

**MONIQUE PÓVOA DE OLIVEIRA**

**QUANTIFICAÇÃO DA VARIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ESCUDOS DA CABEÇA  
EM NATIMORTOS DE CHELONIIDAE (TESTUDINES) NA PRAIA DE GURIRI,  
SÃO MATEUS, ES, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Pedro Seyferth Ribeiro  
Romano

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

O48q  
2019

Oliveira, Monique Póvoa de, 1994-

Quantificação da variação morfológica dos escudos da cabeça em natimortos de Cheloniidae (Testudines) na praia de Guriri, São Mateus, ES, Brasil / Monique Póvoa de Oliveira. – Viçosa, MG, 2019.

1 dissertação eletrônica (53 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Pedro Seyferth Ribeiro Romano.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Animal, 2019.

Referências bibliográficas: f. 37-45.

Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/>

1. Chelonioidea. 2. Chelonioidea - Morfometria.  
3. Hibridização. I. Romano, Pedro Seyferth Ribeiro, 1979-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.  
III. Título.

CDD 22. ed. 597.928

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

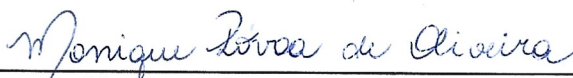
**MONIQUE PÓVOA DE OLIVEIRA**

**QUANTIFICAÇÃO DA VARIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ESCUDOS DA CABEÇA  
EM NATIMORTOS DE CHELONIIDAE (TESTUDINES) NA PRAIA DE GURIRI,  
SÃO MATEUS, ES, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 08 de outubro de 2019.

Assentimento:



---

Monique Póvoa de Oliveira  
Autora



---

Pedro Seyferth Ribeiro Romano  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Fazer um mestrado não é fácil. São dois longos anos, mas que passam voando. Nesse tempo, são muitas as dificuldades enfrentadas no dia a dia, e o cansaço e a frustração muitas vezes tomam conta. Porém, a cada dia que passou, cresci mais como pesquisadora e percebi o quanto eu quero lutar pela educação e pesquisa no meu país. Também cresci como ser humano, ao lado de pessoas especiais a quem devo agradecimentos. Portanto, eu gostaria de agradecer a todos de que alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional nesses dois últimos anos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram a estudar e buscar ser uma pessoa melhor. Pai, obrigada pela força e os bons conselhos sobre a vida, por estar sempre presente e por sempre me lembrar o significado de família. Mãe, onde quer que você esteja, o amor que eu sinto por você me faz querer ser uma pessoa melhor todos os dias. Você me inspira a cada dia, me faz levantar a cabeça e querer ser forte e nunca desistir, aproveitar o que a vida tem de bom. Espero que você esteja em paz.

À minha irmã, que esteve ao meu lado durante toda vida e principalmente durante o mestrado. Obrigada por dividir seu guarda-roupa, e por dividir seu tempo comigo. E também por ser uma ótima babá quando eu precisava sair para espalhar.

Felipe, por estar comigo em todos os momentos, bons e ruins, de risadas e de estresse. Obrigada por compartilhar sua vida e seus sonhos comigo. Por ser tão companheiro até nas horas em que eu estou de cara fechada (sempre). E também por todos os bilhetinhos com mensagens de motivação nessa reta final.

Meu filhote, Vítor, obrigada por existir. Mesmo nos meus dias mais nublados e chuvosos você brilha, e me faz perceber como é bonito ser uma pessoa iluminada. Obrigada por me amar até quando eu não sou a melhor mãe que eu posso ser. Obrigada por me mostrar o quanto a vida faz sentido e que eu não preciso de muito pra ser feliz.

A todos que são família: avós, primos, tios e sogros. Obrigada pelo incentivo e pela força nos momentos em que mais precisei. Sem o carinho de vocês não estaria onde estou hoje.

Aos meus amigos mais que especiais, Serrão, Lê, Lu e Filipe: amo vocês. Minha vida em Viçosa não teria a mesma graça sem a participação de vocês. Obrigada pelas risadas, boas cervejas e ombros quando eu preciso desabafar.

Aos meus companheiros de bancada e que roubam minha cadeira no LAPOC,

vocês são grandes amigos. Obrigada pelas conversas de alto nível intelectual e cultural que só vocês conseguem ter. Também pelas conversas de baixo nível, mas que garantem as melhores risadas nas nossas infinitas horas de café. Nati, em especial, por dividir as dificuldades e os vários bolos comigo, em meio a muitas crises de ansiedade de ambas. E de nada, pelas vezes em que deixei seus dias mais felizes com minha linda voz enquanto eu cantava pravocê.

Ao Pedro, que se tornou além de um professor e orientador, um amigo, que nunca deixou faltar café e sempre compreendeu minhas dificuldades durante esse processo. Além disso, obrigada por insistir comigo que Morfometria Geométrica valia a pena. Sempre que precisar de alguém para defender essa técnica eu estarei lá. Posso até usar como título das minhas palestras “A benção da MG”.

