução contendo os produtos do PCR foram sequenciados seguindo o método *Next Generation Sequence* (NGS) da Illumina[®], com o uso kit Nextera XT[®]. Neste método, os fragmentos de DNA de cada indivíduo são sinalizados com um *barcode* e fixados a um suporte, onde os fragmentos são amplificados via PCR, formando *clusters* de milhares de clones do DNA alvo. A presença do suporte mantém os fragmentos de DNA separados espacialmente, facilitando e diminuindo o tempo de reação de amplificação e sequenciamento (Metzker, 2010). Apenas quatro nucleotídeos fluorescentes (A, C, T, G) são usados no sequenciamento dos *clusters* de cópias de DNA. A cada ciclo de sequenciamento, é adicionado um desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) à cadeia nucleotídica, que age como um sinalizador para o término da polimerização e emite uma imagem fluorescente para identificar a base nucleotídica. Esse processo se repete até que o dNTP tenha percorrido toda a fita de DNA de interesse.

Os procedimentos de PCR e sequenciamento foram desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia, da ESALQ – USP, sob a coordenação do Prof. Dr. Luiz Coutinho. Ambas as fitas de cada fragmento de um mesmo espécime foram sequenciadas para garantir a qualidade das sequências utilizadas.

3.3. *Análise dos dados*

Todas as análises estatísticas referente aos dados morfométricos foram realizadas no ambiente R (R Core Team, 2012), com os pacotes ‘car’ (Fox & Weisberg, 2011), ‘geomorf’ (Adams & Otárola-Castillo, 2013) e ‘MASS’ (Venables & Ripley, 2002).

3.3.1. *Análise dos dados de morfometria tradicional*

Os dados obtidos por meio de medidas lineares (morfometria tradicional *sensu* Marcus 1990) foram analisados através de técnicas estatísticas multivariadas (Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante Linear (LDA)), sendo as diferenças inter-grupos, quando presentes, explicadas por Análise de Variância (ANOVA) entre pares de variáveis. Para se reduzir o efeito do tamanho, foram usados dados logaritimizadas na PCA e LDA. O

dimorfismo sexual presente nos dados foi testado pela comparação de médias para cada variável pelo Teste T de Student (Bussab, 1991).

A PCA (Pearson, 1901; Hotelling, 1933) permite reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados ao passo que mantém o máximo possível da variação presente nos dados. A PCA é uma ferramenta especialmente útil quando se trabalha com um conjunto grande de variáveis correlatas e se busca identificar aquelas que mais contribuem para a variação observada entre os dados. As variáveis medidas são transformadas em componentes principais (PC), ortogonais entre si e não correlatos, que são ordenados de forma decrescente segundo sua representatividade da variabilidade dos dados originais. A PCA não utiliza a informação de grupos *a priori*, sendo cada espécimen projetado em relação ao PC segundo o seu autovetor e autovalor naquele PC. A técnica permite, portanto, a visualização de grupos distintos (quando presentes), a identificação de variáveis que mais representam a variabilidade intergrupos e, consequentemente, uma explicação, mesmo que de certa forma limitada, dos padrões de variação encontrados nas amostragem (Jolicoeur & Mosimann, 1960; Jolliffe, 1986; Claude, 2008).

Ao contrário da PCA, a LDA não retira a informação sobre grupos no desenvolvimento das análises. Na verdade, o objetivo da LDA é estabelecer uma função linear que discrimine os grupos definidos *a priori* de modo que, sendo estes grupos reais, a função consiga atribuir novas amostragens a um dos grupos propostos. A LDA encontra combinações lineares (funções discriminantes lineares) entre as variáveis que distinguem os grupos em estudo. Os coeficientes da função são definidos por autovetores, não nulos, de variância-covariância entre grupos escalonada (normalizada) pela variância-covariância intra-grupos. Ao invés da matriz de variância-covariância, os primeiros PC (que contém maior parte da variação encontrada na amostra) podem ser usados pela LDA, permitindo o uso de um conjunto menor de variáveis nas análises e, além disso, a representação cartesiana dos espécimes separados (ou não) em grupos pela LDA.

A análise de variância de uma via (*One-Way* ANOVA) consiste na comparação das médias intra e inter-grupos, sendo estes definidos *a priori*. A diferença entre os grupos é testada estatisticamente pela distribuição F de Fisher (Neff & Marcus, 1980). Caso o valor de F calculado pela ANOVA for maior do que o valor de F esperado, a uma probabilidade de 5%, considera-se que a diferença observada entre os grupos não ocorre apenas devido ao acaso, mas sim, por influência dos grupos. A ANOVA foi aplicada em duas situações distintas durante as análises. Na primeira situação ela foi usada para constatar a ausência de dimorfismo sexual na biometria de *Mesoclemmys* analisada no presente trabalho, onde apenas uma das oito variáveis consideradas apresentou diferença significativa entre os sexos. Uma nova sequência de ANOVA

foi desenvolvida para se analisar as diferenças e similaridades entre as populações de *M. vanderhaegei*, permitindo uma melhor compreensão dos resultados das análises multivariadas.

3.3.2. Análise dos dados de morfometria geométrica

A morfometria geométrica concentra-se na análise estatística de coordenadas cartesianas de *landmarks* (Bookstein, 1991; Dryden & Mardia, 1998; Zelditch *et al.*, 2004). Visto que coordenadas cartesianas de *landmarks* são afetadas pela posição, orientação, e tamanho (ou escala) da configuração de *landmarks*, faz-se necessária a remoção destes efeitos através de uma Análise Generalizada de Procrustes (“Generalized Procrustes Analysis” ou GPA; Rohlf & Slice, 1990). Durante uma GPA a posição é removida através da centralização de todas as coordenadas na origem, subtraindo de cada *landmark* as coordenadas do centróide (média das coordenadas dos *landmarks*). Para se escalar a configuração, divide-se a configuração de *landmarks* por uma medida de tamanho. Em morfometria geométrica, o tamanho é comumente computado como o tamanho do centroide, ou a raiz quadrada da soma das distâncias euclidianas entre cada *landmarks* e o centro de massa (ou centroide) da configuração (Dryden & Mardia, 1998). A orientação de configurações superpostas é removida através de um processo que acha a rotação que minimiza a soma das distâncias quadradas entre os *landmarks* da configuração e uma configuração média obtida de forma iterativa (Rohlf & Slice, 1990). As coordenadas dos *landmarks* das configurações superpostas são utilizadas como dados em análises estatísticas. Este conjunto de técnicas vem sendo aplicado a problemas envolvendo diversos grupos de vertebrados, incluindo quelônios (Claude *et al.*, 2003; Depecker *et al.*, 2006; Angielczyk *et al.*, 2010; Benson *et al.*, 2011).

Para avaliar se machos e fêmeas podem ser usados em conjunto, foi aplicadas Análises de Variância Multivariada (MANOVA) de duas vias sobre as variáveis de forma usando sexo e os grupos populacionais como fatores. A MANOVA aplicada aos *landmarks* resultantes da GPA (referida como Procrustes ANOVA) segue o proposto por Anderson (2001). Nesse método, a soma dos quadrados das distâncias de Procrustes observada, usadas como uma medida de soma dos quadrados (SS) entre variáveis (Goodall, 1991), é testada pelo método de permutação, onde as distâncias observadas são trocadas de forma aleatória em relação aos fatores e um novo pseudo-*F* é calculado para cada fator. Esse processo é repedido diversas vezes e a distribuição de pseudo-*F* gerada é comparada com o valor real *F* para cada fator. Em cada Procrustes ANOVA desenvolvidas neste trabalho foram realizadas 1000 permutações. Esse método permite o uso direto dos *landmarks* uma vez que não considera uma distribuição euclidiana entre as variáveis.

Para testar a hipótese de *M. vanderhaegei* representar um complexo de espécies, foi aplicada uma Análise Discriminante Linear (LDA) sobre os grupos determinados a priori, obtendo-se a porcentagem de classificação correta dos espécimes. Para se averiguar a consistência dos resultados obtidos pela LDA, foram avaliadas as probabilidades posteriores de que cada espécime tem de ser realocado no seu grupo (Machado e Hingst-Zaher, 2009). Assim como na ANOVA, a conformação única dos *landmarks* não é própria para o uso direto na LDA. Por tanto, foram usados na LDA os primeiros PC (que respondem por ao menos 70% da variação da forma) dos resíduos da GPA projetados no espaço da tangente.

3.3.3. Análise dos dados moleculares

A qualidade das sequências foi previamente analisada utilizando o programa Chromas 2.0 (disponível em www.technelysium.com.au/chromas.html), em seguida os *contigs* foram montados, utilizando as duas fitas de DNA, gerando assim uma sequência consenso para cada indivíduo. Os *contigs* foram gerados através do programa Geneious v. 5.4 (Drummond *et al.*, 2011) e logo alinhados através do método de alinhamento múltiplo implementado no programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1997), este é incluído como aplicativo acessório do programa BioEdit 7.09 (Hall, 1999), o qual foi utilizado para revisão e edição manual das sequências.

Para a análise filogenética foi utilizado o método de Máxima Verossimilhança (MV) implementado através do programa RAxML v8.0.26 (Stamatakis, 2014). Foi empregado o método de *Bootstrap* (Felsenstein, 1985) para estimar o suporte de confiança dos clados. O modelo GTR GAMMA de substituição foi escolhido para esta análise, como recomendado por Stamatakis (2006). A análise foi conduzida com a implementação de 100 RAS (“Random Addition Sequences”) seguida do uso do algoritmo de “rapid hill-climbing” para a permutação (“swap”) das árvores. Foram produzidas 1000 pseudo-réplicas não paramétricas de *Bootstrap* para calcular o suporte dos clados. Valores acima de 70% para *Bootstrap* foram considerados clados fortemente suportados. Para a escolha do melhor modelo de substituição de bases foi utilizado o programa MrModeltest 2.3 (Nylander, 2008).

4. Resultados

4.1. Morfometria tradicional

O comprimento da carapaça de *M. vanderhaegei* variou, dentro de nossa amostragem, de 38,27 mm a 180,20 mm, sendo o menor adulto amostrado uma fêmea de 115,75 mm da Chapada dos Guimarães/MT (UFMT 336). Esse espécime também é aquele com a menor AMC (31,0 mm) e CCF(28,15 mm), e a segunda menor ACF(12,30 mm). O maior espécime amostrado é um esqueleto coletado no Paraguai, mas sem identificação para o sexo, e com as maiores medidas de CC (272,0 mm), LMC (184,0 mm), AMC (91,0 mm), CCF (58,67 mm) e LCF (51,38 mm). A menor LPAR (2,85 mm) e a maior LPAR (9,0 mm) foram encontradas em adultos sendo, respectivamente, uma fêmea de 216,0 mm de CC do norte da Argentina, e um macho de 168,50 mm de CC de Paranaíta (norte do Mato Grosso). O menor exemplar amostrado foi um espécime de Amambay, Paraguai, coletado quando recém eclodido e com 38,27 mm de CC, e as menores medidas de LMC (26,43 mm), CCF (13,05 mm), LCF (11,62 mm) e ACF (7,22 mm) (MNHNP 2980). A **Tabela 6** resume a variação das principais medidas em *M. vanderhaegei* observada na presente amostra.

A comparação univariada entre machos e fêmeas por meio do Teste T, mostrou que apenas 3 medidas diferem significativamente entre os sexos (**Tabela 7**). Fêmeas possuem maior G (media de 21,16 mm) e IAN (média de 21,61mm), enquanto machos apresentam um maior LPAR (media de 6,77 mm). Apesar das diferenças não serem significativas, a média das medidas consideradas, com exceção de LPAR, foi maior sempre nas fêmeas.

Tabela 6: Características morfométricas de *Mesoclemmys vanderhaegei* amostrado pelo presente trabalho. (n = 91: fêmeas (47), machos (24), imaturos(19) e 1 esqueleto adulto sem identificação para o sexo). Descrição das medidas se encontra na Tabela 3. dv – desvio padrão, var – variância padrão, max – maior valor, e min – menor valor.

