

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Lara Larissa Prado Chagas

**IDENTIFICAÇÃO BASEADA EM DNA *BARCODING* DAS ESPÉCIES DE
TARTARUGAS MARINHAS ENCALHADAS NAS ZONAS SEDIMENTARES
COSTEIRAS DO MARANHÃO.**

São Luís, MA
2018

LARA LARISSA PRADO CHAGAS

**IDENTIFICAÇÃO BASEADA EM DNA *BARCODING* DAS ESPÉCIES DE
TARTARUGAS MARINHAS ENCALHADAS NAS ZONAS SEDIMENTARES
COSTEIRAS DO MARANHÃO.**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr^oLuis Fernando Carvalho Costa
Co-orientadora: Dr^a Larissa Nascimento Barreto

São Luís, MA

2018

Chagas, Lara Larissa Prado.

Identificação baseada em DNA barcoding das espécies de tartarugas marinhas encalhadas nas zonas sedimentares costeiras do Maranhão / Lara Larissa Prado Chagas. - 2018. 47 p.

Coorientador(a): Larissa Nascimento Barreto.

Orientador(a): Luis Fernando Carvalho Costa.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. DNA mitocondrial. 2. Encalhes. 3. Hibridização. 4. Introgressão. 5. Quelônios. I. Barreto, Larissa Nascimento. II. Costa, Luis Fernando Carvalho. III. Título.

LARA LARISSA PRADO CHAGAS

**IDENTIFICAÇÃO BASEADA EM DNA *BARCODING* DAS ESPÉCIES DE
TARTARUGAS MARINHAS ENCALHADAS NAS ZONAS SEDIMENTARES
COSTEIRAS DO MARANHÃO.**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 05/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Larissa Nascimento Barreto (Presidente)

Departamento de Oceanografia e Limnologia/UFMA

MSc. Keila Gardênia Oliveira Cruz

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação/UFMA

MSc. Paula Maria Mesquita Santiago

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação/UFMA

QUEAMAR/UFMA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e a minha família, que me apoiam todos os dias, meu pai Valber Júnior, minha avó Fátima, minha irmã Laísse, minha tia Patrícia, meu tio Alan, também aos meus primos Henrique, Álany e Anália, e ao meu avô, Valber da Conceição Chagas (*In Memoriam*).

Agradecimentos

Gostaria de agradecer nominalmente a todos que cruzaram a minha vida e influenciaram de alguma maneira, como seria quase impossível, a minha ordem de agradecimento é de acordo com a ordem cronológica da minha vida então, agradeço primeiramente a Deus, que conduziu-me todos os dias até concluir mais essa etapa. Segundo agradeço a minha família principalmente por não ficar fazendo aquela velha pergunta “quando tu vai se formar?”, só não me livro da pergunta “que bicho é esse?”. Agora, dando nome aos indivíduos que mais tem paciência comigo, gostaria de agradecer ao meu avô Valber, que mesmo não estando mais entre nós, contribui para a minha formação, minha vó-mãe, Fátima, ao meu pai Valber Júnior, minha tia Patrícia, ao meu tio Alan, a minha irmã Laísse e aos meus primos Rafael Henrique, Álany e Anália, sou muito grata por ter vocês em minha vida, por contar com o apoio de vocês até nos encalhes das tartarugas onde eu fazia vocês irem comigo e me auxiliarem nos procedimentos (inclusive vovó), também tenho que agradecer por sempre me mostrarem curiosidades de biologia, e por me chamarem sempre que passa sobre tartarugas no Animal Planet. Sou grata por muitas coisas que não caberiam aqui, então, só tenho a dizer, que mesmo não dizendo sempre, eu amo vocês.

Também tenho uma segunda família que está comigo durante esses 22 quase 23 anos. Alberto, Alex, Alícia, Daurea, Daureane, Delane, Gabriel, Gabriela, Isabella, Jéssica, Larissinha, Lucas, Rafael, Rafaela, Rayssa, obrigada a cada um de vocês, por me aturarem nos meus momentos de zanga e por diversas vezes me alegrarem, inclusive aos que estão mais distantes ultimamente, vocês fazem parte da minha história.

Também quero agradecer a minha professora do Cintra no ensino médio, professora Waldelice que me fez gostar de biologia no segundo ano (até então eu odiava). Também gostaria de agradecer todo o carinho dos meus amigos Myrian, Thyanne e Pedro, porque mesmo quando passamos tempos sem nos falarmos, assim que nos encontramos é como se fosse a mesma coisa sempre.

Quero também lembrar aqui dos meus amigos da igreja, que viram desde do meu começo desta etapa até agora, Carlos César, Carol, Gabrielle, Nitia, Mylena, Tais, Suellen, vocês estarão sempre no meu coração. Ainda no âmbito igreja, não poderia esquecer de Gabryella, vamos colar esse grau juntas em? Obrigada por ouvir meus desesperos sem reclamar.

Chegando no âmbito acadêmico, quero agradecer a professora Larissa Barreto pela oportunidade de trabalhar com tartarugas, especialmente as marinhas, agradeço também atuais e antigos companheiros do QUEAMAR, Carol Borges, Mayara Monteles, Mayara Canut, Thamyres, Luis, Carlos Augusto, Murilo, Marlla, agradeço a cada um de vocês pelos ensinamentos e pelos campos compartilhados e em especial a equipe pré-incandescência (Daniel, Lucas e Amanda). Também gostaria de agradecer ao apoio do ICMBio do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, especialmente a Adriano e Chicão por apoiarem nas coletas de Atins.

E não poderia deixar de agradecer ao professor Luis Fernando, que teve toda paciência e o interesse de trabalhar junto conosco com as queridas tartarugas, agradeço todo o ensinamento na área de genética que me foi passado e toda paciência de me orientar, tanto na monografia, quanto na iniciação científica com peixes. Também quero agradecer aos meus colegas de laboratório, desta vez do grupo de pesquisa GENEAL, especialmente a Keila e Juniele que me ensinaram bastante sobre microssatélites, também tenho que agradecer a Thalita, que muitas vezes ficou comigo no desespero dos experimentos de monografia, testando protocolos de extração que melhor se aplicassem, a Tatiana e a Carol Borges, que me ajudaram nos primeiros ensinamentos na biologia molecular, Bruno, Herick e Tiago (os levianos) pela companhia, risadas e ensinamentos.

Agora quero dedicar um parágrafo em especial para os meus presentes de 2013, Jéssica Freire, Luana Pinheiro, Suelma Maciel e Yohana Jardim, as vezes pareceram presente de grego, mas mesmo com todas as brigas, sempre nos ajudamos e sabemos que podemos contar umas com as outras sempre, amo vocês meninas, obrigada pelas risadas, pelos ensinamentos, pelo amadurecimento, por passarem os momentos turbulentos da graduação comigo e por puxarem minha orelha sempre que necessário.

Ainda sobre a 2013, obrigada Thalita, minha dupla das viagens, da ecologia, da genética, do PET, vixe, só me imita. Também quero agradecer por ter conhecido Emilly, Augusto, Jesiel, João Manoel, vocês sempre serão especiais para mim.

E sobre o PET, gostaria de agradecer a professora Gisele, tutora na época de minha participação, por ter sido uma das pessoas fundamentais para que eu conseguisse entender qual rumo seguir dentro da biologia. E aos meus companheiros de PET, Mairla, Emilly, Marco(s), Elda, Igor, José, Liana, Augusto, Clarisse, Thalita de novo.

Quero agradecer aos meus companheiros de Mutual Empresa Júnior, Jéssica, Luana Caroline, Carlos Augusto, Luana Antônia, Edênia, Murilo, Rosângela, Tayssa e Quilana, que mesmo depois de sair continuou me dando conselhos sobre a vida e até mesmo sobre os desesperos da vida acadêmica.

Quero agradecer a outras pessoas especiais como Amanda Morais, obrigada por ouvir meus desesperos, por sempre estar disposta a me ajudar, pelos conselhos e por ter paciência comigo, sou muito grata pela nossa amizade. A Thamyris Meireles também, que mesmo de longe aguenta todos os meus dramas de vida, amo vocês.

“Existem apenas duas maneiras de viver sua vida. Uma é como se nada fosse um milagre. A outra é como se tudo fosse um milagre”.

- Albert Einstein

“Milagres não acontecem em contradição com a natureza, mas em contradição com o que sabemos sobre a natureza.”

- Santo Agostinho

SUMÁRIO

Resumo	11
Abstract.....	12
Introdução.....	13
Métodos	15
Resultados.....	17
Discussão.....	19
Referências	24
Tabela – Distâncias genéticas.....	30
Figuras	32
Apêndice 1 - Sequências retiradas do GeneBank e suas devidas localidades.....	35
Anexo I – Normas da revista Conservation Biology.....	37

Identificação baseada em DNA *barcoding* das espécies de tartarugas marinhas encalhadas nas zonas sedimentares costeiras do maranhão.

Lara Larissa Prado Chagas¹, Luís Fernando Carvalho Costa¹, Larissa Nascimento Barreto².

¹Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, São Luís - MA.

²Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, São Luís - MA.

Correspondência pra autora: Lara Larissa Prado Chagas laralc95@hotmail.com

Palavras-chave: hibridização, introgressão, quelônios, encalhes, DNA mitocondrial

1 **Declaração de impacto do artigo:** Estudos moleculares são necessários para melhor
2 entendimento da composição populacional de tartarugas marinhas ameaçadas de extinção.