A Fundação Projeto Tamar, por viabilizar as coletas e pelos dados cedidos, muito obrigada. Um agradecimento especial à bióloga de campo Mariana Oshiro e todo o pessoal da base do Tamar – ICMBio de Guriri (ES), que me receberam tão bem durante as coletas.

Ao professor Jorge Dergan pelos ensinamentos, além do espaço e materiais cedidos para realização de parte do projeto.

Ao professor Simon Luke Elliot, coordenador do Laboratório de Interações Inseto-Microrganismo, pelo espaço e materiais cedidos.

À Verônica Saraiva, pela grande ajuda e paciência para tentar extrair DNA comigo. Também agradeço a preocupação em saber sobre o andamento do projeto.

Aos membros da banca Giselle, Gustavo e Verônica, pela revisão, correção, apoio e críticas construtivas.

Aos técnicos e secretários do Departamento de Biologia Animal que estão sempre dispostos a nos ajudar.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade da realização deste trabalho.

*“Prezo insetos mais que aviões.  
Prezo a velocidade das tartarugas mais que a dos mísseis.  
Tenho em mim um atraso de nascença.  
Eu fui aparelhado para gostar de passarinhos.  
Tenho abundância de ser feliz por isso.”*

- Manoel de Barros -

## RESUMO

OLIVEIRA, Monique Póvoa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2019. **Quantificação da variação morfológica dos escudos da cabeça em natimortos de Cheloniidae (Testudines) na Praia de Guriri, São Mateus, ES, Brasil.** Orientador: Pedro Seyferth Ribeiro Romano.

Variações na morfologia e número de escudos epidérmicas do casco de tartarugas marinhas são comuns, o que pode levar à identificação taxonômica incorreta. Neste trabalho, espécimes natimortos de Cheloniidae foram coletados na praia de Guriri, São Mateus (ES), a fim de avaliar a variação morfológica observada. Cerca de 70% da amostra coletada (144 indivíduos) apresentaram variação no número de escudos inframarginais esperados para as espécies encontradas. Com base principalmente no número de escudos, foram encontrados oito morfótipos diferentes, incluindo os morfótipos de diagnóstico das espécies com maior número de desova na região, *Caretta caretta* (n = 55) e *Lepidochelys olivacea* (n = 12). Além disso, três indivíduos de *Eretimochelys imbricata* podem ser identificados como um terceiro morfótipo. Os outros cinco morfótipos encontrados mostraram características diagnósticas de mais de uma espécie, sendo previamente interpretados como espécimes de *C. caretta* que apresentam variações fenotípicas. A variação na forma da cabeça foi, portanto, quantificada pelo método da morfometria geométrica (GMM) usando pontos de referência para verificar a quais espécies os espécimes "anômalos" anteriormente classificados como *C. caretta* poderiam pertencer. Os resultados revelaram maior semelhança desses espécimes com os indivíduos indubitáveis de *C. caretta*, levando-nos a concluir que esses indivíduos apresentam variação de plasticidade dessa espécie. Além disso, considerando que há uma alta taxa de hibridação em populações que nidificam na costa brasileira, sugerimos que indivíduos anômalos de três dos cinco morfótipos "anômalos" encontrados poderiam ser o resultado da reprodução entre *C. caretta* com *L. olivacea* ou *E. imbricata*.

Palavras-chave: Chelonioidea. Caretteni. Morfometria geométrica. Escamas epidérmicas. Hibridização.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Monique Póvoa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2019.  
**Quantification of the morphological variation of the head scutes in stillborn specimens of Cheloniidae (Testudines) in Guriri Beach, São Mateus, ES, Brazil.**  
Adviser: Pedro Seyferth Ribeiro Romano.

Variations in the morphology and number of epidermal scales on marine turtle's shell are common, which can lead to incorrect taxonomic identification. In this work, stillborn specimens of Cheloniidae were collected at the Guriri beach, São Mateus (ES) in order to evaluate the observed morphological variation. About 70% of the collected specimens (144 individuals) showed supernumerary and/or asymmetry in the number of inframarginal scutes. Based primarily on the number of scutes, eight different morphotypes were found, including the diagnostic morphotypes of the species with the highest number of spawning in the region, *Caretta caretta* (n = 55) and *Lepidochelys olivacea* (n = 12). Besides that, three *Eretimochelys imbricata* individuals could be identified as a third morphotype. The other five morphotypes found shown diagnostic features of more than one species, being previously interpreted as *C. caretta* specimens that show phenotypic variations. The variation in the shape of the head was therefore quantified via geometric morphometry method using landmarks in order to verify which species the "anomalous" specimens previously classified as *C. caretta* could belong. The results revealed greater similarity of these specimens to the undoubtful *C. caretta* individuals, leading us to conclude that these individuals show plasticity variation of this species. Moreover, taking into account that there is a high rate of hybridization in populations that nest on the Brazilian coast, we suggest that individuals of three of the five "anomalous" morphotypes found could be the result of the cross reproduction of *C. caretta* with *L. olivacea* or *E. imbricata*.