		CC	LMC	AMC	CCF	LCF	ACF	LPAR
fêmeas	média	180,204	127,524	57,114	41,864	35,480	19,402	5,721
	dv	31,508	20,841	12,725	6,778	6,664	4,193	1,302
	var	992,738	434,365	161,921	45,936	44,412	17,580	1,694
	max	259,000	178,000	87,000	57,660	51,170	29,420	8,800
	min	115,750	85,750	31,000	28,150	23,600	12,210	2,850
machos	média	161,755	113,392	49,260	37,434	31,600	16,717	6,610
	dv	21,928	14,078	6,997	4,157	4,102	2,409	1,216
	var	480,844	198,200	48,955	17,282	16,830	5,803	1,478
	max	202,000	140,000	61,000	45,700	39,650	22,420	9,000
	min	120,850	83,500	36,500	30,200	25,500	13,000	3,170
adultos	média	175,516	123,632	55,158	40,678	34,458	18,718	5,993
	dv	31,915	21,078	12,487	6,694	6,488	4,104	1,343
	var	1018,596	444,266	155,925	44,816	42,099	16,846	1,804
	max	272,000	184,000	91,000	58,670	51,380	29,420	9,000
	min	115,750	83,500	31,000	28,150	23,600	12,210	2,850
imaturos	média	84,381	62,913	25,869	22,686	18,681	10,564	4,838
	dv	28,685	21,907	11,222	6,316	4,954	3,053	0,612
	var	822,835	479,928	125,927	39,887	24,537	9,320	0,374
	max	150,680	111,350	54,500	39,220	31,560	18,940	6,300
	min	38,270	26,430	13,450	13,050	11,620	7,220	4,000

Tabela 7: Teste T entre machos (m) e fêmeas (f) de *M. vanderhaegei*, população do norte da Bacia do Paraguai, para as 26 medidas descritas na Tabela 3. Siglas: n – amostra disponível; $\bar{x}$ – média; gl – graus de liberdade; t – valor observado de t de *Student*; p – probabilidade do valor de t ser devido ao acaso. Os valores de p destacados com asteriscos indicam que o teste foi significativo ao valor de 0,05.

medidas	sexo	n	$\bar{x}$	gl	t	p
CMC	f	13	172,35	20,63	10,323	0,3139
	m	10	160,3			
CC	f	13	171,231	20,648	1,027	0,316
	m	10	159,21			
LMC	f	13	119,923	20,939	1,326	0,1993
	m	10	109,935			
AMC	f	13	51,308	18,706	0,961	0,349
	m	9	47,344			
CMP	f	13	153,22	19,925	1,221	0,236
	m	9	141,03			
CSMV	f	13	140,139	19,903	1,32	0,202
	m	9	127,567			
LP	f	13	100,108	19,359	1,94	0,067
	m	9	88,333			
LLAP	f	13	83,662	19,38	1,633	0,119
	m	10	75,19			
LLPP	f	13	71,473	20,245	1,737	0,098
	m	10	63,425			
LPTE	f	13	45,019	18,151	1,611	0,124
	m	9	39,788			
LG-H	f	13	57,604	19,679	1,764	0,093
	m	10	51,175			
LF-A	f	13	54,123	19,95	1,415	0,172
	m	9	48,55			
G	f	13	21,158	20,805	2,454	0,023*
	m	10	17,89			
IG	f	13	33,092	20,621	1,569	0,132
	m	10	30,29			
IU	f	13	20,669	20,031	0,601	0,555
	m	10	19,495			
IP	f	13	13,654	20,56	0,928	0,364
	m	10	12,64			
IAB	f	13	22,858	20,789	1,092	0,287
	m	10	20,485			
IF	f	13	25,788	29,941	0,386	0,704
	m	9	24,878			
IAN	f	13	21,612	17,715	2,849	0,012*
	m	9	17,934			

Tabela 7: Continuação.

medidas	sexo	n	$\bar{x}$	gl	t	p
LCF	f	13	33,85	19,882	0,922	0,368
	m	9	31,722			
CCF	f	13	39,835	19,999	0,946	0,355
	m	9	37,617			
ACF	f	13	17,288	16,785	0,764	0,456
	m	9	16,256			
LIO	f	13	6,512	19,993	-0,0184	0,9855
	m	9	6,522			
LPAR	f	13	5,892	15,868	-2,831	0,012*
	m	9	6,767			
AT	f	11	6,95	14,916	0,793	0,44
	m	9	6,528			
APT	f	11	2,914	16,888	1,586	0,131
	m	9	2,45			

A PCA resulta em seis PC, sendo que o primeiro PC responde por 99,9% da variação observada e é composto apenas por autovalores positivos, podendo ser considerado como uma medida de alometria. A PCA para as seis variáveis estudadas não mostra uma distinção clara entre as populações de *M. vanderhaegei* (**Figura 4**), por isso a separação de grupos para a LDA foi feita de acordo com a localidade dos exemplares. A **Tabela 8** mostra os autovalores para cada PC e as funções geradas pela LDA, enquanto que os índices de acerto para cada grupo encontra-se na **Tabela 9**. A validação cruzada mostra que a LDA foi capaz de separar a população s-BPg das demais populações em 70% dos casos, assim como reclassificou corretamente n-BPg (74%), BPt (75%) e BAm (60%) na maior parte dos casos (**Figura 5**).

A ANCOVA mostra que LMC, AMC e ACF são significativamente diferente entre as populações quando considerado o efeito de CC para as medidas da carapaça, e CCF para as medidas da cabeça (**Tabela 10**).

Figura 4: Análise de Componentes Principais (PCA) entre as populações de *M. vanderhaegei* considerando CC, LMC, AMC, CCF, LCF e ACF (vide Tabela 2).

Figura 5: Análise Discriminante (LDA) entre as populações de *M. vanderhaegei* considerando CC, LMC, AMC, CCF, LCF e ACF (vide Tabela 2).

Tabela 8: Componentes Principais (PC) e as funções discriminantes (LD)

-	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	LD1	LD2	LD3	LD4	LD5
CC	0,4256	-0,3299	0,33	-0,0503	0,1484	0,7593	16,3076	-24,323	3,0047	-32,544	-15,719
LMC	0,3849	-0,5141	0,1227	-0,5496	-0,1316	-0,5031	-0,5384	7,4607	-20,566	22,4015	12,1431
AMC	0,469	-0,1426	-0,84	0,2246	-0,0149	0,0581	4,9777	-4,3865	18,3041	1,933	6,2161
CCF	0,3559	0,0485	0,2781	0,4722	0,6446	-0,3939	-8,8453	23,0939	-3,9084	-14,031	27,0222
LCF	0,3874	0,1894	0,304	0,4248	-0,7294	-0,0963	19,1341	20,1276	4,6764	12,8567	-18,262
ACF	0,4172	0,7539	-0,025	-0,4914	0,1142	0,0497	-14,046	-5,5613	-4,6819	-3,0693	-7,3581
%	0,9989	7,00e-4	3,00e-4	1,00e-4	0	0	0,4175	0,289	0,2243	0,0516	0,0176

Tabela 9: Porcentagem de reclassificação das populações por meio da validação cruzada da LDA a partir de medidas lineares (CC, LMC, AMC, CCF, LCF e ACF – vide Tabela 2). Siglas: s-BPg – sul da Bacia do Paraguai; BSf – Bacia do São Francisco; n-BPg – norte da Bacia do Paraguai; BTa – Bacia do Tocantins-Araguaia; BPt – Bacia do Paraná, sub-bacia do Tietê; BPp – Bacia do Paraná, sub-bacia do Paranaíba; BAm – Bacia Amazônica.

-	s-BPg	BSf	n-BPg	BTa	BPt	BPp	BAm
s-BPg	0,700	0,100	0	0,200	0	0	0
BSf	0	0,444	0,333	0,111	0	0,111	0
n-BPg	0,105	0,053	0,737	0,053	0	0	0,053
BTa	0,125	0,125	0,250	0,250	0	0,125	0,125
BPt	0	0,250	0	0	0,750	0	0
BPp	0	0,167	0	0,333	0	0,500	0
BAm	0	0	0,200	0	0	0,200	0,600

Tabela 10: Resultados das ANCOVA para cada variável entre as populações usando CC ou CCF como covariância. gl – graus de liberdade; Sq – soma dos quadrados dos desvios; f – estimava F de Fisher; p – probabilidade do valor de f ser devido ao acaso. Os valores de p destacados com asteriscos indicam que o teste foi significativo ao valor de 0,05. Siglas das variáveis encontram-se descritas na Tabela 3.

	<i>gl</i>	<i>Sq</i>	$\bar{x}$ <i>Sq</i>	<i>f</i>	<i>p</i>
LMC					
CC	1	1,387	1,387	1738,961	3,39e-38*
População	6	0,014	0,002	2,996	0,015*
CC:População	6	0,015	0,002	3,109	0,012*
Resíduos	46	0,037	0,001		
AMC					
CC	1	2,246	2,246	1180,206	1,92e-34*
População	6	0,118	0,020	10,356	3,05e-7*
CC:População	6	0,084	0,014	7,374	1,46e-5*
Resíduos	46	0,088	0,002		
LCF					
CCF	1	1,624	1,624	1399,692	4,33e-36*
População	6	0,013	0,002	1,897	0,102
CCF:População	6	0,013	0,002	1,855	0,109
Resíduos	46	0,053	0,001		
ACF					
CCF	1	2,141	2,141	657,000	7,016e-29*
População	6	0,134	0,022	6,841	3,12e-5*
CCF:População	6	0,025	0,004	1,279	0,285
Resíduos	46	0,150	0,003		

4.2. Morfometria geométrica

Dos 72 espécimes adultos de *M. vanderhaegei* medidos, foi possível coletar os 109 *landmarks* de 58 (37 fêmeas e 21 machos). A PCA aplicada aos resíduos da GPA projetados no espaço tangencial também não forma grupos distintos (**Figura 6**). Visto que a Procrustes-ANOVA permite testar até dois fatores distintos, as hipóteses de dimorfismo sexual e de presença de espécies crípticas em *M. vanderhaegei* (grupos definidos *a priori*) foram testadas em uma única análise (**Tabela 11**). A **Tabela 11** reafirma a ausência de dimorfismo sexual em *M. vanderhaegei* tanto na espécie, quanto intra-populacional (interação população:sexo), além de confirmar a presença de heterogenia entre as populações da espécie. A Procrustes-ANOVA, porém, não identifica quais grupos diferem entre si. Para tanto, os 11 primeiros PC (que respondem por cerca de 70% da variação encontrada nos dados) foram usados em uma nova LDA (**Tabela 12**). A validação cruzada reclassifica corretamente 100% de s-BPg, 88% de s-BF, 75% de n-BPr e 68% de n-BPg, sendo que s-BAM foi aquela com menor acerto (20%) (**Figura 7**).

Tabela 11: Resultados da Procrustes-ANOVA entre as populações de *M. vanderhaegei*. Sq - soma dos quadrados observada; $\bar{x} Q$ - média dos quadrados calculados; f - teste F de Fisher; p - significância a 0,05

-	gl	Sq obs	$\bar{x} Q$	f	p
população	5	0,07981	0,01596	4,82629	0,00100
sexo	1	0,00596	0,00596	1,80135	0,17283
pop:sex	5	0,02103	0,00421	1,27204	0,71628
Total	52	0,24239	0,00466

Figura 6: Análise de Componentes Principais dos resíduos da GPA para as populações de *M. vanderhaegei*.

Tabela 12: Índice de reclassificação dos espécimes por meio da validação cruzada da LDA, usando os PC dos resíduos da GPA projetados no espaço tangencial. Siglas: s-BPg – sul da Bacia do Paraguai; BSf – Bacia do São Francisco; n-BPg – norte da Bacia do Paraguai; BTa – Bacia do Tocantins-Araguaia; BPt – Bacia do Paraná, sub-bacia do Tietê; BPp – Bacia do Paraná, sub-bacia do Paranaíba; BAm – Bacia Amazônica.