3 **Resumo**

4 Das sete espécies de tartarugas marinhas, é possível encontrar cinco no Brasil (*Chelonia*
5 *mydas*, *Lepidochelys olivacea*, *Caretta caretta*, *Eretimochelys imbricata* e *Dermochelys*
6 *coreacea*), todas ameaçadas de extinção. Assim, no intuito de auxiliar o monitoramento de
7 encalhes destes animais realizado no Maranhão, este trabalho objetivou a identificação
8 molecular dos espécimes encalhados, especialmente aqueles cuja identificação morfológica
9 foi difícil devido ao estado de decomposição avançada. Além disso, devido aos casos
10 relatados de hibridização entre várias das espécies de tartarugas marinhas no litoral brasileiro,
11 outro objetivo foi verificar a possível ocorrência de híbridos entre os animais encalhados.
12 Foram coletadas amostras de tecido de animais encalhados mortos, cujo DNA foi extraído e o
13 gene COI do DNA mitocondrial amplificado e sequenciado. A identificação das amostras foi
14 realizada comparando as sequências obtidas com as disponibilizadas no Genbank. No total, os
15 indivíduos amostrados foram identificados como pertencentes a *Chelonia mydas*,
16 *Lepidochelys olivacea* e *Eretimochelys imbricata*. Duas amostras, em que não foi possível a
17 identificação morfológica devido ao avançado estado de decomposição, foram identificadas
18 pelo método do DNA *barcoding* como pertencentes a *C. mydas*, mas, em geral, as
19 identificações moleculares corroboraram as identificações morfológicas. No entanto, um
20 exemplar identificado morfológicamente como tartaruga verde foi identificado geneticamente
21 como tartaruga oliva, e quatro exemplares identificados como tartaruga oliva foram
22 geneticamente identificados como tartaruga verde. Esses dados sugerem, pela primeira vez,
23 eventos de introgressão ou hibridização ocorrendo entre essas duas espécies. Do ponto de
24 vista da conservação, além das pressões antrópicas (redes de pesca, poluição etc.), a

25 hibridização pode estar sendo um fator relevante para o declínio das tartarugas marinhas em
26 todo o mundo, uma vez que este fenômeno tem sido demonstrado para a maioria das espécies.

27 **Palavras-chave:** hibridização, introgressão, quelônios, encalhes, DNA mitocondrial.

28 **Abstract**

29 Of the seven species of sea turtles, five can be found in Brazil (*Chelonia mydas*, *Lepidochelys*
30 *olivacea*, *Caretta carreta*, *Eretimochelys imbricata* and *Dermochelys coreacea*), all of them
31 endangered. Thus, in order to assist the monitoring of the beaching of these animals
32 Maranhão, this research aimed to identify the beached turtles using DNA, especially those
33 individuals whose morphological identification was difficult due to advanced decomposition
34 stage. In addition, due to the reported cases of hybridization among several species of sea
35 turtles in the Brazilian coast, another objective was to verify the possible occurrence of
36 hybrids among the beached animals. Tissue samples were collected from dead beached
37 animals, whose DNA were extracted, following by amplification of the mitochondrial DNA
38 gene COI and sequencing. Samples identification was performed comparing the sequences
39 obtained with those available in Genbank. In total, the individuals were identified as
40 belonging to *Chelonia mydas*, *Lepidochelys olivacea* and *Eretimochelys imbricata*. Two
41 samples, in which it was not possible to identify morphologically due to advanced
42 decomposition stage were identified by the DNA *barcoding* method as belonging to *C.*
43 *mydas*, but, in general, the molecular identification corroborated the morphological
44 identification. However, a specimen morphologically identified as green turtle (*Chelonia*
45 *mydas*) was genetically identified as olive turtle (*Lepidochelys olivacea*), and four specimens
46 identified as olive turtle were genetically identified as green turtle. These data suggest, for the
47 first time, events of introgression or hybridization occurring between these two species. From
48 a conservation point of view, in addition to anthropogenic pressures (fishing nets, pollution

49 etc), hybridization may be a relevant factor for the decline of sea turtles worldwide, since this
50 phenomenon has been demonstrated for most species.

51 **Keywords:** hybridization, introgression, chelonians, beaching, mitochondrial DNA.

52 **Introdução**

53 Das sete espécies de tartarugas marinhas existentes (tartaruga cabeçuda, *Caretta*
54 *caretta* Linnaeus, 1758; tartaruga verde, *Chelonia mydas* Linnaeus, 1758; tartaruga de pente,
55 *Eretmochelys imbricata* Linnaeus, 1766; tartaruga de couro, *Dermochelys coriacea*, Vandelli,
56 1761; tartaruga oliva, *Lepidochelis olivacea* Eschscholtz, 1829; tartaruga marinha australiana,
57 *Natator depressus* Garman, 1880; e a tartaruga de kempí, *Lepidochelys kempí* Garman, 1880),
58 é possível encontrar populações das cinco primeiras citadas acima no Brasil (Almeida et al.
59 2011; Santos et al. 2011; Castilhos et al. 2011; Marcovaldi et al., 2011).

60 Todas as cinco espécies com distribuição no Brasil estão ameaçadas de extinção.
61 De fato, as tartarugas marinhas são um dos grupos de animais mais ameaçados de extinção,
62 sendo as pressões antropogênicas consideradas as principais causas dessa situação. Em todo o
63 ciclo de vida desses vertebrados singulares, as ameaças são constantes, iniciando em seus
64 ninhos, que sofrem alagamentos e predação, que são as principais causas da baixa taxa de
65 sobrevivência dos filhotes (Ferreira Júnior 2009). No entanto, fatores antrópicos, como a
66 interação com redes e barcos de pesca, ingestão de resíduos plásticos e metálicos, são os
67 fatores de maior impacto nos indivíduos adultos, o que tem levado esses animais a uma
68 situação muito grave quanto à continuidade de suas espécies (Tomas et al. 2002; Reis et al.
69 2010b). O resultado disso é o encalhe de indivíduos mortos ou muito debilitados no litoral de
70 todo o mundo.

71 É importante monitorar os encalhes de tartarugas marinhas e determinar sua
72 espécie, pois isso permite inferir os prováveis motivos da mortalidade, avaliar quais espécies
73 estão sendo mais afetadas em uma determinada área, além de mapear os locais de sua
74 ocorrência, resultando em um melhor entendimento das ondas migratórias e hábitos
75 ecológicos das populações. No Maranhão, esse monitoramento vem sendo feito pelo Grupo de
76 Pesquisa de Quelônios Aquáticos do Maranhão (QUEAMAR), da Universidade Federal do
77 Maranhão.

78 Um monitoramento eficiente depende da identificação da espécie a que pertence
79 os espécimes encalhados, contudo, dependendo do estado de decomposição do animal, essa
80 atividade se torna difícil usando apenas dados morfológicos. No entanto, com o advento do
81 uso do DNA para identificação de espécies, esse problema foi praticamente resolvido, embora
82 envolva custos financeiros maiores para os projetos de monitoramento. O DNA *barcoding* é,
83 nesse sentido, um dos métodos mais populares para identificação de espécies, mesmo em
84 avançado estado de decomposição (Lara-Ruiz et al. 2006). O método é baseado em um gene
85 do DNA mitocondrial (mtDNA) (citocromo oxidase subunidade I -COI), que possui uma
86 variação nucleotídica interespecífica maior do que a intraespecífica, permitindo a delimitação
87 de espécies na grande maioria dos casos. As sequências do gene COI estão armazenadas numa
88 plataforma online, que pode ser acessada e comparada com as sequências de COI produzidas
89 para os espécimes que se pretende assinalar a uma espécie (Ratnasingham & Hebert 2007). O
90 DNA *barcoding* tem sido cada vez mais utilizada em estudos com espécies de tartarugas
91 marinhas, inclusive no Brasil (Vargas et al. 2009; Poietti et al. 2009, 2014).

92 Além de permitir a identificação de animais encalhados em elevado estado de
93 decomposição, o método também pode até mesmo indicar a ocorrência de hibridização ou
94 introgressão entre espécies de tartarugas marinhas. No Brasil, estudos demonstram que há um

95 elevado número de híbridos, principalmente entre tartaruga cabeçuda e a tartaruga de pente
96 (Lara-Ruiz et al. 2006; Vilaça et al. 2012).

97 Assim, no intuito de auxiliar o monitoramento de encalhes de tartarugas realizado
98 pela equipe do QUEAMAR, este trabalho objetivou a identificação molecular dos espécimes
99 encalhados, especialmente aqueles cuja identificação morfológica é difícil devido ao estado
100 de decomposição avançada, outro objetivo foi verificar a possível ocorrência de híbridos entre
101 os animais encalhados.

102 **Métodos**

103 A identificação morfológica dos espécimes foi feita usando a chave de
104 identificação descrita por Pritchard e Mortimer (1999). A amostra de tecido sólido foi retirada
105 dos órgãos mais internos dos indivíduos encontrados em óbito, com o auxílio de pinças e
106 bisturis. As coletas foram realizadas em toda bacia sedimentar costeira dos municípios de São
107 Luís, São José de Ribamar, Raposa e Ilha de Curupu (Ilha do Maranhão, 25 animais) e em
108 Atins (município de Barreirinhas) (27 animais) (Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses)
109 (Fig. 1A) durante os anos de 2014 a 2017.

110 O material coletado foi fixado em etanol absoluto e armazenado em *freezer* -20°C.
111 A extração de DNA seguiu o protocolo de tampão salino desenvolvido por Aljanabi e
112 Martinez (1997). Os DNAs extraídos foram avaliados quanto à sua qualidade por meio de
113 eletroforese em gel de agarose corado com GelRed (Biotium), e visualizado em
114 transiluminador de luz ultravioleta.

115 Um fragmento do gene COI foi amplificado por meio da técnica de PCR (Reação
116 em Cadeia da Polimerase), utilizando os *primers* L-turtCOI (5'-
117 ACTCAGCCATCTTACCTGTGATT-3') e H-turtCOIc (5'-

118 TGGTGGGCTCATACAATAAAGC-3'), nas seguintes condições: 94° a 2 minutos, 35 ciclos
119 de 94°C a 30 segundos, 35 ciclos de 47°C a 45 segundos, 35 ciclos de 72°C a 1 minuto, 72°C a
120 5 minutos. As amplificações foram feitas com um mix, contendo Tampão da Taq Polimerase
121 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de DNTP, 0,3 µM cada *primer*, 1 U de Taq polimerase,
122 DMSO 1%, DNA (50 a 100 ηg) e água ultra-pura na medida que completasse um volume
123 final de 25 µL de volume final de reação.

124 As amostras amplificadas foram purificadas usando o *kit* Illustra GFX PCR DNA
125 *and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e sequenciadas pelo método de Sanger et al.
126 (1977) em sequenciador automático ABI 3500, usando Big Dye™ Terminator Cycle
127 Sequencing usando ambos os *primers* de amplificação.