Keywords: Chelonioidae. Caretini. Geometric morphometrics. Epidermal scales. Hybridization

## SUMÁRIO

### 1 - INTRODUÇÃO

1.1 - AS TARTARUGAS MARINHAS .....	9
1.2 - MORFOMETRIA GEOMÉTRICA.....	12
1.3 - OBJETIVOS.....	13

### 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - ÀREA DE ESTUDO.....	14
2.2 - AMOSTRAGEM .....	14
2.3 - IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES.....	14
2.4 - IDENTIFICAÇÃO DA FASE DE DESENVOLVIMENTO.....	15
2.5 - DEFINIÇÃO DE MARCOS ANATÔMICOS.....	15
2.6 - FOTOGRAFIA .....	17
2.7 - TESTE DE ERRO .....	18
2.8 - MORFOMETRIA GEOMÉTRICA.....	19
2.8.1 - ANÁLISES MORFOMÉTRICAS .....	19
2.9 - ANÁLISES MOLECULARES.....	20

### 3 - RESULTADOS

3.1 - IDENTIFICAÇÃO DAS VARIAÇÕES MORFOLÓGICAS .....	21
3.2 - ANÁLISE UNIVARIADA.....	25
3.3 - ANÁLISES MULTIVARIADAS .....	25
3.3.1 - ANÁLISE DOS PRINCIPAIS COMPONENTES (PCA) .....	25
3.3.2 - ANÁLISE DISCRIMINANTE .....	29
3.3.3 - ANÁLISE DE PRINCIPAIS COORDENADAS (PCOA) .....	30
3.4 - TÉCNICAS MOLECULARES.....	31

### 4 - DISCUSSÃO.....

32

### 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....

35

### 6 - OBJETIVOS .....

37

### ANEXO I.....

46

### ANEXO II.....

47

### ANEXO III.....

53

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1 - AS TARTARUGAS MARINHAS

As espécies viventes de Testudines Batsch, 1788, que abrange as tartarugas marinhas, cágados e jabutis, estão classificadas em 13 famílias e incluídas nas subordens Pleurodira e Cryptodira, que apresentam monofileticismo sustentado por dados moleculares e morfológicos (Gaffney & Meylan, 1988; Shaffer, Meylan & Mcknight, 1997; Cervelli *et al.*, 2003; Krenz *et al.*, 2005). A origem do grupo ainda causa muita discussão no meio científico, porém concorda-se que é uma linhagem muito antiga, datando do Permiano (Lyson *et al.*, 2013; Brinkman, Holroyd & Gardner, 2013). O casco é uma estrutura óssea, que diferencia os Testudines dos demais vertebrados, formada a partir da conexão das vértebras, costelas, gastrália estendida e cintura escapular com a derme, durante o Triássico (Li *et al.*, 2008; Schoch & Sues, 2015). A parte dorsal é denominada carapaça e a parte ventral, plastrão; e todo o casco é recoberto por escudos epidérmicos (Brinkman, Holroyd & Gardner, 2013).

As tartarugas marinhas viventes pertencem à subordem Cryptodira, e se distribuem por quase todo o mundo, com registros desde o Ártico até a Tasmânia (Meylan & Donnely, 1999), porém a maior parte dos registros reprodutivos ocorrem em águas tropicais e subtropicais (Márquez, 1990). As setes espécies viventes estão divididas em duas famílias: Cheloniidae e Dermochelyidae.

A família Cheloniidae apresenta carapaça e plastrão ósseos, recobertos de escudos epidérmicos e seus representantes são a tartaruga cabeçuda (*Caretta caretta* Linnaeus, 1758), tartaruga verde (*Chelonia mydas* Linnaeus, 1758), tartaruga de pente (*Eretmochelys imbricata* Linnaeus, 1766), tartaruga oliva (*Lepidochelys olivacea* Eschscholtz, 1829), tartaruga de Kemp (*Lepidochelys kempii* Garman, 1880) e a tartaruga plana (*Natator depressus* Garman, 1880) (Santos *et al.*, 2011). A família Dermochelyidae apresenta carapaça com redução dos ossos, conectados por tecido cartilaginoso, recoberta por pele. Atualmente, a tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriácea* Vandelli, 1761) é a única representante da família Dermocheliidae (Bonin, Devaux & Dupré, 2006; Santos *et al.*, 2011).

As tartarugas marinhas apresentam comportamento altamente migratório e estão presentes em grande parte dos oceanos, em múltiplos habitats (Márquez, 1990).

Também possuem um complexo ciclo de vida, semelhante entre as espécies, e essas características são dificultadores das pesquisas populacionais, ecológicas e comportamentais sobre esses animais (Márquez, 1990; Bondioli, 2009; Santos *et al.*, 2011). O litoral brasileiro é considerado local prioritário para conservação das tartarugas marinhas, pois além de ocorrerem desovas de cinco das sete espécies viventes, possui importantes sítios de alimentação (Santos *et al.*, 2011), o que nos permite encontrar tartarugas marinhas em todas as suas fases de vida. Por esses motivos, podemos considerar o litoral brasileiro um lugar de grande importância para estudos sobre esses animais. Além disso, as populações brasileiras apresentam uma alta taxa de hibridização quando comparadas com populações de outras regiões do mundo (Vilaça & Santos, 2013) e ainda existe introgressão (cruzamento dos híbridos com uma das espécies parentais) em algumas populações (Vilaça *et al.*, 2012).