Populações	s-BPg	BSf	n-BPg	BTa	BPt	BPp	BAm
s-BPg	1	0	0	0	0	0	0
BSf	0	0,889	0	0,111	0	0	0
n-BPg	0	0,158	0,684	0,158	0	0	0
BTa	0	0,143	0,143	0,571	0	0	0,143
BPt	0	0	0,25	0	0,5	0,25	0
BPp	0	0,25	0	0	0	0,75	0
BAm	0,4	0	0	0,4	0	0	0,2

Figura 7: Análise Discriminante (LDA) entre as populações de *M. vanderhaegei* para os resíduos da GPA projetados no espaço tangencial de Kendal.

4.3. *Filogenia molecular*

Os cinco genes sequenciados, dois mitocondriais (12S, NADH) e três nucleares (c-mos, R35 e RAG-2), apresentaram dados expressivos para os 41 terminais (**Tabela 13**). Das populações de *M. vanderhaegei* amostradas, foi possível obter as sequências genéticas de quatro populações: s-BPg (Misiones), BSf (Minas Gerais), BPt (São Paulo), BAm (Mato Grosso). A matriz concatenada tem um comprimento total de 3499 caracteres não ambíguos. O comprimento total médio foi de 2131 pb (pares de base) para cada terminal, enquanto o comprimento médio de cada gene foi de 425 pb (12S), 256 pb (c-mos), 879 pb (R35) e 571 pb (RAG-2). A proporção de *gaps* e ambiguidade nos dados foi de 30,47%. O cladograma obtido com seus valores de *Bootstrap* associados a cada nó encontra-se ilustrado na **Figura 8**.

A análise de Máxima Verossimilhança implementada no RAxML produziu uma topologia com um escore de $-lnL = -16256.703962$. A topologia da árvore de ML foi enraizada na Cryptodira *Rhinoclemmys punctularia* e apresenta os agrupamentos a seguir. O clado Pleurodira aparece com um suporte de *Bootstrap* equivalente a 100. As famílias Podocnemididae e Chelidae formam dois clados monofiléticos bem sustentados, com valores de *Bootstrap* de 96 e 100, respectivamente. O único representante dos Pelomedusidae aparece como grupo-irmão do clado formado pela família Podocnemididae. Este último clado, sustentado por um *Bootstrap* de 100 corresponde ao grupo-irmão da família Chelidae, reproduzindo assim a hipótese já tradicionalmente aceita na literatura (Seddon *et al.*, 1997; Georges *et al.*, 1998; Gaffney *et al.*, 2006). Dentro da família Chelidae, o gênero *Hydromedusa* se posiciona como o táxon mais basal, irmão dos demais quelídeos da análise. Os gêneros *Chelus*, *Platemys*, *Acanthochelys*, *Mesoclemmys* e *Phrynops* formam um clado fortemente sustentado (*Bootstrap* de 100). Dentro deste clado, *Platemys* e *Acanthochelys* formam um clado sustentado por um valor de *bootstrap* mediano de 72. O gênero *Phrynops* apresenta um valor de *Bootstrap* alto (100) que sustenta seu monofilismo. Por outro lado, o gênero *Mesoclemmys* aparece como um grupo polifilético, com *M. hogei* formando um clado com os representantes do gênero *Phrynops* (*P. williamsi*, *P. hildebrandi* e *P. geoffroanus*), sustentado por um valor de *Bootstrap* mediano de 70. *Mesoclemmys vanderhaegei* aparece também como um grupo polifilético. As populações s-BPg, BPt e parte de BSf formam um clado com 100% de suporte. Este clado aparece como grupo-irmão de um clado formado por *M. perplexa*, *M. tuberculata* e os demais espécimes de BSf, apresentando um valor de suporte alto de 99. A população BAm aparece enraizada em uma posição mais inclusiva, como grupo externo das demais populações de *M. vanderhaegei*, *M. Perplexa* e *M. tuberculata*.

Figura 8: Árvore de verossimilhança inferida com base no alinhamento dos genes *c-mos*, *R35* e *RAG-2*. Os valores dos nós indicam os resultados de suporte de *Bootstrap*.

Tabela 13: Comprimento (em par de base) dos genes usados na análise filogenética. Os números de CTMZ referem-se aos tecidos depositados no Museu de Zoologia, e o número de acesso do GenBank para cada gene encontra-se entre parenteses.

Identificação	Espécie	12S	c-mos	R35	RAG-2	NADH	Referências
CTMZ14009	<i>Acanthochelys macrocephala</i>	473	393	1150	687	699	Presente estudo
GenBank	<i>Acanthochelys pallidipectoris</i>	391 (U40392)	363 (AF109204)	0	0	735 (EF535295)	Seddon <i>et al.</i> (1997) Georges <i>et al.</i> (1998) Huebinger <i>et al.</i> (2013)
GenBank	<i>Acanthochelys radiolata</i>	0	0	0	0	735 (EF535302)	Huebinger <i>et al.</i> (2013)
GenBank	<i>Acanthochelys spixii</i>	0	0	0	0	735 (EF535300)	Huebinger <i>et al.</i> (2013)
GenBank	<i>Chelus fimbriatus</i>	387 (CFU40636)	359 (AF109203)	969 (AY339640)	0	732 (EF535303)	Seddon <i>et al.</i> (1997) Georges <i>et al.</i> (1998) Fujita <i>et al.</i> (2004) Huebinger <i>et al.</i> (2013)
CTMZ07351	<i>Hydromedusa maximiliani</i>	476	396	1107	689	0	Presente estudo
GenBank	<i>Hydromedusa tectifera</i>	388 (U62017)	365 (AF109207)	0	0	0	Seddon <i>et al.</i> (1997) Georges <i>et al.</i> (1998)
GenBank	<i>Phrynops geoffroanus</i>	447 (JX139089)	361 (AF109205)	994 (JX139081)	694 (JX139076)	777 (JX139072)	Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (2012) Georges <i>et al.</i> (1998)
CTMZ08308	<i>Phrynops geoffroanus</i>	475	392	1104	426	0	Presente estudo
GenBank	<i>Phrynops hilarii</i>	435 (JN999705)	390 (JX139085)	0	694 (JX139077)	730 (JN999705)	Lourenço <i>et al.</i> (2012) Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (2012)
CTMZ13511	<i>Phrynops williamsi</i>	475	0	1150	0	0	Presente estudo
GenBank	<i>Mesoclemmys dahli</i>	370 (JX139086)	390 (JX139082)	962 (JX139078)	694 (JX139073)	647 (JX139071)	Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (2012)
CMTZ08353	<i>Mesoclemmys gibba</i>	418	395	1150	695	0	Presente estudo
CTMZ08933	<i>Mesoclemmys gibba</i>	472	388	1150	705	0	Presente estudo
CTMZ11653	<i>Mesoclemmys heliostemma</i>	461	395	1150	691	0	Presente estudo
CTMZ03156	<i>Mesoclemmys hoguei</i>	475	393	1108	697	0	Presente estudo
GenBank	<i>Mesoclemmys nasuta</i>	383 (U40645)	0	966 (AY339637)	0	0	Seddon <i>et al.</i> (1997) Fujita <i>et al.</i> (2004)
CTMZ03167	<i>Mesoclemmys perplexa</i>	476	396	1108	696	0	Presente estudo

Tabela 13: Continuação.

Identificação	Espécie	12S	c-mos	R35	RAG-2	NADH	Referências
CTMZ07566	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	477	335	1108	691	737	Presente estudo
CTMZ07567	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	477	395	1150	725	737	Presente estudo
CTMZ06671	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	477	381	0	710	0	Presente estudo
CTMZ07569	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	475	388	0	723	737	Presente estudo
CTMZ07572	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	466	0	0	697	737	Presente estudo
CTMZ08285	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	476	396	1150	685	737	Presente estudo
CTMZ08286	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	476	388	1108	681	737	Presente estudo
CTMZ08290	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	477	0	1107	683	737	Presente estudo
CTMZ08293	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	471	388	1108	697	737	Presente estudo
CTMZ08297	<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	474	394	1108	672	737	Presente estudo
CTMZ03157	<i>Mesoclemmys tuberculata</i>	471	0	1108	691	708	Presente estudo
CTMZ08326	<i>Mesoclemmys tuberculata</i>	0	394	1108	688	737	Presente estudo
GenBank	<i>Mesoclemmys zuliae</i>	445 (JX139087)	390 (JX139083)	881 (JX139079)	694 (JX139074)	777 (JX139070)	Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (201
GenBank	<i>Podocnemis erythrocephala</i>	395 (AM943822)	0	943 (AM943845)	636 (AM943841)	785 (FM165621)	Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (201
GenBank	<i>Podocnemis expansa</i>	397 (AM943820)	365 (AF109209)	953 (AY42456)	637 (AM943839)	661 (FM165620)	Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (201 Georges <i>et al.</i> (1998) Near <i>et al.</i> (2005)
GenBank	<i>Podocnemis lewyana</i>	397 (AM943817)	0	953 (AM943826)	636 (AM943825)	661 (FM165617)	Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (201
GenBank	<i>Platemys platycephala</i>	440 (GU213781)	0	1154 (GU213861)	0	735 (EF535297)	Wong <i>et al.</i> (2010) Huebinger <i>et al.</i> (2013)
GenBank	<i>Podocnemis sextuberculata</i>	396 (AM943819)	0	935 (AM943844)	636 (AM943840)	681 (FM165616)	Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (201
GenBank	<i>Podocnemis unifilis</i>	396 (AM943818)	0	945 (AY339634)	636 (AM943842)	661 (FM165623)	Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (201 Fujita <i>et al.</i> (2004)
GenBank	<i>Podocnemis vogli</i>	395 (AM943821)	0	943(AM943846)	636 (AM943838)	661 (FM165818)	Vargas-Ramirez <i>et al.</i> (201
CTMZ03161	<i>Pelomedusa subrufa</i>	475	0	0	689	0	Presente estudo
CTMZ08299	<i>Kinosternum scorpioides</i>	473	0	1108	656	0	Presente estudo
CTMZ09748	<i>Rhinoclemmys punctularia</i>	0	396	1078	695	737	Presente estudo

5. Discussão

5.1. *Dimorfismo sexual*

A presença de dimorfismo sexual é relativamente comum em Testudines, especialmente quanto à posição da cloaca em relação à carapaça – fêmeas apresentam a cloaca abaixo da porção posterior da carapaça enquanto nos machos a cloaca encontra-se afastada da linha do término da carapaça (Gibbons & Lovich, 1990; Corazza & Molina, 2004). Além disso, é comum encontrar espécies com diferenças no tamanho entre os sexos (*e.g.* Gibbons *et al.*, 1981; Shine, 1990; Cann, 1998; Georges *et al.*, 2006; Martins & Souza, 2008; Costa, 2013). Berry & Shine (1980) argumentam que as diferenças no tamanho entre os sexos podem estar relacionadas ao comportamento de reprodução das espécies, sendo resultado de seleção sexual. Segundo os autores, machos tenderiam a ser maiores em espécies onde há inseminação forçada e/ou combate entre os machos (comum em espécies terrestres e semi-aquáticas), enquanto fêmeas tendem a ser maiores nas espécies onde a escolha da fêmea é importante e os machos devem se exibir (comum em espécies aquáticas). Gibbons & Lovich, (1990) atestam que a diferença no tamanho de machos e fêmeas em quelônios não estaria relacionada à filogenia do grupo e que a idade e tamanho na maturação seriam fatores determinantes no tamanho do indivíduo. Sendo assim, quando machos e fêmeas apresentarem diferenças no tamanho corporal, o sexo de menor tamanho seria aquele a alcançar a idade de maturação mais jovem e em menor tamanho.