128 A identificação das amostras foi realizada comparando-se as sequências de COI
129 dos exemplares enalhados com as disponibilizadas nos bancos de DNA do NCBI (National
130 Center for Biotechnology Information) por meio do algoritmo BLAST (Altschul et al. 1997),
131 utilizando-se como parâmetro de validação da identificação de uma espécie a divergência
132 genética máxima de 2% entre as sequências (Herbert et al. 2003).

133 A análise e o alinhamento das sequências foram realizados no software BioEdit
134 (Hall 2011), usando o aplicativo ClustalW (Thompson et al. 1994). Somente sequências de
135 COI de alta qualidade seguiram para a fase de alinhamento, após a qual foi feita a inferência
136 de haplótipos, cálculo de distâncias genéticas (modelo Kimura-2-parâmetros K2P, Kimura
137 1980) e construção de uma árvore filogenética de *Neighbor-joining* (1000 pseudoréplicas do
138 tipo *bootstrap*) no software MEGA 6.06 (Tamura et al. 2011). Foram acrescentadas as
139 análises 33 sequências de COI retiradas do Genbank das mesmas espécies identificadas no
140 Maranhão: 25 de tartaruga verde, seis de tartaruga oliva, e duas para formação do grupo
141 externo (uma de tartaruga de couro e uma de tartaruga de pente) (Apêndice 1). Para o cálculo

142 das distâncias genéticas, foram retiradas todas as amostras cuja identificação molecular não
143 foi compatível com a morfológica.

144 **Resultados**

145 Das 52 amostras obtidas de tartarugas marinhas encalhadas na Ilha de São Luís e
146 Atins, apenas 26 puderam ter o gene COI sequenciado, e dessas, apenas 21 foram submetidas
147 à comparação com o Genbank para identificação molecular. O sequenciamento falhou para os
148 cinco indivíduos que não foram usados para identificação molecular.

149 Foram identificados três das cinco espécies de tartarugas marinhas que ocorrem
150 no Brasil entre as 21 amostras em que foi possível obter sequências com qualidade mínima
151 para comparação junto ao Genbank: tartaruga verde (18 indivíduos), tartaruga oliva (dois
152 indivíduos) e tartaruga de pente (um indivíduo). Para esta última espécie, o material biológico
153 foi retirado de um filhote natimorto coletado em um ninho na ilha de Curupu, Maranhão.

154 Duas amostras, em que não foi possível a identificação morfológica devido ao
155 avançado estado de decomposição foram identificadas pelo método do DNA *barcoding*
156 como pertencentes a tartaruga verde. Nos outros casos, as identificações moleculares
157 corroboraram com as identificações morfológicas, exceto para cinco indivíduos: um exemplar
158 identificado morfológicamente como tartaruga verde (Ilha de São Luis) foi identificado
159 geneticamente como tartaruga oliva (Fig. 2B) e quatro exemplares morfológicamente
160 identificados como tartaruga oliva (Ilha de São Luís e Atins) foram geneticamente
161 identificados como tartaruga verde (Fig. 2D). Esses resultados sugerem a ocorrência de
162 eventos de hibridização introgressiva, ou apenas hibridização entre essas duas espécies.

163 As sequências de COI de tartaruga verde e tartaruga oliva encalhadas em território
164 maranhense, quando comparadas às sequências dessas mesmas espécies de várias localidades

165 nos três oceanos e depositadas no Genbank, permitiu identificar 10 haplótipos, sem
166 compartilhamento de haplótipos entre as espécies, com exceção das amostras suspeitas de
167 hibridização. Tartaruga verde foi caracterizada por 7 haplótipos distintos. Todas as amostras
168 do presente estudo eram de um mesmo haplótipo, o qual era compartilhado com indivíduos de
169 outras regiões do Oceano Atlântico (Rio Grande do Norte e Espírito Santo - Brasil, Ilhas
170 Virgens Americanas, Suriname, Reino Unido, África, Venezuela, Costa Rica e Estados
171 Unidos) e do Mar Mediterrâneo (Chipre e Itália). Para a tartaruga oliva, foram encontrados
172 três haplótipos distintos, com as amostras do Maranhão compartilhando o mesmo haplótipo
173 com indivíduos dos oceanos Atlântico (Caribe e Gana) e Pacífico (Costa Rica). Os outros dois
174 haplótipos eram do Oceano Índico (Índia) (Fig. 1B).

175 As distâncias genéticas intra e interpopulacionais das amostras de tartaruga verde
176 e tartaruga oliva encalhadas no Maranhão foram iguais a zero, indicando alta homogeneidade
177 genética. As distâncias interpopulacionais para a tartaruga verde em relação às sequências
178 depositadas no Genbank originadas a partir de indivíduos coletados em várias regiões do
179 mundo foram zero quando comparadas com amostras do Oceano Atlântico (Rio Grande do
180 Norte e Espírito Santo - Brasil, Ilhas Virgens Americanas, Suriname, Reino Unido, África,
181 Venezuela, Costa Rica e Estados Unidos) e Mar Mediterrâneo (Chipre e Itália), 0,9% quando
182 comparadas a amostras do Oceano Pacífico (Equador e México), 1% em relação as amostras
183 do Oceano Índico (Índia e Austrália) e 1,1%, quando comparadas com duas outras localidades
184 do Oceano Pacífico (Malásia e Austrália) (Tabela 1). Para a tartaruga oliva, apenas sequências
185 da Índia demonstraram distância genética de 0,5%. Para as demais localidades nos oceanos
186 Pacífico e Atlântico, a divergência genética foi zero. As tartarugas verde e oliva apresentaram
187 divergência genética entre si de 8,4%.

188 Dois clados para a tartaruga verde foram formados na árvore filogenética (Fig. 3),
189 com um deles apresentando alto suporte de *bootstrap* (97), englobando amostras do Mar
190 Mediterrâneo e do Oceano Atlântico, incluindo as amostras do Maranhão. O outro grupo,
191 mesmo com baixo suporte (54), agrupou apenas amostras do Oceano Pacífico e Índico,
192 indicando uma estruturação populacional dessa espécie associada aos diferentes oceanos. Para
193 a tartaruga oliva, apenas um clado foi observado (Fig. 3).

194 **Discussão**

195 A utilização do método do DNA *barcoding* para identificação de tartarugas
196 encalhadas em praias do Maranhão é uma ferramenta eficiente, corroborando as identificações
197 morfológicas na grande maioria dos casos. Mas o método foi especialmente eficiente no caso
198 de duas amostras em que não foi possível a identificação morfológica devido ao avançado
199 estágio de decomposição, indicando com alto grau de certeza a espécie de origem dos
200 indivíduos. Isso demonstra a importância e o aspecto complementar do método em casos nos
201 quais a identificação morfológica da espécie pode ser difícil ou ambígua. Por exemplo,
202 Vargas et al. (2009) identificaram 26 amostras de tartarugas (tartaruga verde, oliva, de pente,
203 cabeçuda e de couro) encalhadas em quatro regiões do litoral brasileiro (Bahia, Pernambuco,
204 Sergipe e Rio Grande do Sul), reafirmando a importância de utilizar estratégias moleculares
205 para identificar as tartarugas marinhas ao nível de espécie, principalmente em casos de
206 impossibilidade de identificação morfológica.

207 No presente estudo, nós identificamos entre as amostras encalhadas no Maranhão,
208 três das sete espécies de tartarugas marinhas existentes no mundo, incluindo a identificação de
209 um filhote natimorto de tartaruga de pente, corroborando informações da literatura que já
210 indicavam o litoral do Maranhão como ponto de desova da espécie (Ribeiro et al. 2014).

211 Também verificamos neste estudo a ocorrência de hibridização introgressiva entre
212 duas espécies para as quais não havia dados definitivos da ocorrência de tal fenômeno
213 (tartaruga verde x tartaruga oliva). Erros de identificação das espécies podem ser descartados
214 como explicação para os haplótipos de uma espécie estarem presentes dentro do clado da
215 outra espécie (Fig. 3), pois elas são bem distintas entre si mesmo em estado de decomposição
216 avançada, considerando que a identificação é baseada principalmente na quantidade de pares
217 de placas presentes na carapaça (Pritchard & Mortimer 1999). A tartaruga verde (Fig. 2A e
218 2B) possui quatro pares de placas enquanto a tartaruga oliva (Fig. 2C e 2D) possui cinco ou
219 mais pares. Além disso, as placas da tartaruga oliva são mais alongadas e finas do que as da
220 tartaruga verde (Pritchard & Mortimer 1999).

221 O fato de os indivíduos híbridos terem aspectos fenotípicos apenas de uma das
222 espécies que participou da hibridização, mas DNA mitocondrial da outra espécie envolvida,
223 sugere hibridização introgressiva, que ocorre quando o híbrido de primeira geração retrocruza
224 com uma das espécies parentais, mas mantendo o DNA mitocondrial do outro parental. Isso
225 significa dizer que o genoma nuclear desses híbridos possa ainda pertencer a apenas uma das
226 espécies parentais dado que a identificação morfológica desses animais em nossa amostragem
227 deu-se com a mesma facilidade que a dos animais não híbridos.

228 Todos os casos de hibridização introgressiva revelados neste estudo
229 demonstraram que os caracteres morfológicos mais marcantes foram herdados, portanto, do
230 macho de uma das espécies parentais, uma vez que o DNA mitocondrial só é passado de
231 forma matrilinear em vertebrados. No entanto, apesar da fácil distinção visual entre as duas
232 espécies, características como placas pré-oculares, placas pré-frontais e cor do plastrão nem
233 sempre são possíveis de identificar com tanta facilidade em indivíduos em óbito, o que pode
234 acabar levando possíveis características híbridas no fenótipo do híbrido a não estarem tão

235 evidentes. Resultado parecido foi encontrado em um estudo (Kelez et al. 2016) que relata a
236 captura de uma tartaruga marinha com a maior parte de suas características morfológicas
237 similares a tartaruga verde, entretanto seu DNA mitocondrial era compatível com o da
238 tartaruga de pente, demonstrando que a espécie herdou a maior parte das suas características
239 físicas do macho da tartaruga verde do que da fêmea da tartaruga de pente.