No estado do Espírito Santo (ES), há registros de desova das cinco espécies de tartaruga marinha encontradas no litoral brasileiro. O norte do estado é o principal sítio de desova de *Dermochelys coriacea* no Brasil (Thomé *et al.*, 2007; Passamani & Mendes, 2007; Santos *et al.*, 2011). *Caretta caretta* é a espécie com maior número de desovas no ES (Passamani & Mendes, 2007; Baptistotte, Thomé & Bjørndal, 2003). Para *Lepidochelys olivacea*, essa não é a principal região de desova, porém são registrados ninhos no norte do estado (Passamani & Mendes, 2007; Santos *et al.*, 2011). Os ninhos de *Eretmochelys imbricata* não são muito incidentes nessa região e os de *Chelonia mydas*, são muito raros, já que essa última espécie desova principalmente em ilhas oceânicas (Passamani & Mendes, 2007; Santos *et al.*, 2011). Na amostra deste trabalho foram identificadas três espécies: *C. caretta*, *L. olivacea* e *E. imbricata*.

*Caretta caretta* é popularmente conhecida como tartaruga cabeçuda por apresentar uma cabeça grande (em relação às outras espécies) (Bonin, Devaux & Dupré, 2006). Pode ser identificada pelos cinco pares de escudos laterais (ou costais) na carapaça de coloração marrom-amarelada, três pares de escudos inframarginais no plastrão, que apresenta coloração amarelo claro, dois pares de escudos pré-frontais e três pares de escudos pós-orbitais na cabeça (Márquez, 1990; Wyneken, 2001). Quando adultos, são animais de grande porte, chegando a pesar 180 kg (Pritchard & Mortimer, 1999). Apresenta distribuição circunglobal (Dodd, 1988) e, no Brasil, as áreas prioritárias

de desova estão localizadas no Sergipe, norte da Bahia, Espírito Santo e norte do Rio de Janeiro (Marcovaldi & Marcovaldi, 1999; Marcovaldi & Chaloupka, 2007; Santos et al, 2011). A estação reprodutiva acontece entre os meses de agosto a fevereiro, com pico das desovas entre outubro e dezembro (Marcovaldi & Laurent, 1996). Esta é a espécie com maior ocorrência de desovas no litoral brasileiro (Marcovaldi & Chaloupka, 2007).

A espécie *Lepidochelys olivacea* apresenta coloração verde oliva e por isso é popularmente conhecida como tartaruga oliva. Pode ser identificada por possuir seis ou mais pares de escudos laterais na carapaça de coloração verde oliva escuro, quatro pares de escudos inframarginais com poros no plastrão, que apresenta coloração amarelo claro, dois pares de escudos pré-frontais e três pares de escudos pós-orbitais na cabeça (Márquez, 1990; Wyneken, 2001). São animais de médio porte, chegando a pesar 50 kg quando adultos (Pritchard & Mortimer, 1999; Silva et al., 2007). Apresenta distribuição em oceanos tropicais e subtropicais, sendo provavelmente a mais abundante das espécies de tartarugas marinhas no mundo (Márquez, 1990; Marcovaldi, 2001; Plotkin, 2007). No Brasil, as áreas com maior ocorrência vão do sul do estado de Alagoas ao litoral norte da Bahia com maior densidade de desovas no estado de Sergipe (Castilhos & Tiwari, 2006; Silva et al., 2007; Santos et al. 2011). O Espírito Santo é uma área secundária de desova, com poucos ninhos registrados por temporada (Santos et al. 2011). A temporada reprodutiva vai de setembro até março (Silva et al. 2007).

A espécie *Eretmochelys imbricata* pode ser facilmente reconhecida pela justaposição de seus escudos da carapaça, característica que a leva a ser popularmente chamada de tartaruga de pente. Possui quatro escudos laterais (ou costais) de coloração marrom, podendo ou não apresentar manchas, quatro pares de escudos inframarginais sem poros no plastrão, que apresenta coloração amarelo claro, dois pares de escudos pré-frontais e três pares de escudos pós-orbitais na cabeça (Márquez, 1990; Wyneken, 2001, Santos et al., 2011). São animais de médio porte, chegando a pesar cerca de 80 kg quando adultos (Pritchard & Mortimer, 1999; Santos et al., 2011). Sua distribuição é principalmente em regiões tropicais, (Márquez, 1990; Santos et al., 2011) e as principais áreas de desova de *E. imbricata* no Brasil são o norte da Bahia, Sergipe e sul do Rio Grande do Norte (Marcovaldi et al., 2011). O Espírito Santo é uma área com raras desovas, com poucos ninhos registrados por temporada (Santos et al. 2011). A

temporada de reprodução ocorre principalmente entre novembro e março, e no Rio Grande do Norte, ainda se estende até abril (Marcovaldi *et al.*, 2011).