Em *Mesoclemmys vanderhaegei*, Brito (2004) levanta a hipótese de dimorfismo na espécie ao encontrar medidas maiores para fêmeas do que em machos em seu trabalho de ecologia populacional, o que estaria de acordo com Corazza & Molina (2004) e Marques *et al.*, 2013. No atual trabalho, o dimorfismo entre os sexos foi testado para a maior população amostrada (n-BPg), a qual coincide com o trabalho de Brito (2004). O teste t mostrou diferenças significativas em apenas três das 26 medidas lineares testadas, o que não justificaria considerar os sexos diferentes em relação ao tamanho. A ausência de dimorfismo sexual também é descartada, ao nível populacional e específico, para o conjunto de *landmarks*, por meio da análise de Procrustes-ANOVA (**Tabela 11**). Apesar de não significativo, as fêmeas de n-BPg apresentaram médias maiores que os machos para praticamente todas as medidas. As medidas que diferem entre machos e fêmeas (largura do parietal, comprimento da sutura entre os escudos anais e comprimento do gular) podem estar relacionadas a diferenças no desenvolvimento e/ou comportamentais (no caso da largura do parietal), ou com acomodação dos ovos,

o que poderia explicar um maior comprimento dos escudos na região ventral das fêmeas (IAN e G). Nenhuma dessas hipóteses, porém, faz parte do escopo do presente trabalho, devendo ser melhor investigadas em trabalhos futuros.

5.2. *O complexo M. vanderhaegei*

Os resultados da LDA para os dados de morfometria tradicional (70%) e geométrica (100%), **Tabelas 9 e 12**, respectivamente, mostram que a população mais próxima da localidade tipo da espécie (s-BPg) distingue-se das demais populações atribuídas a *M. vanderhaegei*. Estes resultados somados aos resultados da análise molecular (**Figura 8**) nos permite confirmar que *M. vanderhaegei*, em sua conformação atual, constitui um complexo de espécies.

Desde a sua redescrição por Bour & Pauler (1987), a distribuição de *M. vanderhaegei* vem sendo ampliada, especialmente nos anos 2000, e hoje abrange grande parte do cerrado brasileiro e cinco bacias hidrográficas (ver introdução). A grande dificuldade em se diferenciar as espécies de cágados, particularmente no campo, faz com que se formem conglomerados de espécies identificadas por um único nome, onde apenas uma investigação minuciosa do grupo poderia resultar em uma classificação mais adequada.

Mesoclemmys vanderhaegei (*sensu* Bour, 1973) teria, portanto, uma distribuição restrita para o Paraguai e o norte da Argentina. Durante uma das campanhas da equipe de herpetologia do MZUSP, foi encontrada uma fêmea (de 237 mm de CC), capturada com linha de pesca iscada com carne bovina, em uma lagoa artificial, no interior de uma fazenda em Bela Vista (MS), na divisa com o Paraguai. Este espécime (MZUSP 4573), segundo os resultados obtidos, seria o único exemplar de *M. vanderhaegei* registrado para o Brasil. A espécie, então, ocuparia os ambientes do Cerrado (Brasil e Paraguai), Mata Atlântica e Chaco Úmido (Argentina e Paraguai) desta região próxima à fronteira entre os três países. Registros no Paraguai e nas Argentina mostram que a espécie pode ser encontrada em córregos de fluxo moderado (Yanosky *et al.*, 2000) e em lagoas naturais e artificiais (Waller & Chebez, 1987; e o presente trabalho). Até o presente, foram estudadas somente duas populações do complexo (Brito *et al.*, 2009b; Marques *et al.*, 2013), sendo que nenhuma delas pertence à distribuição definida aqui. Nada se sabe, portanto, sobre a estrutura populacional de *M. vanderhaegei*, mas sim de espécies próximas ainda não descritas. Porém, foram registradas aglomerações de até 16 indivíduos de *M. vanderhaegei* (*sensu* Bour, 1973) (Métrailler, 2005), desovas de 3 (Bour & Pauler, 1987) a 6 ovos por ninhada (Cabrera 1998) e atração por carne em armadilhas (Vinke *et al.*, 2013; e o presente trabalho).

Os resultados obtidos mostram, também, que as populações brasileiras de *M. vanderhaegei* não são homogêneas entre si. As populações consideradas pela análise de máxima verossimilhança são divididas em três grupos monofiléticos, com a população do norte do Mato Grosso (BAm) como grupo externo às demais populações. Os exemplares da Bacia do São Francisco (BSf) aparecem em dois clados distintos: um clado com os exemplares de São João da Lagoa (MG) e os exemplares de São Paulo (BPt) formando um grupo irmão a *M. vanderhaegei sensu* Bour (1973) – representados na árvore pelos exemplares de Misiones e Corrientes (AR) –; e um outro clado (irmão ao primeiro), com os exemplares de Montes Claros (MG), *M. tuberculata* e *M. perplexa* como espécies distintas.

A perda de sequências genéticas para os espécimes de n-BPg – Chapada dos Guimarães e região de Cuiabá (MT) – não permite testar os resultados da LDA, a qual consegue altas taxas de acerto na reclassificação destes espécimes (74% pela morfometria tradicional, e 68% para os dados de morfometria geométrica – **Tabelas 9 e 12**, respectivamente). Dos 19 espécimes de BSf presentes em nossa amostragem, apenas três adultos eram de Montes Claros, por isso não foi testado com os dados morfométricos se Montes Claros formaria um grupo distinto de São João da Lagoa. Mesmo assim, observa-se uma alta taxa de acerto na reclassificação de BSf na LDA para os dados de morfometria geométrica (89%, **Tabela 12**). O baixo n amostral de BAm e BPt não permite testar com os dados morfométricos a hipótese filogenética para estas populações proposta pelos dados moleculares. Pelo mesmo motivo deve-se ter cautela ao considerar a alta reclassificação de BPp (sub-Bacia do Paranaíba), na LDA para os dados de morfometria geométrica (75%, **Tabela 12**), visto que os resultados não se repetem para os dados de medidas lineares (50%, **Tabela 9**) e não se tem dados genéticos para comparar.

Mittermeier *et al.* (1978) consideram o espécime de *Mesoclemmys* coletado em Cuiabá (MT) como pertencente a uma espécie ainda não descrita. Os autores, porém, não apresentam os motivos para tal afirmativa no trabalho em questão ou posteriormente. Além disso, não há trabalhos na literatura que conteste a identificação desta população como *M. vanderhaegei*, desde a redescrição da espécie por Bour & Pauler (1987). Os resultados morfométricos suportam Mittermeier *et al.* (1978) e a separam de *M. vanderhaegei sensu* Bour, 1973).

A população da Chapada dos Guimarães (MT), da qual fazem parte mais da metade dos exemplares de n-BPg (**Tabela 1**), está entre as populações brasileiras de *Mesoclemmys* com maior conjunto de informações ecológicas. Segundo os trabalhos de Brito (Brito *et al.*, 2004; Brito *et al.*, 2009b), os espécimes da Chapada dos Guimarães ocupam águas oligotróficas, podendo ser encontrado em corpos d'água artificiais, em concentração média de 25 a 30

indivíduos por córrego, com alimentação onívora, prevalecendo a predação sobre invertebrados aquáticos.

Os exemplares de São João da Lagoa analisados neste trabalho foram coletados com armadilhas iscadas a carne bovina e/ou de galinha, indicando que não são estritamente herbívoros. Os espécimes foram encontrados em corpos d'água isolados pela seca, mas que se conectam ao rio Sanharó durante as chuvas, cercados por mata de galeria (Cerrado). Esta é uma das diversas populações de *Mesoclemmys* que carecem de estudos ecológicos (Souza, 2004; Souza, 2005; Vinke *et al.*, 2013).

5.3. *Filogenia de Mesoclemmys*

Em uma das primeiras filogenias a considerar as relações entre os gêneros sul-americanos de Chelidae, apesar de suspeitar do parafiletismo de *Phrynops*, Gaffney (1977) trata os três subgêneros de *Phrynops* como um grupo monofilético e já identifica *Hydromedusa* como um grupo mais distante dos demais quelídeos da América do Sul. Exatos 20 anos depois, Seddon *et al.* realiza a primeira investigação baseada em informação genética para a família. Em seus resultados com o gene 12S, os autores alocam o então subgênero *Phrynops* como irmão de *Chelus*, e mais próximo de *Platemys* e *Acanthochelys* do que *Mesoclemmys* e *Batrachemys*. No ano seguinte, Georges *et al.* amplia a informação molecular ao sequenciar os genes 16S, CoI e c-mos. Os autores apresentam uma topologia onde *Chelus* aparece como grupo irmão dos demais gêneros (exceto *Hydromedusa*), e *Phrynops* formaria um grupo monofilético com *Platemys* e *Acanthochelys*, e irmão de *Batrachemys* e *Mesoclemmys*. Georges *et al.* (1998) reconhecem que *Mesoclemmys* e *Batrachemys* poderiam ser considerados um único gênero, mas optam, porém, por elevarem ambos ao nível genérico por estabilidade taxonômica.

Recentemente, Guillon *et al.* (2012) propuseram uma filogenia abrangente para Testudines, com mais de dois terços das espécies descritas, considerando apenas dados moleculares publicados no Genbank. Em seus resultados para Chelidae, os autores reafirmam o monofiletismo da família, a divisão entre as espécies australianas e sul-americanas em oposição à formação de um clado de pescoçudos, e sustentam *Hydromedusa* e *Chelus* (nessa ordem) como grupo externo aos demais táxons sul-americanos. As relações entre *Platemys*, *Acanthochelys* e *Phrynops* são mantidas como o proposto em Georges *et al.* (1998). Os autores analisam apenas três espécies de *Mesoclemmys*, o que foi suficiente para apontar o parafiletismo do gênero, uma vez que *M. hogei* aparece junto às espécies de *Phrynops*.

A filogenia molecular proposta no presente trabalho se destaca por investigar as relações de praticamente todas as espécies de *Mesoclemmys*, com exceção de *M. raniceps*, com ênfase nas populações de *M. vanderhaegei*. A topologia resultante concorda com o proposto por Bour & Zaher (2005) e mostra ser válido manter a sinonímia de *Batrachemys* em *Mesoclemmys*. *Phrynops* aparece como grupo-irmão de *Mesoclemmys*, ao invés de *Platemys* e *Acanthochelys*, mas com baixo valor de suporte de *Bootstrap* (19%). Como o proposto por Guillon *et al.* (2012), a única espécie que não forma um grupo monofilético com *Mesoclemmys* é *M. hogei*, sendo esta inserida no clado de *Phrynops* com *Bootstrap* de 76%. Como o esperado, as espécies geograficamente mais próximas, em geral, são mais relacionadas entre si do que aquelas de localidades mais distantes. Este é o caso, por exemplo, de *M. dahli* e *M. zuliae*, espécies localizadas ao norte da América do Sul e para as quais é estimada uma divergência recente (Vargas-Ramírez *et al.*, 2012).

Mesoclemmys vanderhaegei aparece no cladograma como uma espécie polifilética, suportando a hipótese do táxon representar um complexo de espécies. A população da Bacia Amazônica (representada por um espécime de Paranaíta (MT)) é a que se encontra mais próxima das espécies da região amazônica e está como grupo externo às demais populações do complexo. A população de Montes Claros (MG, Bacia do São Francisco), também se encontra próximo filogeneticamente a espécies com proximidade geográfica, formando um clado monofilético com *M. tuberculata* e *M. perplexa*. A proximidade geográfica correlacionada à proximidade filogenética, porém, não se aplica inteiramente na filogenia apresentada uma vez que os espécimes de São João da Lagoa (MG), em conjunto com os espécimes de BPt (São Paulo) e s-BPg (Misiones, Argentina), formam um clado distinto no qual inserem-se os espécimes de Montes Claros (*i.e.* mesmo considerando que uma cidade está a cerca de 100km da outra).

5.4. Diagnose morfológica das espécies do complexo *M. vanderhaegei*

Uma vez que deve se considerar as populações da Bacia do São Francisco e do norte da Bacia do Paraguai como espécies distintas, optou-se por alterar a denominação dos grupos para *Mesoclemmys sp. nov. 1* e *Mesoclemmys sp. nov. 2*, respectivamente. A população do sul da Bacia do Paraguai passa a ser referida, então, como *M. vanderhaegei*.