240 Casos de introgressão são relatados em outras famílias da ordem Chelonia,
241 abrangendo também as espécies subaquáticas (Mitchell et al. 2016). A hibridização entre
242 espécies da família Cheloniidae, da qual fazem parte a tartaruga verde e a tartaruga oliva, já
243 vem sendo descrita desde o início dos anos 80 (Kamezaki 1983), com o relato de um possível
244 evento entre as tartarugas cabeçuda e de pente. Mesmo as espécies mais distintas da família
245 Cheloniidae são capazes de produzir híbridos viáveis (Karl e Bowen 1999). São conhecidos
246 casos de híbridos entre tartaruga verde x tartaruga de pente (Wood et al. 1983; Kelez et al.
247 2016), tartaruga cabeçuda x tartaruga de pente (Conceição et al. 1990; Vilaça et al. 2012),
248 tartaruga verde x tartaruga cabeçuda (James et al. 2004), tartaruga cabeçuda x tartaruga oliva
249 (Reis et al. 2010a; Vilaça et al. 2012) e tartaruga oliva x tartaruga de pente (Vilaça et al.
250 2012).

251 No Brasil, casos de hibridização e introgressão em tartarugas marinhas são cada
252 vez mais documentados, como por exemplo: híbridos entre a tartaruga cabeçuda e a tartaruga
253 de pente no litoral da Bahia, Ceará e Rio Grande do Sul, identificados por DNA mitocondrial
254 e morfologia (Proietti et al. 2014); híbridos entre tartaruga oliva x tartaruga de pente, tartaruga
255 oliva x tartaruga cabeçuda e tartaruga cabeçuda x tartaruga de pente, identificados por
256 marcadores microssatélites e DNA mitocondrial, incluindo um indivíduo tri-híbrido com
257 alelos de *loci* de microssatélites de três espécies diferentes (tartaruga de pente, tartaruga
258 cabeçuda e tartaruga verde) (Vilaça et al. 2012).

259 Havia, então, até o momento, relatos de casos de hibridização para vários pares de
260 espécies de tartarugas marinhas, exceto para o par tartaruga verde x tartaruga oliva, o qual foi
261 demonstrado no presente estudo por meio de DNA mitocondrial. Embora Vilaça e Santos
262 (2013) descrevam evidências por dados morfológicos de hibridização entre essas duas
263 espécies, não há trabalhos publicados sobre o assunto com DNA, mas apenas uma menção de
264 comunicação oral também a partir de dados morfológicos.

265 Numa perspectiva mais ampla, nossos dados, combinados aos dados da literatura,
266 mostram que eventos de hibridização/introgressão ocorrem para todos os pares de espécies de
267 tartarugas marinhas encontradas no Brasil, exceto para a tartaruga de couro. Permanece sem
268 resposta até o momento a questão sobre se esses eventos ocorrem naturalmente por conta de
269 barreiras reprodutivas incompletas, mesmo entre espécies de gêneros diferentes, ou se a
270 diminuição nos tamanhos populacionais das espécies devido à pressão antropogênica sobre
271 elas, somada às barreiras reprodutivas incompletas, é que está favorecendo a hibridização.

272 Sob a ótica da conservação de espécies ameaçadas, a hibridização é um fenômeno
273 negativo para a manutenção das espécies, e no caso das tartarugas marinhas, este fenômeno é
274 amplamente presente entre as espécies, revelando um cenário bastante negativo para a
275 conservação desses animais. Este argumento é especialmente válido no caso de hibridização
276 introgressiva revelado no presente estudo para a tartaruga verde e a tartaruga oliva, pois a
277 partir de poucos indivíduos encalhados analisados (21), cinco eram híbridos (23%),
278 evidenciando dois cenários possíveis: ou esses híbridos possuem baixa viabilidade (depressão
279 exogâmica), o que ocasiona uma alta mortalidade, refletida em sua fácil detecção mesmo a
280 partir de uma amostragem pequena de indivíduos encalhados; ou os tamanhos populacionais
281 das duas espécies são tão pequenos que os indivíduos delas não obtêm sucesso no encontro de
282 seus congêneres durante o período reprodutivo, restando o encontro casual entre indivíduos de

283 espécies diferentes, que aliado a barreiras reprodutivas incompletas, acaba favorecendo o
284 cruzamento interespecífico. Em ambos os casos, as estratégias de conservação precisam levar
285 em conta que a hibridização pode ser um dos agentes importantes que podem estar levando
286 espécies de tartarugas marinhas ao vórtice de extinção, do qual dificilmente se consegue
287 trazer as espécies para uma situação mais confortável em termos de seus *status* de
288 conservação.

289 Outras considerações podem ser feitas em relação ao fenômeno de hibridização.
290 Em geral, os híbridos F1 (primeira geração) têm maior oportunidade de formar progênes por
291 retrocruzamento com um dos parentais do que por cruzamento entre si, porque que os híbridos
292 estão, em geral, em número menor quando comparados aos indivíduos das espécies parentais.
293 Além disso, a alta fertilidade das espécies parentais em comparação com uma esperada baixa
294 fertilidade dos híbridos, produzirá um maior número de gametas parentais disponíveis para
295 fertilizar os gametas dos híbridos. Por fim, a progênie obtida por retrocruzamento contém
296 genes das espécies parentais, que tem maior probabilidade de estarem bem adaptados a um
297 habitat já existente. A comparação entre animais híbridos e seus parentais feita por Soares et
298 al. (2017) em área de reprodução demonstra que a única desvantagem do ninho dos híbridos é
299 um menor sucesso de emergência, o que sugere um menor sucesso embrionário, porém, em
300 outros aspectos, como quantidade de ovos depositados, período de desova e de incubação dos
301 ovos, os híbridos apresentaram sempre fatores intermediários, sobrepondo com o dos seus
302 parentais.

303 Nosso estudo é pioneiro no relato de hibridização entre espécies de tartarugas
304 marinhas na costa Norte do Brasil, indicando, pela primeira vez, que o par tartaruga verde x
305 tartaruga oliva também está hibridizando. Uma melhor caracterização deste evento depende
306 de estudos moleculares com marcadores nucleares para entender a extensão desse fenômeno

307 nessas duas espécies e seu potencial para piorar o estado de conservação delas. Perguntas que
308 também exigem respostas urgentes são: como os fatores antropogênicos podem estar
309 associados aos casos de hibridização relatados? A hibridização não é um problema para a
310 conservação dessas espécies porque a seleção natural age contra os híbridos, o que explicaria
311 um possível encalhe mais frequente desses indivíduos? Respostas a essas e outras questões
312 são importantes para direcionar melhor os esforços de conservação das tartarugas marinhas
313 tanto no litoral brasileiro quanto no resto do mundo.

314 **Referências**

315 Aljanabi SM, Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic
316 DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* **25**:4692–4693.

317 Allard MW, Miyamoto MM, Bjorndal KA, Bolten AB, Bowen BW. 1994. Support for Natal
318 Homing in Green Turtles from Mitochondrial DNA Sequences. *Copeia* **1**: 34-41

319 Almeida AP, Thomé JCA, Baptistotte C, Marcovaldi MA, Santos AS, Lopez M. 2011.
320 Avaliação do Estado de Conservação da Tartaruga Marinha *Dermochelys coriacea* (Vandelli,
321 1761) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira* **1**: 37-44.

322 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997.
323 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.
324 *Nucleic Acids Research* **25**: 3389–3444.

325 Azeredo AML. O Código de Barras da Vida baseado no DNA “Barcoding of Life”:
326 Considerações e Perspectivas. 2005. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos.

327 Blaxter ML. The promise of a DNA taxonomy. 2004. *Philosophical Transactions of the Royal
328 Society of London. Series B, Biological Sciences* **359**: 669–679.

329 Broderick AC, Coyne MS, Fuller WJ, Glen F, Godley BJ. 2007. Fidelity and over-wintering
330 of sea turtles. *Proceedings of the royal society B Biological Sciences* **274**: 1533–1538.

331 Castilhos JC, Coelho CA, Argolo JF, Santos EAP, Marcovaldi MA, Santos AS, Lopez M.
332 2011. Avaliação do Estado de Conservação da Tartaruga Marinha *Lepidochelys olivacea*
333 (Eschscholtz, 1829) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira* **1**: 28-36.

334 Conceição MB, Levy JA, Marins LF, Marcovaldi MA. 1990. Electrophoretic characterization
335 of a hybrid between *Eretmochelys imbricata* and *Caretta caretta* (Cheloniidae). *Comparative*
336 *Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **97**: 275-278.

337 Ferreira Júnior PD. Efeitos de Fatores Ambientais na Reprodução de Tartarugas. 2009. *Acta*
338 *Amazônica* **39**: 319 – 334.

339 Hall T. 2011. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of*
340 *Biosciences* **2**: 60-61.

341 Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR. 2003. Biological identifications through DNA
342 barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London* **270**: 313-321.

343 James M, Martin K, Dutton P. 2004. Hybridization between a green turtle, *Chelonia mydas*,
344 and a loggerhead turtle, *Caretta caretta*, and the first record of a green turtle in Atlantic
345 Canada. *Canadian Field Naturalist* **118**: 579-582.

346 Kamezaki N. 1983. The possibility of hybridization between the loggerhead turtle,
347 *Caretta caretta* and the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in specimens hatched from
348 eggs collected in Chita Peninsula. *Japanese Journal of Herpetology* **10**: 52-53.

349 Karl SA & Bowen BW. 1999. Evolutionary Significant Units versus Geopolitical Taxonomy:
350 Molecular Systematics of an Endangered Sea Turtle (genus *Chelonia*). *Conservation Biology*
351 **13**: 990-999.

352 Kelez S, Velez-Zuazo X, Pacheco AS. 2016. First record of hybridization between green
353 *Chelonia mydas* and hawksbill *Eretmochelys imbricata* sea turtles in the Southeast Pacific.
354 PeerJ Journal DOI 10.7717/Peerj journal.1712.

355 Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions
356 through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* **16**: 111-
357 120.

358 Lara-Ruiz P, Lopez GG, Santos FR, Soares LS. 2006. Extensive hybridization in hawksbill
359 turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. *Conservation*
360 *Genetics* DOI 10.1007/s10592-005-9102-9.