A redução drástica das populações de tartarugas que desovam nas praias brasileiras, que aconteceu há algumas décadas, está ligada à ação antropogênica, direta ou indiretamente (Santos *et al.*, 2011; Bondioli, 2009). A caça desses animais era muito comum, pois a carne e ovos são consideradas iguarias culinárias e o casco muito usado para fabricação de ornamentos (Campbell, 2003; Santos *et al.*, 2011). Nas últimas décadas a caça deixou de ser uma grande ameaça graças à criação de projetos de educação e conscientização ambiental e de políticas conservacionistas (Santos *et al.*, 2011). Entretanto a captura acidental por redes de pesca ainda é uma das grandes causas de morte desses animais por afogamento (Santos *et al.*, 2011). O acelerado crescimento urbano nas regiões costeiras é um dos fatores que mais causa impacto nas populações de tartarugas atualmente: postes de luz, automóveis na praia e poluição das águas e das áreas costeiras afetam todas as fases do ciclo de vida desses animais (Bondioli, 2009, Santos *et al.*, 2011). Mesmo com as crescentes ações de proteção e preservação, todas as sete espécies viventes ainda encontram-se ameaçadas em algum nível (IUCN, 2017).

## 1.2 - MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

O método de morfometria geométrica consiste na identificação e análise do *shape* (configuração; formato) de uma estrutura, permitindo a descrição matemática das variações da forma em relação a fatores causais (Bookstein, 1991) a partir de marcos anatômicos (MAs) e suas posições relativas em coordenadas cartesianas (Rohlf & Slice, 1990; Rohlf & Marcus, 1993). Além disso, o método permite que o tamanho e a forma sejam analisados independentemente. É uma ferramenta eficaz para avaliar e comparar os padrões de variação morfológica e as alterações nos padrões ecológicos, de desenvolvimento e filogenéticos (Rohlf e Marcus, 1993; Dryden e Mardia, 1998, Claude *et al.*, 2004).

Os MAs são digitalizados em uma estrutura anatômica bidimensional (2D) ou tridimensional (3D), e devem ser correspondentes entre todos os objetos da amostra. Assim, são adquiridos os dados de coordenadas brutas dos MAs, fornecendo

informações geométricas de suas posições relativas (Marcus *et al.* 1996; Adams *et al.* 2004; Zelditch, Swiderski & Sheets *et al.* 2012). Os dados passam pelo Ajuste de Procrustes (Bookstein, 1991), a fim de eliminar os efeitos de escala, posição e orientação, e então, apenas a variação da forma é mantida e os dados podem ser tratados estatisticamente.

O método tem sido cada vez mais empregado, pois é um método de baixo custo e tem aplicação em diversas áreas da ciência. Com tartarugas, a morfometria geométrica já foi empregada em estudos de diferenciação sexual (Valenzuela *et al.*, 2004; Ceballos & Valenzuela 2011; Sönmez *et al.* 2016; Kircher & Wyneken, 2017), morfologia funcional (Dickson & Pierce, 2019; Stayton, 2011), variações morfológicas intra-específica (Coelho *et al.*, 2018), alometria (Casale *et al.*, 2017) e evolução (Claude *et al.*, 2004; Wernerbug *et al.*, 2014; Ascarrunz, Claude & Joyce, 2019).

### 1.3 - OBJETIVOS

Geral:

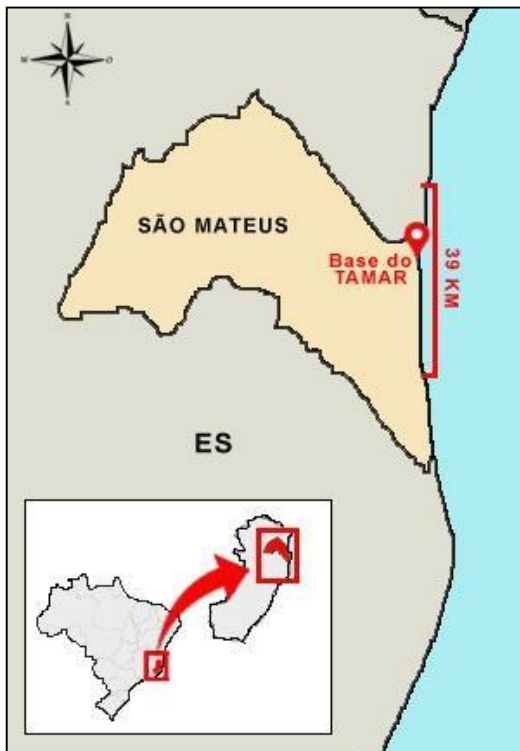
- Testar se a configuração dos escudos da cabeça de Cheloniidae pode ser usada para diferenciar os morfótipos, descritos a partir de características do casco

Específicos:

- Descrever variações fenotípicas do casco em natimortos identificados como *Caretta caretta* na praia de Guriri, ES.
- Quantificar a variação geométrica da cabeça de natimortos de Cheloniidae a fim de diferenciar espécies.
- Identificar morfótipos de possíveis híbridos entre as espécies que nidificam na praia de Guriri-ES.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - ÁREA DE ESTUDO