Foi observada grande variação nas medidas referentes aos escudos entre as espécies de *Mesoclemmys*, tais como o comprimento das suturas entre os escudos do plastrão, comprimento e largura dos escudos vertebrais e relações entre os escudos. Estas diferenças morfológicas

encontram-se de acordo com Molina *et al.* (2012), que sugerem que estas medidas não devem ser usadas para a delimitação de espécies do gênero. A altura do tímpano em relação à boca (APT/AT), apesar de variar em *M. tuberculata*, parece ser um importante caráter para caracterizar a *Mesoclemmys* sp. nov. 1 e separá-la de *M. perplexa*, *M. heliostemma*, *M. raniceps* e *M. vanderhaegei* e *Mesoclemmys* sp. nov. 2, podendo ser considerada como um dos caracteres diagnósticos da espécie.

Encontra-se a seguir a comparação morfométrica entre os táxons do complexo *M. vanderhaegei*, e destes com as demais espécies do gênero. As comparações foram baseadas somente em exemplares adultos e as informações de *M. dahli*, *M. nasuta* e *M. zuliae* foram retiradas da bibliografia (Zangerl & Mendem, 1958; Fretey, 1977; Pritchard & Trebbau, 1984) (**Tabela 14**).

Os resultados da ANOVA (**Tabela 10**) mostram que há diferenças na altura do casco e largura da carapaça entre as populações do complexo *M. vanderhaegei*. Analisando a **Tabela 14**, porém, observa-se que *Mesoclemmys* sp. nov. 1 e *Mesoclemmys* sp. nov. 2 apresentam alturas similares e menores do que *M. vanderhaegei* (*sensu* Bour, 1973), e que a primeira é a mais larga entre as outras duas, sendo que estas apresentam larguras aproximadas entre si.

Além disso, Os espécimes de *Mesoclemmys* sp. nov. 1 diferem de todas as demais espécies de *Mesoclemmys* pela maior largura do parietal, exceto *M. gibba* e *M. hogei*, e menor largura cefálica, exceto *M. hogei*, *M. vanderhaegei*, *Mesoclemmys* sp. nov. 2, e menor altura relativa do tímpano, exceto em *M. gibba* e *M. tuberculata* (i.e sendo esta a primeira vez que esta medida é considerada para o gênero, não é possível sua comparação com as espécies não amostradas por este trabalho). A espécie difere de *M. gibba* na menor largura do parietal, da carapaça e largura da ponte. Difere de *M. hogei* em uma maior largura cefálica, e menor largura do parietal, da ponte do casco. Além disso, Sp1 difere de *M. heliostemma* por uma menor largura do plastrão e da carapaça; de *M. perplexa* por menor largura cefálica, maior largura da carapaça e plastrão, e maior altura do casco; difere de *M. raniceps* por uma menor altura do casco; e de *M. tuberculata* pela menor altura do casco, largura da ponte e comprimento do plastrão.

Mesoclemmys sp. nov. 2 apresenta menor largura cefálica do que *M. dahli*, *M. heliostemma*, *M. nasuta*, *M. raniceps*, *M. tuberculata* e *M. zuliae*; e maior largura cefálica quando comparada a *M. hogei*. Difere de *M. gibba* pela menor largura do parietal, da ponte e altura do casco. De *M. heliostemma* por largura do plastrão e da carapaça, e maior largura do parietal. De *M. tuberculata* por maior largura do parietal, e menor largura da ponte e altura do casco. Difere de *M. dahli*, também, pela menor maior largura da ponte, e o inverso quando comparada a *M. hogei*, Difere de *M. perplexa* por maior largura do plastrão, e de *M. raniceps*

pela maior altura da carapaça. *Mesoclemmys* sp. nov. 2 difere de *M. vanderhaegei* pela maior largura do parietal e menor altura do casco.

Tabela 12: Relações corporais das espécies de *Mesoclemmys*.

Espécie	-	CSMV/CC	AMC/CC	AMC/LMC	LCF/CC	LPAR/LCF	LIO/LCF	LPTE/CMP	APT/AT	LP/CMP	IG/IAB	LGH/LFA	LMC/CC
<i>Mesoclemmys sp. nov 1</i>	maior	0.858	0.305	0.472	0.202	0.244	0.219	0.318	0.284	0.682	1.900	1.322	0.749
	média	0.840	0.293	0.416	0.189	0.182	0.202	0.283	0.233	0.644	1.560	1.108	0.715
	menor	0.790	0.269	0.392	0.174	0.145	0.184	0.251	0.183	0.615	1.307	0.921	0.670
<i>Mesoclemmys sp. nov 2</i>	maior	0.846	0.322	0.475	0.211	0.247	0.230	0.304	0.500	0.679	1.970	1.236	0.741
	média	0.813	0.298	0.428	0.198	0.194	0.197	0.289	0.400	0.642	1.506	1.065	0.698
	menor	0.770	0.268	0.362	0.179	0.116	0.150	0.256	0.233	0.590	1.103	0.856	0.657
<i>M. vanderhaegei</i>	maior	0.875	0.359	0.527	0.218	0.164	0.243	0.325	0.544	0.692	1.573	1.110	0.736
	média	0.818	0.332	0.482	0.200	0.098	0.215	0.301	0.378	0.643	1.254	0.982	0.689
	menor	0.783	0.296	0.430	0.188	0.060	0.183	0.289	0.100	0.570	0.996	0.883	0.665
<i>M. dahli</i>	maior	0.804	0.342	0.463	0.370	--	--	0.242	--	--	--	--	0.768
	média	0.779	0.315	0.432	0.281	--	--	0.230	--	--	--	--	0.730
	menor	0.740	0.304	0.395	0.228	--	--	0.207	--	--	--	--	0.679
<i>M. gibba</i>	maior	0.895	0.374	0.508	0.211	0.406	0.270	0.373	0.426	0.731	1.888	1.197	0.802
	média	0.845	0.341	0.458	0.192	0.314	0.198	0.326	0.268	0.659	1.320	1.028	0.743
	menor	0.783	0.310	0.411	0.157	0.261	0.148	0.287	0.205	0.532	1.000	0.829	0.702
<i>M. heliostemma</i>	maior	0.846	0.327	0.433	0.249	0.149	0.213	0.311	0.386	0.733	1.844	1.310	0.792
	média	0.817	0.314	0.409	0.239	0.105	0.202	0.287	0.372	0.703	1.566	1.229	0.767
	menor	0.793	0.285	0.380	0.234	0.057	0.187	0.260	0.349	0.684	1.324	1.099	0.742
<i>M. hogei</i>	maior	0.864	0.335	0.468	0.165	0.288	0.282	0.378	0.383	0.674	1.036	1.244	0.746
	média	0.834	0.302	0.422	0.153	0.222	0.234	0.347	0.346	0.656	0.860	1.167	0.714
	menor	0.798	0.281	0.401	0.142	0.170	0.187	0.331	0.302	0.622	0.756	1.129	0.693

Tabela 12: Continuação.

Espécie	-	CSMV/CC	AMC/CC	AMC/LMC	LCF/CC	LPAR/LCF	LIO/LCF	LPTE/CMP	APT/AT	LP/CMP	IG/IAB	LGH/LFA	LMC/CC
<i>M. nasuta</i>	maior	0.873	0.356	0.477	0.262	--	--	--	--	--	--	--	0.791
	média	0.828	0.299	0.397	0.246	--	--	--	--	--	--	--	0.753
	menor	0.804	0.234	0.301	0.218	--	--	--	--	--	--	--	0.701
<i>M. perplexa</i>	maior	0.835	0.289	0.457	0.212	0.259	0.202	0.288	0.539	0.618	1.506	1.112	0.716
	média	0.810	0.273	0.408	0.197	0.231	0.186	0.271	0.468	0.605	1.340	1.039	0.673
	menor	0.794	0.264	0.372	0.188	0.204	0.155	0.251	0.413	0.586	1.222	0.910	0.634
<i>M. raniceps</i>	maior	0.858	0.394	0.565	0.295	0.067	0.258	0.352	0.472	0.694	1.470	1.106	0.768
	média	0.823	0.341	0.477	0.273	0.047	0.226	0.301	0.374	0.663	1.140	0.999	0.719
	menor	0.787	0.304	0.425	0.253	0.027	0.200	0.248	0.301	0.618	0.874	0.912	0.690
<i>M. tuberculatta</i>	maior	0.903	0.391	0.549	0.250	0.131	0.273	0.351	0.538	0.701	1.482	1.149	0.774
	média	0.871	0.353	0.487	0.233	0.077	0.207	0.318	0.311	0.668	1.256	1.020	0.726
	menor	0.832	0.316	0.439	0.209	0.027	0.182	0.287	0.141	0.639	0.962	0.890	0.699
		/CMC			/CMC						/CMC		
<i>M. zuliae</i>	maior	0.796	--	--	0.294	--	--	--	--	--	--	--	0.724
	média	0.779	--	--	0.274	--	--	--	--	--	--	--	0.716
	menor	0.753	--	--	0.257	--	--	--	--	--	--	--	0.712

6. Conclusões

Os resultados obtidos pelas análises morfométricas e molecular apresentados neste trabalho não suportam o monofiletismo de *Mesoclemmys vanderhaegei* segundo a distribuição considerada para a espécie. Além disso, o presente estudo nos permite as seguintes conclusões:

- Pelo conhecimento atual da literatura, *Mesoclemmys vanderhaegei*, conforme descrição de Bour 1973, ocupa do norte da Argentina até o centro do Paraguai, devendo ser melhor investigada sua presença ou não no norte do Paraguai (Vinke *et al.*, 2013)
- A presença de *Mesoclemmys vanderhaegei* (*sensu* Bour, 1973) no Brasil foi confirmada pela coleta do exemplar MZUSP 4573, em Bela Vista, oeste do Mato Grosso do Sul
- As populações brasileiras atribuídas à espécie não formam um grupo monofilético entre si
- Nossos resultados confirmam a afirmativa de Mittermeier *et al.* (1978) e apontam os espécimes da região da Chapada dos Guimarães (MT, n-BPg) como um grupo distinto de *M. vanderhaegei* e dos espécimes de São João da Lagoa (MG, BSf)
- O complexo *Mesoclemmys vanderhaegei* não se destaca filogeneticamente das outras espécies do gênero e, portanto, não devem serem incluídas em um novo gênero
- Os resultados de Máxima Verossimilhança suportam a sinonímia de *Batrachemys* em *Mesoclemmys*, conforme proposto em Bour & Zaher (2005)
- Segundo as análises moleculares, *Mesoclemmys* forma um grupo monofilético apenas se não incluir *M. hogei*, o qual é apontado como pertencente a *Phrynops*
- O presente trabalho ilustra a carência de conhecimento, tanto ecológico quanto taxonômico, das populações de cágados brasileiros
- Faz-se necessário ampliar a amostra das populações, especialmente no Cerrado, para estudar sua posição taxonômica

M. vanderhaegei apresenta uma distribuição mais restrita do que se acreditava, sendo mais suscetíveis a pressão antrópica

7. Referências Bibliográficas

- Angielczyk, K.D.; Feldman, C.R. & Gretchen, R.M. 2010. Adaptive evolution of plastron shape in emydine turtles. *Evolution*, 64(1): 1-18.
- Albrecht, P.W. 1976. The cranial arteries of turtles and their evolutionary significance. *Journal Morphology*, 149: 159-182.
- Anderson, M.J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26: 32-46.
- Baldo, D. & Krauczuk, E. 2000. New record from *Phrynops vanderhaegei* in Argentina. *Herpetological Review*, 31(3): 184.
- Baldo, D.; Martinez, P.; Boeris, J.M. & Giraudo, A.R. 2007. Reptilia, Chelonii, Chelidae, *Phrynops vanderhaegei* (Bour, 1973): Distribution extension, new country record, and new province records in Argentina. *Check List*, 3 (4): 348-352.
- Benson, R.B.J.; Domokos, G.; Várkonyi, P.L. & Reisz, R.R. 2011. Shell geometry and habitat determination in extinct and extant turtles (Reptilia: Testudinata). *Paleobiology*, 37(4): 547-562.
- Berry, J.F.; Shine, R. 1980. Sexual dimorphism and sexual selection in turtles (Order Testudines). *Oecologia*, 44: 185-191.
- Bickham, J.W.; Iverson, J.B.; Parham, J.F.; Philippen, H.D.; Rhodin, A.G.J.; Shaffer, H.B.; Spinks, P.Q. & van Dijk, P.P. 2007. *In*: Shaffer, H.B.; Simmons, N.F.; Georges, A. & Rhodin, A.G.J. (Eds). *Defining turtle diversity: Proceedings of a Workshop on Genetics, Ethics, and Taxonomy of Freshwater Turtles and Tortoises*. Chelonian Research Monographs, 4: 173-199.
- Bona, P. & de la Fuente, M.S. 2005. Phylogenetic and paleobiogeographic implications of *Yaminuechelys maior* (Staesche, 1929) new comb, a large long-necked chelid turtle from

the early Paleocene of Patagonia, Argentina. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 25: 569-582.