361 Marcovaldi MA, Lopez GG, Soares LS, Santos AJB, Bellini C, Santos AS, Lopez M. 2011.
362 Avaliação do Estado de Conservação da Tartaruga Marinha *Eretmochelys imbricata*
363 (Linnaeus, 1766) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira* **1**: 20-27.

364 Mitchell SM, Muehlbaner LK, Freedberd S. 2016. Nuclear introgression without
365 mitochondrial introgression in two turtle species exhibiting sex-specific trophic
366 differentiation. *Ecology and Evolution* DOI 10.1002/ece3.2087.

367 Pritchard PCH & Mortimer JA. 1999. Taxonomy, External Morphology, and Species
368 Identification. *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles* **4**:
369 1-18.

370 Proietti MC, Lara-Ruiz P, Reisser JW, Pinto LS, Dellagostin AO, Marins LF. 2009. Green
371 turtles (*Chelonia mydas*) foraging at Arvoredo Island in Southern Brazil: Genetic

372 characterization and mixed stock analysis through mtDNA control region haplotypes.
373 *Genetics and Molecular Biology* **32**: 613-618.

374 Proietti MC, Reisser J, Marins LF, Marcovaldi MA, Soares LS, Monteiro DS, Wijeratne S,
375 Pattiaratchi C, Secchi ER. 2014. Hawksbill x loggerhead sea turtle hybrids at Bahia, Brazil:
376 where do their offspring go. *PeerJ Journal* 2:e255; DOI 10.7717/peerj.255

377 Ratnasingham S, Hebert PDN. 2007. The Barcode of Life Data System
378 (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology* **7**: 355–364.

379 Reis EC, Soares LS, Lôbo-Hajdu G. 2010a. Evidence of olive ridley mitochondrial genome
380 introgression into loggerhead turtle rookeries of Sergipe, Brazil. *Conservation Genetics* DOI
381 10.1007/s10592-009-9973-2.

382 Reis EC, Pereira CS, Rodrigues DP, Secco HKC, Lima LM, Rennó B, Siciliano S. 2010b.
383 Condição de saúde das tartarugas marinhas do litoral centro norte do estado do Rio de Janeiro,
384 Brasil: Avaliação sobre a presença de agentes bacterianos, fibropapilomatose e interação com
385 resíduos antropogênicos. *Oecologia Australis* **14**: 756-765.

386 Ribeiro ABN, Barreto L, Ribeiro LES, Azevedo RR. 2014. Conservation aspects of sea turtles
387 in Maranhão Island, São Luís, Brazil. *Bioscience Journal* **30**: 874-878.

388 Rodríguez-Zárate CJ, Sandoval-Castillo J, van Sebille E, Keane RG, Rocha-Olivares A,
389 Urteaga J, Beheregaray LB. 2018. Isolation by environment in the highly mobile olive ridley
390 turtle (*Lepidochelys olivacea*) in the eastern Pacific. *Proceedings of the royal society b* DOI:
391 10.1098/rspb.2018.0264.

392 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977.
393 *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 5463-5467.

394 Santos AS, Soares LS, Marcovaldi MA, Monteiro DS, Giffoni B, Almeida AP. 2011.
395 Avaliação do Estado de Conservação da Tartaruga Marinha *Caretta caretta* Linnaeus, 1758
396 no Brasil. Biodiversidade Brasileira **1**: 3-11.

397 Soares LS, Bolten AB, Wayne ML, Vilaça ST, Santos FR, Marcovaldi MAG, Bjorndal KA.
398 2017. Comparison of reproductive output of hybrid sea turtles and parental species. Marine
399 Biology DOI 10.1007/s00227-016-3035-3.

400 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular
401 evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and
402 maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution. **28**: 2731-2739.

403 Thompson JD, Higgins DG; Gibron TJ. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of
404 progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap
405 penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research **22**: 4673-4680.

406 Tomas J, Guitart R, Mateo R, Raga JA. 2002. Marine debris ingestion in loggerhead sea
407 turtles, *Caretta caretta*, from the Western Mediterranean. Marine Pollution Bulletin **44**: 211-
408 216.

409 Vargas SM, Araújo FCF, Santos FR. 2009. DNA *barcoding* of Brazilian sea turtles
410 (Testudines). Genetics and Molecular Biology **32**: 608-612.

411 Vilaça ST, Vargas SM, Lara-Ruiz P, Molfetti E, Reis EC, Lobo-Hajdu G, Soares LS,
412 SantosFR. 2012. Nuclear markers reveal a complex introgression pattern among marine turtle
413 species on the Brazilian coast. Molecular ecology DOI 10.1111/j.1365-294X.2012.05685.x.

414 Vilaça SM & Santos FR. 2013. Molecular Data for the Sea Turtle Population in Brazil.
415 Dataset Papers in Science DOI 10.1155/2013/196492.

416 Wood J, Wood F, Critchley K. 1983. Hybridization of *Chelonia mydas* and *Eretmochelys*
417 *imbricata*. Copeia DOI 10.2307/1444361.

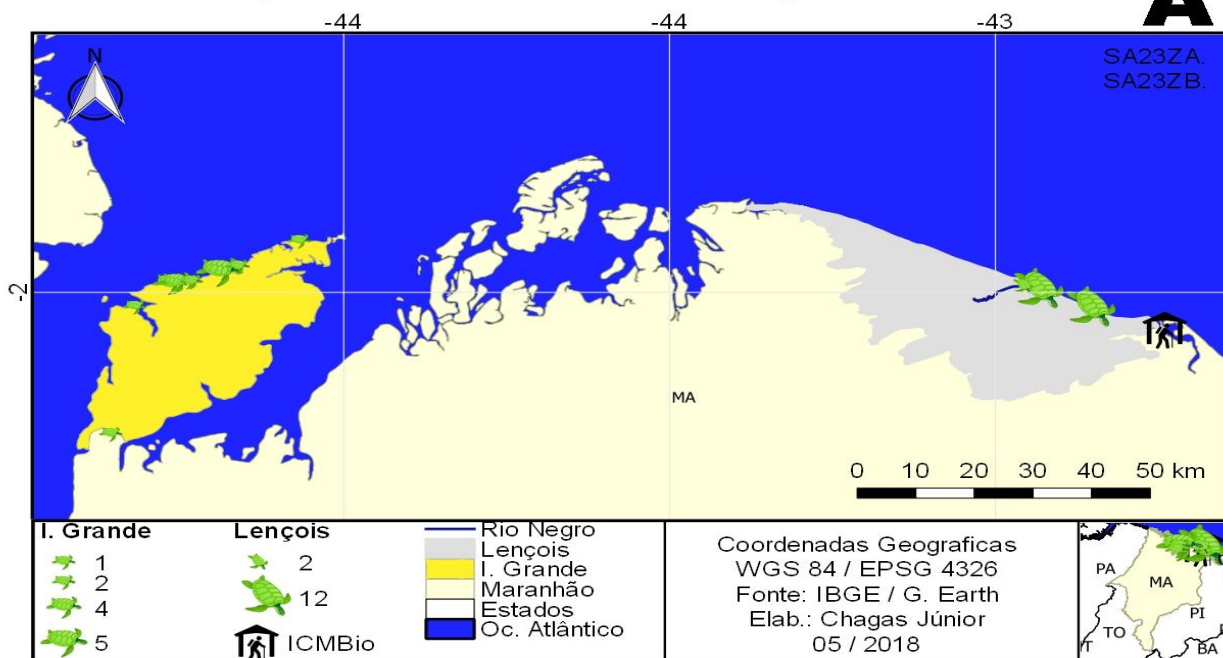
Tabela 1. Estimativas de divergências genéticas (Kimura 2 parâmetros) pareadas do gene COI para duas espécies de tartarugas marinhas identificadas no Maranhão comparadas com sequências congêneres de outros locais do mundo.

Espécies/populações	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>Chelonia mydas</i>																	
1. C.m. (BR-MA-OA)																	
2. C.m. (IVA-OA)	0,000																
3. C.m. (BR-ES-OA)	0,000	0,000															
4. C.m. (Suriname-OA)	0,000	0,000	0,000														
5. C.m. (RU-OA)	0,000	0,000	0,000	0,000													
6. C.m. (África-OA)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000												
7. C.m. (Venezuela-OA)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000											
8. C.m. (Chipre-MM)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000										
9. C.m. (CR-OA)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000									
10. C.m. (EUA-OA)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000								
11. C.m. (Equador-OP)	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009							
12. C.m. (Mexico-OP)	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,000						
13. C.m. (EUA-OP)	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,000	0,000					
14. C.m. (Austália-OI)	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,001	0,001	0,001				
15. C.m. (Malásia-OP)	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,002	0,002	0,002	0,001			

16. C.m. (Austrália-OP)	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004			
17. C.m. (Itália-MM)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,009	0,009	0,010	0,011	0,011		
18. C.m. (Índia OI)	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,007	0,010	
<i>Lepidochelys olivacea</i>	1	2	3	4	5														
1. L.o. (BR-MA-OA)																			
2. L.o. (CR-OP)	0,000																		
3. L.o. (Caribe-OA)	0,000	0,000																	
4. L.o. (OP)	0,000	0,000	0,000																
5. L.o. (Gana-OA)	0,000	0,000	0,000	0,000															
6. L.o. (Índia)	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005														

C.m.: *Chelonia mydas*; L.o.: *Lepidochelys olivacea*; BR: Brasil; MA: Maranhão; ES: Espírito Santo; IVA: Ilhas Virgens Americanas; RU: Reino Unido; EUA: Estados Unidos da América; CR: Costa Rica; OA: Oceano Atlântico; OP: Oceano Pacífico; OI: Oceano Índico; MM: Mar Mediterrâneo