Natimortos de Cheloniidae foram coletados durante o monitoramento de praias, executado pela Fundação Projeto Tamar, em aproximadamente 39 Km de praia, que cobrem do Farol Sul, na cidade de Conceição da Barra, ao norte, até a localidade de Barra Nova, São Mateus, ao sul (Figura 1). Guriri é uma ilha, na cidade de São Mateus, no norte do Espírito Santo. Localiza-se a 18°42'58" sul 39°51'21" oeste, e está ao norte da foz do Rio Doce. Sua área total é de 2.338,727 km<sup>2</sup> e está a 215 Km de Vitória, capital do estado.

Figura 1: Mapa da cidade de São Mateus, ES, onde situa-se o balneário de Guriri. Destaca-se em vermelho a região de coleta das amostras deste trabalho.

### 2.2 - AMOSTRAGEM

Foram realizadas duas coletas entre março/junho de 2016 (1ª coleta) e fevereiro/março de 2017 (2ª coleta), totalizando 322 espécimes coletados. Desses, muitos foram descartados devido ao avançado estágio de decomposição em que se encontravam. Estão tombados 215 indivíduos, coletados em 35 ninhos diferentes, no Laboratório de Paleontologia e Osteologia Comparada, do Departamento de Biologia Animal, da Universidade Federal de Viçosa. Foi coletado tecido muscular de 66 espécimes para estudos moleculares.

### 2.3- IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

As características morfológicas usadas para identificação das espécies de Cheloniidae são, principalmente, o número de escudos laterais na carapaça, número de

escudos inframarginais no plastrão, número de escudos pré-frontais na cabeça e formato da cabeça (Whynneken, 2001). Os espécimes coletados foram identificados seguindo a chave taxonômica de Whynneken (2001) (Anexo I).

#### **2.4 - IDENTIFICAÇÃO DE FASE DE DESENVOLVIMENTO**

A fase de desenvolvimento de todos os espécimes da amostra foi determinada utilizando a chave descrita em Miller *et al.* (2017) (tradução no Anexo II). O procedimento foi realizado para minimizar ruídos na análise morfométrica, evitando variações relacionadas à estágios de formação muito diferentes e que acarretam em variações ontogenéticas nos escudos. Todos os espécimes selecionados para o estudo estão entre a fase 28 e 31b, quando todos os escudos da cabeça já estão formados e o embrião já possui todas as características de um recém-nascido, permitindo a identificação precisa da espécie.

#### **2.5 - DEFINIÇÃO DE MARCOS ANATÔMICOS**

Foram escolhidos, na vista dorsal da cabeça, 21 MAs (Figura 2, Quadro 1), de acordo com a visualização de pontos que captassem o formato geral da cabeça e a geometria dos escudos craniais. Os MAs foram digitalizados nos dois lados da cabeça, a fim de facilitar a visualização da diferença entre os formatos da cabeça entre as espécies estudadas. Destaca-se que o conjunto de MAs é baseado em uma região anatômica diferente daquela utilizada para determinação dos morfótipos, que foram definidos com base na morfologia, contagem e simetria de escudos do casco.