Bonin, F.; Devaux, B. & Dupré, A. 2006. *Turtles of the world*. Transl. Pritchard, Baltimore, The Johns Hopkins University Press.

Bookstein, F.L. 1991. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. New York, Cambridge University Press.

Bour, R. 1973. Contribution à la connaissance de *Phrynops nasutus* (Schweigger, 1812) et *Phrynops tuberculatus* (Luederwaldt, 1926). Description d'une nouvelle sous-espèce originaire du Paraguay, *Phrynops tuberculatus vanderhaegei* (Testudinata-Pleurodira-Chelidae). *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 98 (1): 175-190.

Bour, R. & Pauler, I. 1987. Identité de *Phrynops vanderhaegei* Bour, 1973, et des espèces affines (Reptilia-Chelonii-Chelidae). *Mesogee*, 47: 3-23.

Bour, R. & Zaher, H. 2005. A new species of *Mesoclemmys*, from the open formations of northeastern Brazil (Chelonii, Chelidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 45(24): 295-311.

Brandão, R.A.; Zerbini, G.J.; Sebben, A. & Molina, F.B. 2002. Notes on distribution and habitats of *Acanthochelys spixii* and *Phrynops vanderhaegei* (Testudines, Chelidae) in Central Brazil. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 13(1-2): 11-15.

Brito, E.S. 2004. Aspectos de História Natural de *Buphocephala vanderhaegei* (Testudines, Chelidae) em áreas de Cerrado na região central de Mato Grosso. Monografia apresentada para obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Mato Grosso, 39f.

Brito, E.S.; Strussmann, C. & Baicere-Silva, C.M. 2009a. Courtship behavior of *Mesoclemmys vanderhaegei* (Bour, 1973) (Testudines: Chelidae) under natural conditions in the Brazilian Cerrado. *Herpetology Notes*, (2): 67-72.

- Brito, E.S.; Strussmann, C. & Penha, J.M.F. 2009b. Population structure of *Mesoclemmys vanderhaegei* (Bour, 1973) (Testudines:Chelidae) in the cerrado of Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brazil. *Biota Neotropica*, 9 (4): 245-248.
- Broin, F. de. 1988. Les tortues et le Gondwana. Examen des rapports entre le fractionnement du Gondwana au Crétacé et la dispersion géographique des tortues pleurodires à partir du Crétacé. *Studia Salmanticensia, Studia Palaeocheloniologica*, 2(5): 103–142.
- Broin, F. de, and M. de la Fuente. 1993. Les tortues fossiles d'Argentine: synthèse. *Annales de Paléontologie*, 79(3): 169–232.
- Broin, F. de, & de la Fuente, M. 2001. Oldest world Chelidae (Chelonii, Pleurodira), from the Cretaceous of Patagonia, Argentina. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Earth and Planetary Sciences*, 333: 463–470.
- Buhlmann, K.A.; Akre, T.S.B.; Iverson, J.B.; Karapatakis, D. & Russell, A. 2009. A global analysis of tortoise and freshwater turtle distributions with identification of priority conservation areas. *Chelonian Conservation and Biology*, 8 (2): 116-149.
- Burbidge, A.A.; Kirsch, J.A.W. & Main, A.R. 1974. Relationships within the Chelidae (Testudines: Pleurodira) of Australia and New Guinea. *Copeia*, 2(1974): 392-409.
- Cabrera, M.R. 1998. Las tortugas continentales de Sudamerica Austral. Córdoba, BR Copias.
- Caccone, A.; Gentile, G.; Burns, C.E.; Sezzi, E.; Bergman, W. & Powell, J.R. 2004. Extreme difference in rate of mitochondrial and nuclear DNA evolution in a large ectotherm, Galápagos tortoises. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 794-798.
- Cann, J. 1978. *Tortoises of Australia*. London, Angus and Robertson. 79p.
- Cann, J. (1998). 'Australian Freshwater Turtles.' (Beaumont Publishing: Singapore.)
- Claude J. 2008. *Modern Morphometrics with R*. New York ,Springer. 316p.

- Claude, J.; Paradis, E. Tong, H. & Jean-Christophe, A. 2003. A geometric morphometric assessment of the effects of environment and cladogenesis on the evolution of the turtle shell. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79: 485-501.
- Corazza, S.S. & Molina, F.B. 2004. Biolorgia reprodutiva e conservação *ex-situ* de *Bufocephala vanderhaegei* (Testudines, Chelidae). *Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)* 71 (supl.): 407-409.
- Costa, S.F. 2013. Área de vida, movimentação e seleção de habitat do cágado *Hydromedusa maximiliani* (Testudines: Chelidae) no Parque Estadual Carlos Botelho, SP. Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em: Conservação de Ecossistemas Florestais, 104f.
- Depecker, M.; Berge, C.; Penin, X. & Renous, S. 2006. Geometric morphometrics of the shoulder girdle in extant turtles (Chelonii) *Journal of Anatomy*, 208(1): 35-45.
- Derr, J.N.; Bickham, J. W.; Greenbaum, I. F.; Rhodin, A. G. J. & Mittermeier, R. A. 1987. Biochemical Systematics and Evolution in the South American Turtle Genus *Platemys* (Pleurodira: Chelidae). *Copeia*, 2(1987): 370-375.
- Frair, W. 1980. Serological survey of pleurodiran turtles. *Comparative Biochemical Physiology*, 65B: 505-511.
- de la Fuente, M.S.; Barbieri, R. & Chafraat, P. 2010. Una tortuga Chelidae (Testudines: Pleurodira) de cuello largo en el Grupo Neuquén, Río Negro, Argentina. Significado cronológico y paleobiogeográfico. *Andean Geology*, 37: 398-412.
- de la Fuente, M.S., Umazano, A.M., Sterli, J. & Carballido, J.I. 2011. New chelid of the lower section of the Cerro Barcino formation (Aptian-Albian?), Patagonia. *Cretaceous Research*, 32: 527–537.
- de la Fuente, M.S., Sterli, J. & Maniel, I. 2014. Origin, Evolution and Biogeographic History of South American Turtle. New York, Springer. 167p. (Springer Earth System Sciences).

- Drummond, A.J.; Ashton, B.; Buxton, S.; Cheung, M.; Cooper, A.; Duran, C.; Field, M.; Heled, J.; Kearse, M.; Markowitz, S.; Moir, R.; Stones-Havas, S.; Sturrock, S.; Thierer, T. & Wilson, A. 2011. Geneious version 5.4. Disponível na World Wide Web em <http://www.geneious.com/> [23/abril/2012].
- Dryden, I.L. & Mardia, K.V. 1998. Statistical shape analysis. New York, Wiley Press.
- Ernst, C.H. & Barbour, R.W. 1989. Turtles of the world. Washington, DC., Smithsonian Institution Press.
- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist*, 125(1): 1-15.
- Fielder, D. 2013. Ancient phenotypes revealed through present day species – a morphological analysis of Australia's saw-shelled turtles including the threatened *Myuchelys bellii* (Testudines: Chelidae). *Chelonian Conservation and Biology*, 12(1): 101-111.
- Fretey, J.; Hoogmoed, M.S & Lescure, J. 1977. Etude taxinomique de *Rhinoclemmys punctularia punctularia* (daudin) (Testudinata, Emydidae). *Zoologische Mededelingen*, 52(6): 63-80
- Friar, W. 1964. Turtle family relationships as determined by serological tests. *In*: Leone, C. A (Ed.). *Taxonomic biochemistry and serology*. New York, Ronald Press Co.
- Freeman, A. & Cann, J. 2014. *Myuchelys latisternum* (Gray 1867) – Sawshelled Turtle, Saw-Shell Turtle. *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group*. *Chelonian Research Monographs*, 5: 73.1–73.8.
- Freiberg, M.A. 1979. *El mundo de las tortugas*. 3ed. Buenos Aires, Editorial Albatros. 142p.
- Fritz, U. & Havas, P. 2007. Check list of Chelonians of the world. *Vertebrate Zoology*, 57 (2): 149-368.

- Fritz, U. & Pauler, I. 1992. *Phryops chacoensis* spec. nov. (Reptilia, Chelidae), a new species of toad-headed turtle. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin*, 68 (2): 299-307.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- Fujita, M.K.; Engstrom, T.N.; Starkey, D.E. & Shaffer, B.S. 2004. Turtle phylogeny: insights from a novel nuclear intron. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 1031-1040.
- Gaffney, E.S. 1972. The systematics of the North American family Baenidae (Reptilia, Cryptodira). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 147(5): 241–320.
- Gaffney, E.S. 1975. A phylogeny and classification of the higher categories of turtles. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 155(5): 389–436.
- Gaffney, E.S. 1977. The side-necked turtle family Chelidae: A theory of relationships using shared derived characters. *American Museum Novitates*, 2620: 1-28.
- Gaffney, E.S. 1979. Comparative cranial morphology of recent and fossil turtles. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 164(2): 1-376.
- Gaffney, E.S., Tong, H. & Meylan, P.A. 2006. Evolution of the side-necked turtles: The Families Bothremydidae, Euraxemydidae and Araripemydidae. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 300: 1-698.
- Gaffney, E.S.; Meylan, P.A.; Wood, R.C.; Simons, E & Campos, D.A. 2011. Evolution of the side-necked turtles: The Familie Podocnemididae. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 350: 1-237.
- Georges, A.; Adams, M. 1992. A phylogeny for the Australian chelid turtles based on allozyme electrophoresis. *Australian Journal of Zoology*, 40: 453-4 76.
- Georges, A. & Adams, M. 1996. Electrophoretic delineation of species boundaries within the short-necked freshwater turdes of Australia (Testudines: Chelidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 118: 241-260.

- Georges, A. & Adams, M. & McCord, W. 2002. Electrophoretic delineation of species boundaries within the genus *Chelodina* (Testudines : Chelidae) of Australia, New Guinea and Indonesia. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 134: 401–421.
- Georges, A.; Birrell, J.; Saint, K.M.; McCord, W.P. & Donnellan, S.C. 1998. A phylogeny for side-necked turtles (Chelonia: Pleurodira) based on mitochondrial and nuclear gene sequence variation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 67: 213-246.
- Georges, A.; Guarino, F. & White, M. 2006. Sex-ratio bias across populations of a freshwater turtle (Testudines: Chelidae) with genotypic sex determination. *Wildlife Research*, 33: 475-480.
- Georges, A. & Thomson, S. 2010. Diversity of Australasian freshwater turtles with an annotated synonymy and keys to species. *Zootaxa*, 2496: 1-37.
- Georges, A.; Zhang, X.; Unmack, P.; Reid, B. N.; Le, M. & Mccord, W. P. 2014. Contemporary genetic structure of an endemic freshwater turtle reflects Miocene orogenesis of New Guinea. *Biological Journal of the Linnean Society*, 111: 192–208.
- Gibbons, J.W. & Lovich, J.E. 1990. Sexual dimorphism in turtles with emphasis on the slider turtle (*Trachemys scripta*). *Herpetological Monographs*, 4: 1-29.
- Gibbons, J.W.; Semlitsch, R.D.; Greene, J.L. & Schubauer, J. P. 1981. Variation in age and size at maturity of the slider turtle (*Pseudemys scripta*). *The American Naturalist*, 117(5): 841-845.
- Goodall, C. 1991. Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 53(2): 285-339.
- Goode, J. 1967. Freshwater tortoises of Australia and New Guinea (in the family Chelidae). Melbourne, Lansdowne Press.
- Gray, E.S. 1873. Observations on chelonians, with descriptions of new genera and species. *Annals and Magazine of Natural History Serie 4*, 11: 289-308.