Localização dos encalhes de quelônios - Ma **A**



Mapa da Distribuição de Haplótipos **B**

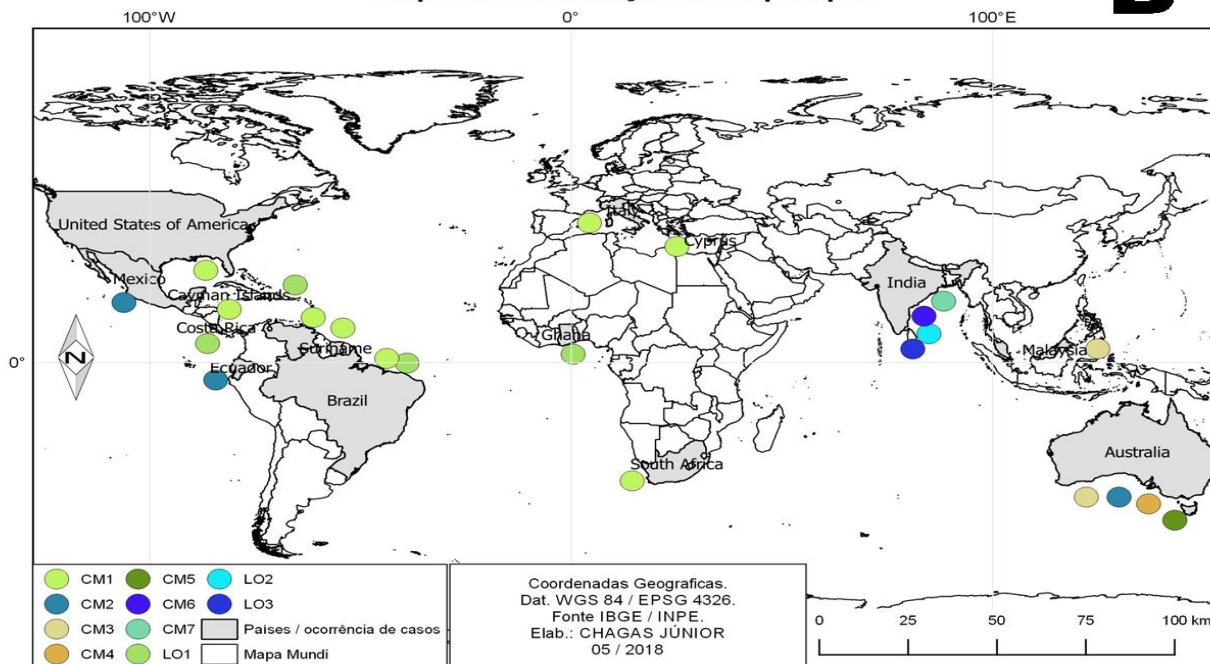


Figura 1. A. Pontos de coletas realizadas pela equipe do QUEAMAR representados pelas tartarugas na cor verde: Ilha de São Luis (São Luís, São José de Ribamar, Raposa e Ilha de Curupu) e Atins, município de Barreirinhas, no Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses (Fonte: Valber Chagas). B. Mapa de distribuição dos haplótipos encontrados para as espécies *Chelonia mydas* (CM1,CM2,CM3,CM4,CM5,CM6,CM7) e *Lepidochelys olivacea* (LO1,LO2,LO3) (Fonte: Valber Chagas).

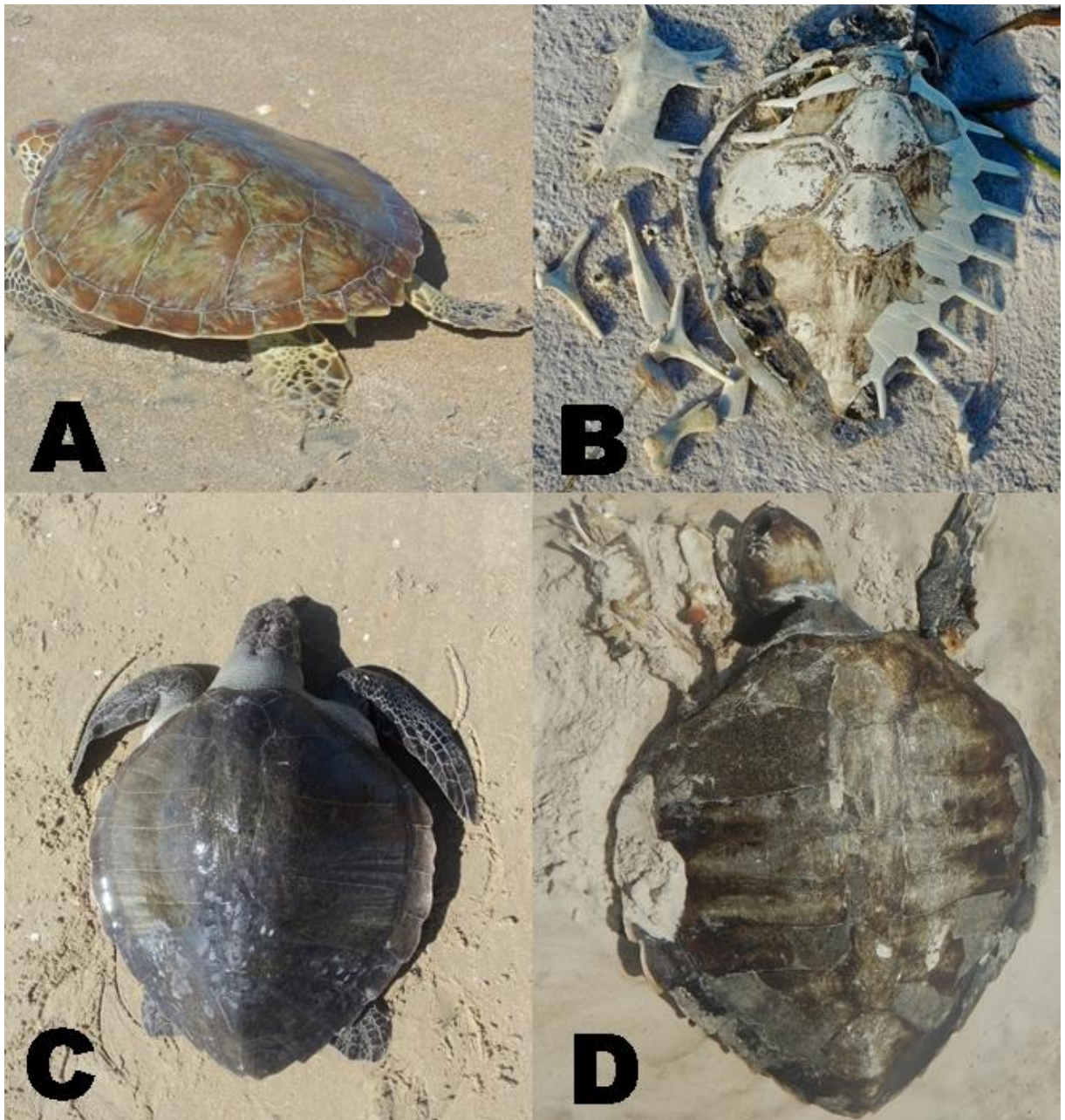


Figura 2. A. Exemplar vivo de *Chelonia mydas* (Foto: Marlla Arouche). B. Exemplar de *Chelonia mydas* em elevado estado de decomposição encontrada em Atins (Foto: Lara Chagas). C. Exemplar vivo de *Lepidochelys olivacea* (Foto: Marlla Arouche) D. Exemplar morto de *Lepidochelys olivacea* encontrado em Atins (Foto: Lara Chagas).