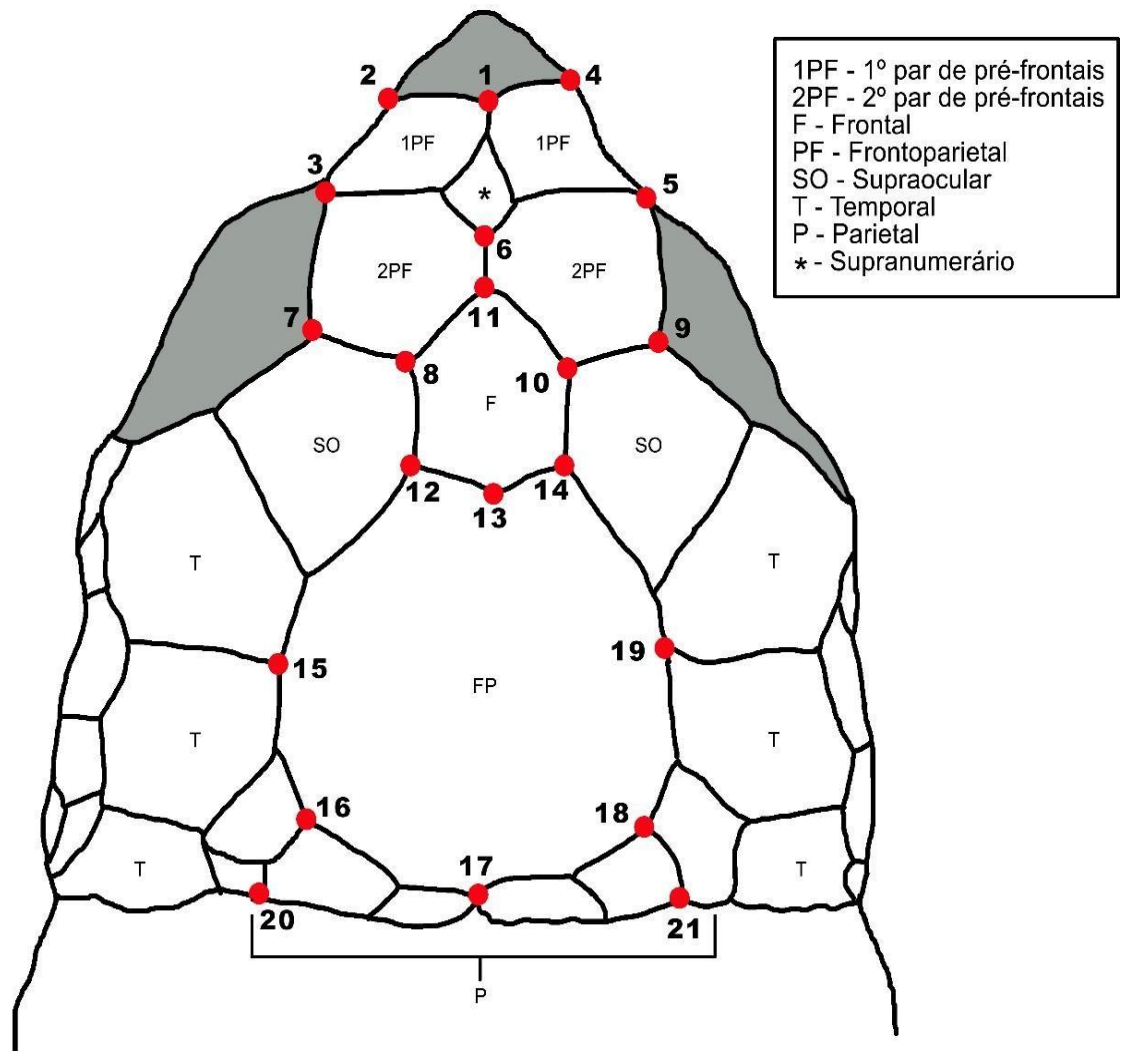


Figura 2: Esquema da vista dorsal da cabeça de *Caretta caretta*. Os pontos em vermelho indicam os marcos anatômicos, numerados na ordem de digitalização.

Quadro 1: Descrição dos Marcos Anatômicos.

MA	Tipo	Descrição
1	I	Contato crânio-medial entre o 1º par de escudo pré-frontal
2/4	III	Extremidade crânio-lateral do 1º par de escudo pré-frontal
3/5	I	Contato lateral entre o 1º e o 2º par de escudo pré-frontal
6	I	Contato medial do 2º par de escudo pré-frontal
7/8	I	Contato lateral entre o 2º par de escudo pré-frontal e o escudo supraocular
9/10	I	Contato entre o 2º par de escudo pré-frontal, escudo supraocular e escudo frontal
11	III	Extremidade crânio-medial do escudo frontal
12/14	I	Contato entre os escudos supraocular, frontal e frontoparietal
13	I	Contato medial entre os escudos frontal e frontoparietal
15/19	III	Extremidade lateral do escudo frontoparietal
16/18	I	Contato lateral entre os escudos frontoparietal, parietal e temporal
17	III	Extremidade médio- caudal do escudo frontoparietal
20/21	III	Extremidade latero-caudal do escudo parietal

## 2.6 - FOTOGRAFIA

Para obtenção das imagens da vista dorsal da cabeça de cada espécime, foi definido um protocolo de fotografia (descrito abaixo). As imagens foram adquiridas de maneira padronizada, sempre utilizando a mesma câmera Canon EOS1000D Digital Rebel XS com lente de 18-25mm. As fotografias armazenadas em arquivos de formato JPEG (*Joint Photographics Experts Group*).

A uniformização da captação das imagens em um mesmo eixo ortogonal foi feita com a utilização de um tripé como suporte para a câmera digital, que foi acoplada de modo que a lente ficasse paralela ao objeto (espécime) que estava em uma superfície plana, a uma distância de 31,5 cm. A câmera foi usada nomodo manual, com as seguintes configurações: zoom total, abertura F10.0, velocidade 1/13 e ISO 800. A cabeça de cada espécime foi centralizada a fim de manter todos na mesma posição. O foco foi ajustado manualmente para cada fotografia. Todos os espécimes foram

fotografados junto ao número de identificação e uma escala, em sequência, sem desmontar a estrutura “câmera/tripé/fundo”, a fim de padronizar e minimizar erros na aquisição das fotos.

## 2.7 - TESTES DE ERRO

Os testes de erro de digitalização e repetição foram feitos seguindo o protocolo de Adriens (2007). O teste de erro de digitalização permitiu avaliar a habilidade em localizar e assinalar os MAs em diferentes réplicas de uma mesma imagem. O objetivo deste teste é identificar MAs de difícil repetitividade, para que estes sejam excluídos das análises por embutir erros em demasia. O teste de erro de repetição permite avaliar a habilidade em posicionar os objetos a serem fotografados, ou seja, o objetivo desse teste é avaliar se o posicionamento objeto/lente é padronizado e não afeta a capacidade de adquirir configurações dos espécimes.