- Guillon, J.M.; Guéry, L.; Hulin, V. & Girondot, M. 2012. A large phylogeny of turtles (Testudines) using molecular data. *Contributions to Zoology*, 81(3): 147-158.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hillis, D.M.; Mable, B.K. & Moritz, C. 1996. Applications of molecular systematics. *In*: Hillis, D.M.; Moritz, C. & Mable, B.K. (Eds). *Molecular Systematics*. Sunderland, Mass, Sinauer Ass. Inc. p. 515-544.
- Hotelling, H. 1933. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *The Journal of Educational Psychology*, 24: 417-441.
- Huebinger, R.M.; Bickham, J.W.; Rhodin, A.G.J. & Mittermeier, R.A. 2013. Mitochondrial DNA corroborates taxonomy of the South American chelid turtles of the genera *Platemys* and *Acanthochelys*. *Chelonian Conservation and Biology*, 12(1): 168-171.
- ICZN 2013. OPINION 2315 (Case 3351) *Chelodina rugosa* Ogilby, 1890 (currently *Macrochelodina rugosa*; Reptilia, Testudines): precedence not granted over *Chelodina oblonga* Gray, 1841. *Bulletin of Zoological Nomenclature*, 70(1): 57-60.
- IUCN 2014. IUCN red list of threatened species, versão 2014.1. Disponível na World Wide Web em www.iucnredlist.org [15/jul/2014].
- Ivanova, N.V.; Zemlak, T.S.; Hanner, R.H. & Hebert, P.D.N. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 6: 998-1002.
- Iverson, J.B. 1986. A checklist with distribution maps of the turtles of the world. Richmond, J.P. Iverson Publishers. 283p.
- Iverson, J.B. 1992. A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world. Richmond, J.P. Iverson Publishers. 363p.
- Jolliffe, I. T. 2002. Principal component analysis. 2.ed. New York, Springer. 489p.

- Jolicoeur, P. & Moismann, J.E. 1960. Size and shape variation in the painted turtle. A principal component analysis. *Growth*, 24(4): 339-354.
- Krenz, J.G.; Naylor, G.J.P.; Shaffer, H.B. & Janzen, F.J. 2005. Molecular phylogenetics and evolution of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(1): 178–191.
- Kuchling, G. 2010. Taxonomy and nomenclature of the longneck turtle (Genus *Chelodina*) from south-western Australia. *Records of the Western Australian Museum*, 25:449-454.
- Legler, J.M. 1981. The taxonomy, distribution, and ecology of Australian freshwater turtles (Testudines: Pleurodira: Chelidae). *National Geographic Society Research Reports*, 13(1972): 391-404.
- Le, M.; Reid, B. N.; McCord, W. P.; Naro-Maciel, E.; Raxworthy, C. J.; Amato, G. & Georges, A. 2013. Resolving the phylogenetic history of the short-necked turtles, genera *Elseya* and *Myuchelys* (Testudines: Chelidae) from Australia and New Guinea. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68: 251–258.
- Lema, T. 1994. Lista comentada dos répteis recorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS. Sér. Zoologia*, 7: 41-150.
- Lourenco, J.M.; Claude, J.; Galtier, N & Chiari, Y. 2012. Dating cryptodiran nodes: origin and diversification of the turtle superfamily Testudinoidea. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62(1): 496-507.
- Machado, F.A. & Hingst-Zaher, E. 2009. Investigating South American biogeographic history using patterns of skull shape variation on *Cerdocyon thous* (Mammalia: Canidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 98: 77-84.
- Mao, S.H. & Chen, B.Y. 1982. Serological relationships of turtles and evolutionary implications. *Comparative Biochemical Physiology*, 71B: 173-179.

- Marcus, L.F. 1990. Traditional morphometrics. *In*: Rohlf, F.J. & Bookstein, F.L. (Eds.).
Proceedings of the Michigan morphometrics workshop. Ann Arbor, University of Michigan
Museum of Zoology. p. 77-122. (Special Publication Number 2).
- Martins, F.I. & Souza, F.L. 2008. Estimates of growth of the Atlantic Rain Forest freshwater
turtle *Hydromedusa maximiliani* (Chelidae). *Journal of Herpetology*, 42(1): 54-60.
- McBee, K.; Bickham, J.W.; Rhodin, A.G.J. & Mittermeier, R.A. 1985. Karyotypic variation in
the genus *Platemys* (Testudines: Pleurodira). *Copeia*, 2(1985): 445-449.
- McCord, W.P.; Joseph-Ouni, M. & Lamar, W.W. 2001. A Taxonomic Reevaluation of *Phrynops*
(Testudines: Chelidae) with the description of two new genera and a new species of
Batrachemys. *Revista de Biología Tropical*, 49 (2): 715-764.
- McCord, W.P. & Joseph-Ouni, M. 2007. A new genus of Australian longneck turtle
(Testudines: *Chelidae*) and a new species of Macrochelodina from the Kimberley Region of
Western Australia (Australia). *Reptilia*, 55: 47-52.
- McDiarmid, R.W. & Foster, M.S. 1987. Additions to the reptile fauna of Paraguay with notes on
a small herpetological collection from Amambay. *Studies on Neotropical Fauna and
Environment*, 22: 1-9.
- Mertens, R. 1967. Bemerkenswerte süßwasserschild-kröten aus Brasilien. *Senckenbergiana
Biologica*, 48: 71-82.
- Métrailler, S. 2001. Elevage et reproduction en captivité de *Phrynops gibbus* (Schweigger,
1812). *Manouria*, 4 (10): 21-26.
- Métrailler, S. 2005. Observation plattémyde de vanderhaege, *Buphocephala vanderhaegei* (Bour,
1973) au Paraguay. *Manouria*, 8 (27): 27-39.
- Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies – the next generation. *Nature Reviews*, 11: 31-46.

- Mittermeier, R.A.; Rhodin, A.G.J.; Medem, F.; Soini, P.; Hoogmoed, M.S. & Espinoza, N.C. 1978. Distribution of the South American chelid turtle *Phrynops gibbus*, with observations on habitat and reproduction. *Herpetologica*, 34: 94-100.
- Molina, F.B.; Machado, F.A. & Zaher, H. 2012. Taxonomic validity of *Mesoclemmys heliostemma* (McCord, Joseph-Ouni & Lamar, 2001) (Testudines, Chelidae) inferred from morphological analysis. *Zootaxa*, 3575: 63-77.
- Molina, F.B.; Rocha, M.B. & Lula, L.A.B.M. 1998. Comportamento alimentar e dieta de *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron) em cativeiro (Reptilia, Testudines, Chelidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 15 (1): 73-79.
- Near, T.J.; Meylan, P.A. & Shaffer, H.B. 2005. Assessing concordance of fossil calibration points in molecular clock studies: an example using turtles. *The American Naturalist* 165(2): 137-146.
- Neff, N.A. & Marcus, L.F. 1980. A survey of multivariate methods for systematics. New York, Privately Publ.
- Nylander, J.A.A. 2008. MrModeltest 2.3 README. Disponível na World Wide Web em <http://www.abc.se/~nylander/mrmodeltest2/mrmodeltest2.html> [24/abril/2008].
- Pearson, K. 1901. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine* 2:559-572. <http://pbil.univ-lyon1.fr/R/pearson1901.pdf>
- Pinheiro, J.N.; Godoy, I.; Brito, E.S.; Strüssmann, C. & Ferraz, R.H.S. 2010. Macroscopia do aparelho digestório do cágado sul-americano *Mesoclemmys vanderhaegei* (Bour, 1973). *Brazilian Journal of Veterinarian Research of Animal Science*, 47 (6): 429-438.
- Pritchard, P.C.H. 1967. Living turtles of the world. Neptune City, N.J., T.F.H. Publications. 288p.
- Pritchard, P.C.H. 1979. Encyclopedia of Turtles. Neptune, N.J., TFH Publications. 895p.

- Pritchard, P.C.H. 1984. Piscivory in turtles, and evolution of the long-necked Chelidae. Symposium of the Zoological Society of London, 52: 87-110.
- Pritchard, P.C.H. & Trebbau, P. 1984. The turtles of Venezuela. Oxford, Society for the Study of Amphibians and Reptiles. 403p.
- Reid, B.N.; Le, M.; McCord, W.P.; Iverson, J.B.; Georges, A.; Bergmann, T.; Amato, G.; Desalle, R. & Naro-Maciel, E. 2011. Comparing and combining distance-based and character-based approaches for barcoding turtles. Molecular Ecology Resources, p. 1-11.
- Rhodin, A.G.J. 1985. Status and taxonomic relationships of South American chelid turtles. American Philosophical Society Grantee's Reports 1984, 41: 291-293.
- Rhodin, A.G.J. 1994. Chelid turtles of the Australasian Archipelago: I. A new species of *Chelodina* from southeastern Papua New Guinea. Breviora, 497: 1-36.
- Rhodin, A.G.J.; Métrailler, S.; Vinke, T.; Vinke, S.; Artner, H. & Mittermeier, A. 2009. *Acanthochelys macrocephala* (Rhodin, Mittermeier, and McMorris 1984) – Big-Headed Pantanal Swamp Turtle, Pantanal Swamp Turtle. In: Rhodin, A.G.H.; Pritchard, P.C.H.; Saumure, R.A.; Buhlmann, K.A.; Iverson, J.B. & Mittermeier, R.A. (Eds.). Conservation biology of freshwater turtles and tortoises: a compilation project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. p.40.1-40.8. (Chelonian Research Monographs, n. 5)
- Rhodin, A.G.J. & Mittermeier, R.A. 1983. Description of *Phrynops williamsi*, a new species of chelid turtle of the South American *P.geoffroanus* complex. In: Rhodin, A.G.J. & Miyata, K.(Eds.). Advances in herpetology and evolutionary biology. Essays in honor of Ernest E. Williams. Cambridge, Mass., Museum of Comparative Zoology. p.58-73
- Rhodin, A.G.J.; Mittermeier, R.A. & McMorris, J.R. 1984. *Platemys macrocephala*, a new species of chelid turtle from central Bolivia and the Pantanal region of Brazil. Herpetologica, 40(1): 38-46.

- Rohlf, F.J.; & Slice, D.E. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39: 40-5.
- Rueda-Almonacid, J.V.; Carr, J.L.; Mittermeier, R.A.; Rodríguez-Mahecha, J.V.; Mast, R.B.; Vogt, R.C.; Rhodin, A.G.J.; Ossa-Velásquez, J.; Rueda, J.N. & Mittermeier, C.G. 2007. Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico. Bogotá, Conservación Internacional. 540p.
- Scheyer, T.M. 2009. Conserved bone microstructure in the shells of long-necked and short-necked chelid turtles (Testudinata, Pleurodira). *Fossil Record*, 12: 47-57.
- Seddon, J.M.; Georges, A.G.; Baverstock, P.R. & McCord, W.P. 1997. Phylogenetic relationships of chelid turtles (Pleurodira: Chelidae) based on mitochondrial 12S rRNA gene sequence variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7 (1): 55–61.
- Shaffer, H.B.; Meylan, P. & McKnight, M.L. 1997. Tests of turtle phylogeny: Molecular, morphological, and paleontological approaches. *Systematic Biology*, 46: 234-268.
- Shine, R. 1990. Proximate determinants of sexual differences in adult body size. *The American Naturalist*, 135(2): 278-283.
- Silveira, A.L. 2009. *Mesoclemmys vanderhaegei*: Brasil: Minas Gerais. *Herpetological Review* 40 (2): 235-236.
- Smith, E.T. 2009. Turtle treasures from Opal fields of Lightning ridge, New south Wales. Turtle Simposiun. *In*: Braman, D.; Brinkman, D. & Marion, C. (Eds.). Abstracts and Program. Drumheller, Royal Tyrell Museum.p. 167-168. (Special Publication)
- Souza, F.L. 2004. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). *Phyllomedusa* , 3 (1): 15-27.