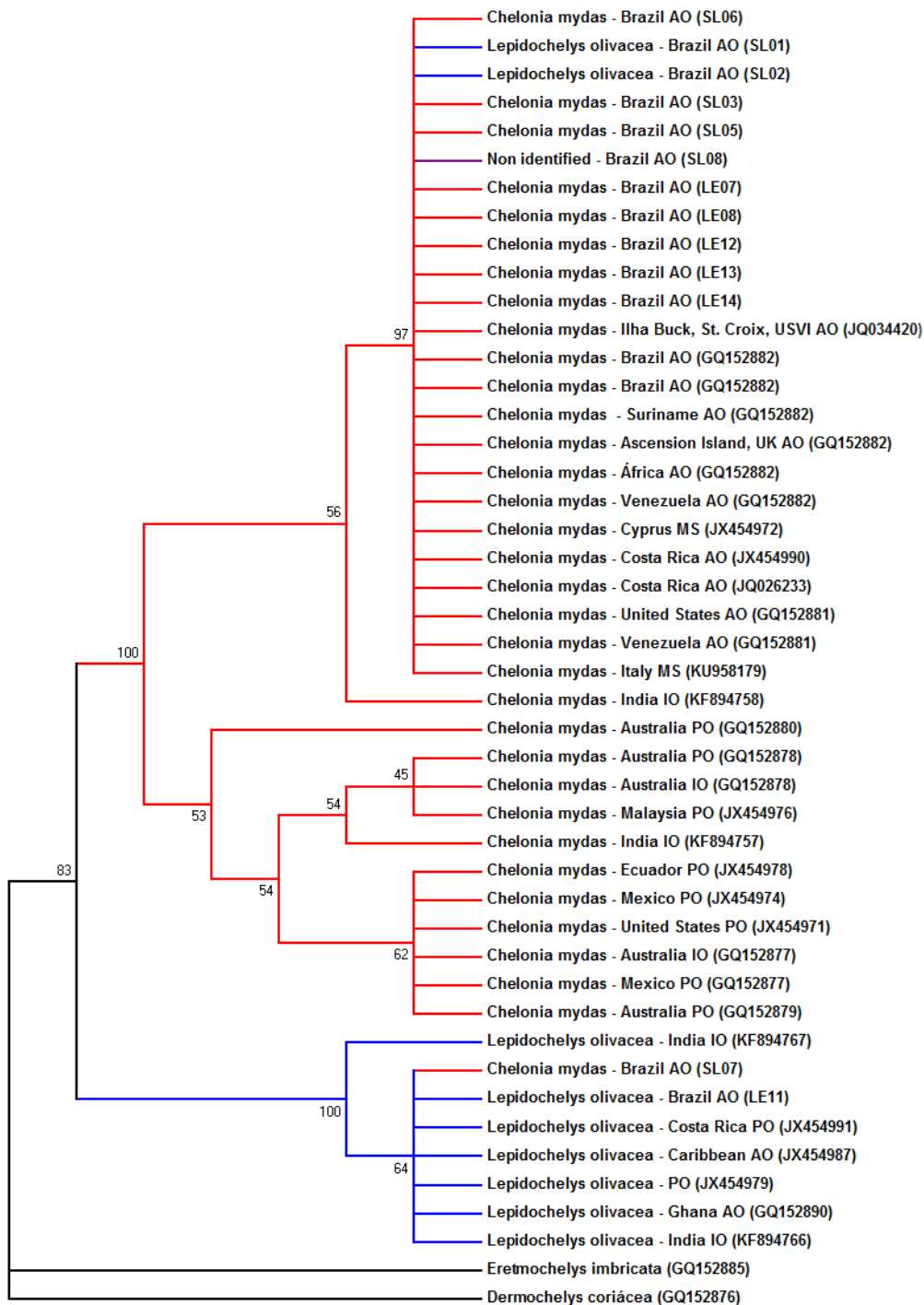


Figura 3. Árvore de *Neighbor-joining* de seqüências de COI de amostras de *Chelonia mydas* e *Lepidochelys olivacea* encalhadas no Maranhão junto com seqüências dessas mesmas especies retiradas do Genbank (em parênteses, SL: amostras da ilha do Maranhão; Le: amostras coletadas no município de Atins e o número de acesso da seqüência no banco de dados). Os possíveis casos de hibridização introgressiva estão representados pelos ramos azul dentro do vermelho e vice-versa. Em rocho, o haplótipo dos dois exemplares em que não foi possível a identificação morfológica devido ao avançado estado de decomposição, mas que o DNA permitiu identificá-lo à espécie *C. mydas*. AO: Oceano Atântico; MS: Mar Mediterrâneo; IO: Oceano Índico; PO: Oceano Pacífico.

Apêndice 1 - Sequências retiradas do GeneBank e suas devidas localidades

- *Chelonia mydas*

JX454990.1 *Chelonia mydas* isolate CGG-01Cmyd mitochondrion, complete genome - Tortuguero, CR (Costa Rica)

JX454972.1 *Chelonia mydas* isolate Sample ID 9277 mitochondrion, complete genome – Península de Karpas, CY (Chipre)

JX454978.1 *Chelonia mydas* isolate 54903 mitochondrion, partialgenome - Galápagos, EC (Equador)

JX454974.1 *Chelonia mydas* isolate 13768 mitochondrion, complete genome - Ilhas Revillagigedo, MX (México)

JX454971.1 *Chelonia mydas* isolate 8855 mitochondrion, complete genome - FrenchFrigateShoals, FFS, Havaí, USA

JX454976.1 *Chelonia mydas* isolate 28666 mitochondrion, complete genome – Ilha Sipadan, MY (Malásia)

GQ152882.1 *Chelonia mydas* voucher CM-COI-A2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partialcds; mitochondrial - Atol das Rocas, RN, BR; Trindade, ES, BR; Suriname; Ilha de Ascensão, UK (Reino Unido); Guiné-Bissau, África; Ilha das Aves, VE (Venezuela)

GQ152881.1 *Chelonia mydas* voucher CM-COI-A1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partialcds; mitochondrial - Florida, USA; Ilha das Aves, VE (Venezuela)

GQ152877.1 *Chelonia mydas* voucher CM-COI-P1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partialcds; mitochondrial - Ilhas Cocos, AU (Austrália); Ilhas Lacepedes, AU (Austrália); PortBradshaw, AU (Austrália); Michoacán, MX (México)

GQ152878.1 *Chelonia mydas* voucher CM-COI-P2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partialcds; mitochondrial - Ilha Heron, AU (Australia); SootReef, AU (Austrália)

GQ152879.1 *Chelonia mydas* voucher CM-COI-P3 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partialcds; mitochondrial - BrambleCay, AU (Austrália)

GQ152880.1 *Chelonia mydas* voucher CM-COI-P4 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partialcds; mitochondrial - BrambleCay, AU (Austrália)

KF894758.1 *Chelonia mydas* voucher AUTK69 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partialcds; mitochondrial – Índia, NE

KF894757.1 *Chelonia mydas* voucher AUTK79 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partialcds; mitochondrial – Índia, NE

JQ026233.1 *Chelonia mydas* mitochondrion, partialgenome – Tortuguero, CR (Costa Rica)

JQ034420.1 *Chelonia mydas* mitochondrion, partialgenome – Ilha Buck, St. Croix, USVI (Ilhas Virgens Americanas)

KU958179.1 *Chelonia mydas* cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partialcds; mitochondrial – Avola, Sicília, IT (Itália)

- *Lepidochelys olivacea*

JX454991.1 *Lepidochelys olivacea* isolate CGG-01Lol mitochondrion, complete genome - Ostional, CR (Costa Rica)

JX454987.1 *Lepidochelys olivacea* isolate 78920 mitochondrion, partialgenome – Caribe

JX454979.1 *Lepidochelys olivacea* isolate 55352 mitochondrion, partialgenome – OP, Nordeste (Oceano Pacífico)

GQ152890.1 *Lepidochelys olivacea* voucher LO-COI-AP1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partialcds; mitochondrial - Ada Foah, Gana; AxleyIstans, AU (Austrália)

KF894766.1 *Lepidochelys olivacea* voucher AUTK76 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partialcds; mitochondrial – Índia, NE

KF894767.1 *Lepidochelys olivacea* voucher AUTK77 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partialcds; mitochondrial – Índia, NE

- *Dermochelys coriacea*

GQ152876.1 *Dermochelys coriacea* voucher DC-COI-AP1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

- *Eretmochelys imbricata*

GQ152885.1 *Eretmochelys imbricata* voucher EI-COI-P1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

Anexo I – Normas da revista Conservation Biology

Observação aos membros da banca: Os artigos publicados na revista possuem alinhamento a esquerda, porém, por uma questão de estética, adotamos o alinhamento justificado.

Instructions for Authors

Conservation Biology welcomes submissions that address the science and practice of conserving Earth's biological diversity. Conservation Biology articles emphasize issues germane to any of Earth's ecosystems or geographic regions and apply diverse approaches to analyses and problem solving. Manuscripts relevant to conservation that transcend the particular ecosystem, species, or situation described are prioritized for publication.

Before you submit your manuscript read these instructions and the Style Guide for Authors.

Article Categories and Word Limits

Word count includes all text from the Abstract through Literature Cited. It does not include table or figure legends or the body of tables. Manuscripts substantially exceeding the word limits specified below will not be sent for review. Revisions addressing reviewer comments should also not substantially exceed word limits even if reviewers request additional information.

Contributed Paper (3000-6000 words): research papers on original theoretical, empirical, or synthetic research in the natural or social sciences.

Research Note (3000 words): similar to Contributed Paper, but results and inferences may be more focused or preliminary.

Review (7500 words): comprehensive reviews of topics generally well developed in the literature that provide a thorough synthesis of findings or illuminate trends and have relevance at both global and local levels.

Essay (6000 words): essays on novel issues in the natural or social sciences important to conservation science and practice; grounded in evidence from the literature, policy, or legal documents; typically relevant beyond a single case study; and that propose evidence-based solutions to problems. Well-reasoned and supported submissions that debate alternative perspectives, challenge current paradigms, or advance new conservation-science approaches are encouraged.

Conservation Practice and Policy (5000 words): papers on applications of conservation science to specific goals for management, policy, or education that report findings important to decision making, planning, and implementation of conservation and provide opportunities for learning. They can include discussions of setbacks, failures, and unintended consequences.

Conservation Methods (up to 6000 words): papers on a novel conservation-science method.

Comment (2000 words): papers that respond to material previously published in Conservation Biology.

Diversity (2000 words): short opinion pieces on conservation concepts, methods, or applications or on current and immediate regional or global conservation problems.

Letter (1000 words): communications regarding topics of immediate interest to readers, including observations on controversial subjects or papers previously published in Conservation Biology.

Book Reviews are by invitation only. All books for possible review should be sent directly to Gabor Lövei (gabor.lovei@agro.au.dk).

Submission Requirements

Submit manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/conbio>. If you do not have adequate internet access for online submission via ScholarOne Manuscripts, please contact Frith Jarrad (fjarrad@conbio.org).

Conservation Biology uses double-blind peer review. In the

- submitted manuscript,
- supporting information (online appendices), and
- file names there should be no content, except for self-citations, through which authors or their institutions could be identified. If data, for example, are being made available through a data-storage service, make sure you cannot be identified from these files. FigShare allows authors to remain anonymous.

Submit a separate manuscript cover page with specified information (see “Cover Page” below). Do not include cover-page information anywhere in the manuscript itself.

The cover page is not visible to reviewers.

You are required to provide the names of 6 potential reviewers. These reviewers must not have close professional or personal relationships with any of the authors. The identity of reviewers is kept confidential unless reviewers choose to waive confidentiality.

Transparency, Openness, and Reproducibility

All authors are required to complete a 15-point checklist aimed at promoting study reproducibility and data transparency such that another researcher with relevant expertise could replicate the study. You may wish to review the Transparency, Openness, and Reproducibility Checklist before you start the submission process. It is available under the Instructions and Forms tab in ScholarOne.

Do not cite work or data that have not been published or are not available. Include such work or data as online Supporting Information and cite it as such in the text. If the data are available in a publically accessible database, cite that database. Include databases in Literature Cited.

Files to Upload

Your manuscript must be in Word format. Upload a separate cover page (see “Cover Page” below and “Manuscript Requirements” above). You may place figures at the end of the manuscript or go through the step in the submission process to upload figures separately. Place figure legends in two places: on a separate page after tables and on figures themselves. At submission, no particular file format for figures is required. Tables must be in the manuscript (not uploaded separately to ScholarOne), follow Literature Cited, and precede figure legends. Name each uploaded file based on its general content, and do not use author initials or names (e.g., Manuscript, AppendixS1). Use the figure number in names of figure files (e.g., Fig1).

ORCID Identifier

An ORCID identifier uniquely identifies you and links you with your professional activities. Entering your ORCID number upon submission is required. For more information, go to <http://orcid.org/>. If you are opposed to having an ORCID identifier, contact Frith Jarrad (fjarrad@conbio.org).

Manuscript Specifications

The Conservation Biology Style Guide for Authors contains detailed information on how to format a manuscript for Conservation Biology.

Language: English (We strongly recommend authors whose first language is not English ask a colleague who is a native English speaker to proofread the manuscript before submission.)

Spacing: double-space all text

Line numbering: number all lines (except in figures and tables)

Footnotes: do not use footnotes

Organization: Use introduction, methods, results, and discussion (IMRAD) format. Do not combine results and discussion sections.

Title: Do not use a hanging title (those with a colon or dash), a title that is a complete sentence, a headline-like title, an interrogative title, or a title that references colloquialisms or popular culture (see Style Guide for Authors for more information).

Article impact statement: In ≤ 140 characters (including spaces and punctuation), provide a statement that reveals the paper's primary importance to conservation. See "Article Impact Statement" below. Units of measure: metric only. Page numbering: number all pages.

Spelling: U.S. rather than British

Cover Page

Submit your cover page as a separate document. It should NOT be part of the manuscript itself. The cover page must include the title of the paper; an article impact statement (see below); a running head (short title of 35 or fewer characters); a list of 5-8 keywords (do not repeat words in the title); word count (all text from the first word of the Abstract through the last word of the Literature Cited but not including table or figure legends or the body of tables); authors' complete mailing addresses (including street addresses and postal codes) at the time the work was conducted and present addresses if different; name and complete address (including email) of the person to whom correspondence should be sent; and text of your Acknowledgments section.

Article Impact Statement

In ≤140 characters (including spaces and punctuation) this statement should emphasize the paper's practical or policy importance. The statement may be a report of the primary result or theme if the practical or policy importance of the result is obvious. It should not be a reiterated or lengthened title or describe what is presented (e.g., "A method to x is presented.").

Abstract

Include the abstract before the introduction as part of the main document. Above the abstract provide the title of the paper. Manuscripts in all categories except Comments, Diversity, and Letters must contain an abstract that does not exceed 300 words. The abstract should state concisely the aims, methods, principal results, and major inferences of the work (i.e., it should be a miniversion of the paper), and introduction, methods, results, and discussion sections should be easily identifiable. Do not include incomplete or uninformative descriptions (e.g., "A new method of analysis is described." or "We discuss how our approach promotes sustainable management of forest systems."). Do not state conclusions that are not supported by evidence reported in the abstract. Do not provide a Spanish translation of the abstract.

Human and Animal Subjects

When reporting on studies that involve human participants or animal subjects, supply a statement in methods that specifies the ethical guidelines with which you complied. Include permit numbers, if applicable.

Citations

Use the following format for literature citations in the text: (Buckley & Buckley 2000b; Pacey 2004). Arrange strings of citations in chronological order (oldest first). Do not cite work that has not been published as either unpublished or data not shown. A submitted manuscript is not published. Examples of how to handle unpublished materials and how to cite proceedings and databases are provided in the Style Guide for Authors.

Tables and Figures

A reader should be able to interpret tables and figures without referring to the text and having read only the abstract. Include no more than 1 supporting element (i.e., table or figure) for

every 4 pages of text (from the Abstract through Literature Cited). If a table or figure has only a few data points, incorporate the data into the text. Text boxes are not allowed.

Tables

Tables must be double-spaced, should not contain vertical or horizontal rules, must not duplicate material in the text or figures, and must be editable in Word. Table legends should be one sentence. Additional explanations should be placed in footnotes. Tables should not contain color, gray-scale shading, or other graphical elements.

Figures

Whether you upload figure files to Scholar One or place them at the end of the manuscript file, place the figure's legend below the figure and supply a separate figure-legend page in the manuscript. Double-space figure legends. Figures must be of sufficient quality and resolution to remain clear at 60% reduction. Before publication, you will be required to supply figures in tif, eps, or pdf format. Author portrayals of borders or other jurisdictional boundaries on maps in published articles do not imply support of those representations by the journal or the Society for Conservation Biology.

For guidance on best practices in graphic design, refer to the following link used with permission from *Oryx - The International Journal of Conservation and Fauna & Flora International*: <http://scalar.usc.edu/works/graphics-for-conservation/index>.

Online Supporting Information

Online appendices are allowed. They can be in any format. They should be named, cited, and described in text as specified in the Style Guide for Authors. These materials are not copyedited or proofread.

Translations

After provisional acceptance, your paper will be edited and sent back to you for a response. When you submit your response to editing, you may upload a translation of the manuscript as an online appendix (i.e., supporting information). The translation should match the version of the manuscript you submitted in response to editing (all track changes accepted). List the translation in the Supporting Information paragraph (see Style Guide for Authors).

Required Permission

If you have a figure or table in your manuscript that was published previously, after acceptance you must obtain permission from the copyright holder to reprint it and supply the notice of permission as an additional file in ScholarOne.

Review Process

If the editor in chief determines the manuscript topic is appropriate for the journal and meets standards of content and presentation, then a regional editor examines the submission and decides to recommend rejection, nominate reviewers, or assign the manuscript to a handling editor with expertise in the manuscript's topic. If the handling editor deems the manuscript is of sufficient quality and novelty, she or he will request reviews. Once reviews have been received, the handling editor or regional editor summarizes reviewer points, provides an assessment, and makes a recommendation (accept, revise, or reject) to the editor in chief. Revisions are usually sent for assessment to the regional or handling editor, who may then initiate another round of review.

Appeal Process

An appeal of a publication decision must be made within 3 months of a decision. Address appeals directly to the editor in chief via the email link on the online submission webpage.

Accepted-Article Publication, Early View, and Issue Compilation

Unedited and unformatted accepted manuscripts are posted online in Accepted Articles shortly after a paper has been accepted. Manuscript editing and then the production process follow. When ready, the final typeset version supplants the Accepted Article, and the paper is published online in Early View and is later placed in an issue (online and hard copy). The official date of publication is the day the paper is posted to Accepted Articles.

Media-Release Process

When an article is posted to Accepted Articles (AA), it is accessible to the media and others. If a media release is to be prepared, inform the senior editor (emain@conbio.org) immediately after receiving the acceptance email, and AA posting will be postponed. When the release is ready, a posting date will be set by the production editor. The release can go out after midnight on the posting day. Your paper will receive the most attention if you publicize it at the AA stage, after which most media outlets will consider it old news.

Page and Color-Printing Charges

Conservation Biology is published on behalf of the Society for Conservation Biology, a nonprofit organization. Payment of page charges helps the society support conservation science, management, policy, and education worldwide. Charges are US\$150 per page for those with grant or institutional support for publication costs and \$50 per page for those without support who are able to pay at this rate. Page charges will be waived for authors who affirm they do not have institutional support or other means of paying page charges. An author's ability to pay will not influence whether the manuscript is accepted for publication or any aspect of the review process. If a paper is to be open access, there are no page charges.

The fee for printing color figures, US\$700 per page, can be waived only if open-access publication (see OnlineOpen below) is selected. We discourage the use of color because in some countries download speeds are slow and gray-scale photocopies of articles are common. Figures may be in color online and in gray-scale in print for no charge. However, reference to color cannot be made in the figure legend or in the text, and elements in the gray-scale version must be distinguishable.

Postacceptance Points

If after acceptance a manuscript is changed substantially for any reason, it is the responsibility of the lead author to inform coauthors of these changes.

Currently, we do not use author-supplied photographs on the cover. However, you may supply photos to the senior editor for consideration by the social media editor for use on Twitter and Facebook in postings related to your paper. Supply a caption for each photo.

Policy on Duplicate Publication of Research Results

Submission of a manuscript to Conservation Biology implies it has not been published previously and is not being considered for publication elsewhere (see also, Preprint Policy below). At the time of submission, describe in the cover letter any data, figures, or text in the manuscript that have been published or that are in press, submitted, or soon to be submitted elsewhere. If any of the data in the manuscript have been included in other published or unpublished manuscripts, the legend of each table or figure reporting such data must cite those manuscripts. All authors are expected to conform to the Society for Conservation Biology's Code of Ethics, available under the Instructions and Forms tab in ScholarOne .

OnlineOpen

OnlineOpen (i.e., open access) is available to authors who wish to make their article available for free or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee of US\$3000 to ensure the article is made available to nonsubscribers upon publication via Wiley Online Library and is deposited in the funding agency's preferred archive. The fee for OnlineOpen cannot be reduced or waived.

In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published pdf of their article on a website, institutional repository, or other free public server immediately on publication. More information on OnlineOpen is available at https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp.

Copyright Information

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting her or him to log in to Author Services, where, via the Wiley Author Licensing Service (WALS), this person will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

If the OnlineOpen option is not selected, the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs at CTA Terms and Conditions: http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp.

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following: Creative Commons License Open Access Agreements (OAA), Creative Commons Attribution License OAA, Creative Commons Attribution Non - Commercial License OAA, or Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License OAA. To preview the terms and conditions of these open-access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services (http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/CopyrightLicense.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK), you will be given the opportunity to publish

your article under a CC - BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the journal's compliant self-archiving policy please visit <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Preprint Policy

Conservation Biology does not consider for publication articles that have been published in substantial part or in full in a scientific journal, book, or similar entity. Organizational working papers and manuscripts that appear on the author's personal website or in an institutional repository, however, are not viewed as prior publication, and such articles can therefore be submitted. The journal will also consider for publication manuscripts that have been posted in a recognized preprint archive (such as arXiv and PeerJ PrePrints), provided that upon acceptance of the article for publication the author is still able to grant the journal an exclusive license to publish the article or agrees to the terms of an OnlineOpen agreement and pays the associated fee.

It is the responsibility of authors to inform the journal at the time of submission if and where their article has been posted previously. If the manuscript is accepted for publication in Conservation Biology, authors are required to provide a link to the final manuscript alongside the original preprint version.

Archive Policy

Authors of papers that are not open access may self-archive the accepted (but not final) version of their paper on their own personal websites, in their company's or institution's repository or archives, and in not-for-profit subject-based repositories. Self-archiving cannot occur until 12 months after online publication, regardless of funding source or institution. Self-archived papers should link to Wiley's standard terms of use for self-archived articles and not use any form of Creative Commons license (<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>). The deposited version must link to the final article on Wiley Online Library. It should not be updated or replaced by the final article.

December 2017