- Souza, F.L. 2005. Geographical distribution patterns of South American side-necked turtles (Chelidae), with emphasis on Brazilian species. *Revista Española de Herpetologia*, 19: 33-46.
- Souza, F.L.; Martins, M. & Sawaya, R.J. 2000. A new record and observations of Vanderhaege's toad-headed turtle, *Prynops vanderhaegei* (Testudines, Chelidae) in SE Brazil. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 11 (2): 85-88.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9): 1312-1313.
- Thomson, S. 2003. Long necks, flat heads and the evolution of piscivory.
http://www.chelonia.org/articles/longneck_flathead_evolution.htm. [15/mar/2014].
- Thomson, S. & Georges, A. 2009. *Myuchelys* gen.nov. – a new genus for *Elseya latisternum* and related forms of Australian freshwater turtle (Testudines: Pleurodira: Chelidae). *Zootaxa*, 2053: 32-42.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882.
- Thomson, S. A. & Mackne, B. S. 1999. Fossil turtles from the early pliocene bluff downs local fauna, with a description of a new species of *Elseya*. *Transactions of the Royal Society of South Australia*, 123(3): 101-105.
- Todd, E. V.; Blair, D.; Georges, A.; Lukoschek, V. & Jerry, D. R. 2014. A biogeographical history and timeline for the evolution of Australian snapping turtles (*Elseya*: Chelidae) in Australia and New Guinea. *Journal of Biogeography*, 41(5): 905-918.

- Turtles Taxonomy Working Group. [Rhodin, A.G.J.; van Dijk, P.P.; Iverson, J.B. & Shaffer, H.B.]. 2010. Turtles of the world update: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution and conservation status. *In*: Rhodin, A.G.H.; Pritchard, P.C.H.; Saumure, R.A.; Buhlmann, K.A.; Iverson, J.B. & Mittermeier, R.A. (Eds.). Conservation biology of freshwater turtles and tortoises: a compilation project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. p. 85-164. (Chelonian Research Monographs n. 5)
- Turtle Taxonomy Working Group [van Dijk, P.P., Iverson, J.B., Rhodin, A.G.J., Shaffer, H.B., and Bour, R.]. 2014. Turtles of the world. 7.ed. Annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution with maps, and conservation status. *In*: Rhodin, A.G.J., Pritchard, P.C.H., van Dijk, P.P., Saumure, R.A., Buhlmann, K.A., Iverson, J.B., and Mittermeier, R.A. (Eds.). Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. Chelonian Research Foundation. p. 329–479 (Chelonian Research Monographs n. 5).
- Vanzolini, P.E.; Ramos-Costa, A.M.M. & Vitt, L.J. 1980: Répteis das Caatingas. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências.
- Vargas-Ramirez, M.; Michels, J.; Castaño-Mora, O.V.; Cárdenas-Arevalo, G.; Gallego-García, N. & Fritz, U. 2012. Weak genetic divergence between the two South American toad-headed turtles *Mesoclemmys dahli* and *M. zuliae* (Testudines: Pleurodira: Chelidae). *Amphibia-Reptilia*, 33: 373-385.
- Villaça, A.M. 2002-2004. Ocorrência do cágado *Bufocephala vanderhaegei* (Testudines, Chelidae) no Estado do Tocantins. *Humanitas*, 4/6: 73-75.
- Vinke, T.; Vinke, S. & Köhler, G. 2013. What is known about *Mesoclemmys vanderhaegei* (Bour, 1973): a systematic review of the available literature. *Paraquaria Natural*, 1(2):

- Waller, T. & Chebez, J.C. 1987. Notas sobre las tortugas de la provincial de Misiones, Argentina e inclusion de *Phrynops williamsi* Rhodin y Mittermeier, 1983 (Testudines: Chelidae) en la herpetofauna argentina. *Historia Natural*, 7 (5): 53-59.
- Wells, R. & Wellington, R. 1985. A classification of the Amphibia and Reptilia of Australia. *Australian Journal of Herpetology, Supplementary Series*, 1: 1–61.
- Wilson, L.A.B. & Sánchez-Villagra, M.R. 2011. Evolution and phylogenetic signal of growth trajectories: The case of chelid turtles. *Journal of Experimental Zoology*, 316: 50-60.
- Winokur, R.M. 1982. Integumentary appendages of chelonians. *Journal of Morphology*, 172(1): 59-74.
- Winokur, R.M. & Legler, J.M. 1974. Rostral pores in turtles. *Journal of Morphology*, 143(1): 107-119.
- Wong, R.A.; Fong, J.J. & Papenfuss, T.J. 2010. Phylogeography of the African Helmeted Terrapin, *Pelomedusa subrufa*: Genetic structure, dispersal, and human introduction. *Proceedings of the California Academy of Sciences Series 4*, 61(12): 575-585.
- Yanosky, A.A.; Dixon, J.R.; Mercolli, C. & Williams, J. 2000. Note on two specimens of *Phrynops vanderhaegei* Bour, 1973 (Testudines: Chelidae) from Formosa (northeastern Argentina). *Bulletin of the Maryland Herpetological Society*, 36 (2): 61-64.
- Zangerl, R. & Medem, F. 1958. A new species of chelid turtle, *Phrynops (Batrachemys) dahli*, from Colombia. *Bulletin of the Museum Comparative Zoology, Harvard*, 119(5): 373-390, pls.
- Zelditch, M.L; Swiderski, D.L., Sheets, H.D. & Fink, W.I. 2004. Geometric morphometrics for biologists. Amsterdam, Elsevier. 443p.

ANEXO I

Tabela A: Amostragem de *Mesoclemmys* usada na diagnose das populações de *M. vanderhaegei* (Tabela 14). Os dados de *M. dahli*, *M. nasuta* e *M. zuliae* foram retirados da bibliografia.

Espécie	Tombo	Sexo
<i>Mesoclemmys gibba</i>	MPEG265	ind
	MZUSP3318	ind
	MZUSP3175	ind
	MZUSPH2864	ind
	MNRJ16817	ind
	MZUSP2640	ind
	MZUSP4387	ind
	CHUNB09996	ind
	CHUNB09997	ind
	MZUSP2685	ind
	MZUSP3115	f
	MZUSP2684	f
	CHUNB09998	f
	MZUSP4560	f
	MZUSP3140	f
	MPEG537	f
	MZUSP4412	f
	MPEG0548	f
	MZUSP4409	f
	MZUSP4378	f
	MZUSP4355	f
	MPEG0500	f
	MNRJ18106	f
	MZUSP4541	f
	MZUSP4558	f
	MZUSP4411	f
	MZUSP4413	f
	MZUSP4423	f
	MNRJ18107	f
	MZUSP4410	f
	MPEG89	f
	PCHP13166	m
	PCHP11761	m
	MPEG730	m
	MHNCI3882	m
	MPEG83	m
	MZUSP4561	m
	MNRJ18105	m
	MPEG273	m

Tabela A: Continuação.

Espécie	Tombo	Sexo
<i>Mesolemmys gibba</i>	MZUSP4379	m
	MZUSP4559	m
	MZUSP4570	m
	MPEG82	m
	MNRJ18108	m
	MZUSP4424	m
	MPEG0546	ad
	MPEG124	ad
	MPEG422	ad
	MPEG0547	ad
<i>Mesoclemmys heliostemma</i>	MZUSP3387	ind
	MZUSP4377	ind
	MZUSP2918	ind
	MZUSP4603	ind
	MZUSP2641	ind
	MZUSP4602	ind
	MPEG86	f
	MZUSP2050	f
	MZUSP2639	f
	MZUSP3022	m
<i>Mesoclemmys hogei</i>	MNRJ10058	f
	MNRJ3818	f
	MNRJ3815	f
	UFMG71	f
	MNRJ4803	f
	MNRJ3816	m
	MNRJ1051	m
	UFMG72	m
	MNRJ3817	m
	MNRJ3841	m
<i>Mesoclemmys perplexa</i>	MZUSP4111	ind
	MZUSP4112	ind
	MZUSP4086	f
	MZUSP4273	f
	MZUSP4272	m

Tabela A: Continuação.

Espécie	Tombo	Sexo
<i>Mesoclemmys gibba</i>	MZUSP4379	m
	MZUSP4559	m
	MZUSP4570	m
	MPEG82	m
	MNRJ18108	m
	MZUSP4424	m
	MPEG0546	ad
	MPEG124	ad
	MPEG422	ad
	MPEG0547	ad
<i>Mesoclemmys heliostemma</i>	MZUSP3387	ind
	MZUSP4377	ind
	MZUSP2918	ind
	MZUSP4603	ind
	MZUSP2641	ind
	MZUSP4602	ind
	MPEG86	f
	MZUSP2050	f
	MZUSP2639	f
	MZUSP3022	m
<i>Mesoclemmys hogei</i>	MNRJ10058	f
	MNRJ3818	f
	MNRJ3815	f
	UFMG71	f
	MNRJ4803	f
	MNRJ3816	m
	MNRJ1051	m
	UFMG72	m
	MNRJ3817	m
	MNRJ3841	m
<i>Mesoclemmys perplexa</i>	MZUSP4111	ind
	MZUSP4112	ind
	MZUSP4086	f
	MZUSP4273	f
	MZUSP4272	m

Tabela A: Continuação.

Espécie	Tombo	Sexo
<i>Mesoclemmys raniceps</i>	MZUSP2838	ind
	MNRJ1070	ind
	MNRJ2423	ind
	MZUSP4388	ind
	MNRJ1068	f
	MZUSP2141	f
	MZUSP2642	f
	MZUSP2138	f
	MNRJ4755	f
	MZUSP3007	m
	MZUSP2136	m
	MZUSP2140	m
	MZUSP2834	m
	MZUSP2139	m
<i>Mesoclemmys tuberculata</i>	MZUSP4386	ind
	MZUSP3092	ind
	MNRJ2458	ind
	MNRJ1064	ind
	MNRJ1063	ind
	MZUSP3093	ind
	MZUSP4359	ind
	MNRJ2457	ind
	MZUSP2942	ind
	MZUSP4515	ind
	MNRJ1062	ind
	MZUSP2645	ind
	MZUSP3034	ind
	MZUSP2643	ind
	MZUSP2925	ind
	MZUSP2940	ind
	MZUSP3029	f
	MZUSP4587	f
	MNRJ3821	f
	MNRJ7493	f

Tabela A: Continuação.

Espécie	Tombo	Sexo
<i>Mesoclemmys tuberculata</i>	MZUFV026-C	f
	MNRJ1060	f
	MNRJ2459	f
	MNRJ8581	f
	MNRJ3820	f
	MZUSP4586	f
	MNRJ3825	f
	UFMG820	f
	MNRJ7492	f
	MZUSP2676	f
	MNRJ1061	f
	MZUSP4585	f
	MNRJ2461	f
	MNRJ2462	f
	MNRJ2460	f
	MZUSP2926	f
	MZUSP2915	f
	MZUSP2941	f
	MNRJ3819	f
	UFMG821	f
	MZUSP4107	f
	MZUSP4108	f
	MZUSP4110	f
	MZUSP4403	f
	MZUSP4106	m
	MZUSP4109	m
	MZUSP2927	m
	MZUSP2924	m
	MZUSP3106	m
	MZUSP2644	m
	MNRJ8698	m
	MZUSP2037	m
	MZUSP2647	m
	MZUSP2646	m
	MZUSP2928	m