Para o teste de digitalização foi criado um arquivo no formato TPS no programa TPS Util 1.76 (Rohlf, 2018). Neste arquivo foram digitalizados 21 MAs em um subconjunto de 12 espécimes, identificados inicialmente como *Caretta caretta* e *Lepidochelys olivacea*. Foram digitalizadas, utilizando o programa TPS Dig 2.31 (Rohlf, 2017a), três réplicas de uma mesma fotografia de cada espécime. A avaliação do resultado deste teste foi feita a partir da visualização de gráficos que mostram pontos equivalentes às imagens digitalizadas, utilizando os programas TPS Small 1.34 (Rohlf, 2017b) e TPS Relw 1.69 (Rohlf, 2017c). No TPS Small podemos identificar quais são os pontos com distribuição anormal, que provavelmente possuem erros de marcação evitáveis. O TPS Relw permite identificar quais marcos estão envolvidos no erro. Os MAs 20 e 21 foram retirados, pois estavam em uma região de difícil visualização e causando ruídos na análise (ver resultados).

Para o teste de repetição foram sorteados 29 espécimes. A repetição foi feita em três dias diferentes usando a mesma amostra. As diferenças entre as coordenadas dos MAs obtidas a partir de fotos diferentes do mesmo espécime não deve ser alta. Diferenças pronunciadas são interpretadas como inabilidade para posicionar o espécime. A avaliação desse teste foi feita usando o TPS Relw, de maneira similar ao

teste de erro de digitalização de MAs a partir da mesma fotografia.

## 2.8 - MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

Foram selecionados 203 espécimes para a análise morfométrica, que foram fotografados segundo o protocolo já descrito anteriormente. Foi criado um arquivo TPS, usando o programa TPS Util. Os 19 MAs definidos após os testes de erro foram digitalizados usando o programa TPS Dig. Usando o programa TPS Relw, foi feita a superimposição através das operações de Procrustes, para que parâmetros indesejados (diferenças de tamanho, posição e orientação) fossem removidos da matriz, restando apenas a variação da forma (Rohlf & Slice, 1990). O método de superimposição adotado foi o *Generalized Procrustes Analysis* (GPA), no qual os centroides dos espécimes são transpostos para a coordenada 0,0. As configurações são alinhadas pelo método dos quadrados mínimos (GLS, *Generalized Least-Squares Procrustes superimposition method*) e o tamanho do centróide é transformado em  $\cong 1$  em todos os exemplares (removendo a variável de tamanho) (Zelditch, Swiderski & Sheets *et al.* 2012). Foram salvas uma matriz com os dados após o ajuste de procrustes (*aligned specimens*), uma matriz com a configuração média de cada espécime (*consensus*) e uma outra matriz com os resíduos de procrustes escalonados (*Aligned specimens scaled*) para cada arquivo salvo.

### 2.8.1- ANÁLISES MORFOLÓGICAS

A matriz de dados dos resíduos de procrustes escalonados com todos os espécimes foi importada no programa PAST 3.20 (Hammer, 2018), onde classificou-se os morfótipos encontrados em grupos com cores diferentes, e foram feitas análises uni e multivariadas para interpretação dos dados. Comparamos a variação da média dos centroides de tamanho da cabeça entre os morfótipos através do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. O teste de Kruskal-Wallis é uma ANOVA não-paramétrica, que compara as médias de uma série de grupos univariados (Hammer, 2018). A escolha de um teste não paramétrico foi feita por termos um n amostral baixo ( $n < 10$ ) na maioria dos grupos, o que poderia afetar a normalidade dos dados.

Foi feita a Análise de Principais Componentes (PCA), que expõe a variação que

cada componente principal (PC) retém na explicação dos dados. Usando o TPS Relw, observou-se a qual característica fenotípica a variação em cada PC está associada. Também foi feita uma PCA utilizando apenas os morfótipos anômalos, a fim de observar a estruturação no morfoespaço sem a interferência dos morfótipos de espécies puras. Depois de analisar os resultados das PCAs, seguiu-se uma Análise Discriminante usando a matriz total de dados, com o objetivo de facilitar a visualização dos grupos pré-definidos. Para a análise discriminante foram ignoradas as premissas, portanto o resultado não têm validade estatística.

Ainda foi feita a análise de principais coordenadas (PCoA) com intuito de diminuir ainda mais a dimensionalidade dos dados e facilitar a interpretação dos resultados. Os dados utilizados consistem em uma matriz diagonal contendo valores de distância de Procrustes par a par entre as configurações médias dos morfótipos encontrados, obtidos através do TPS Splin 1.20 (Rolhf, 2004). Essa análise é baseada na PCA, porém é mais geral, pois outras medidas de dissimilaridade pode ser usada em relação à distância euclidiana (Jongman, 1995). Neste trabalho foi usada a distância Euclidiana, já que as variáveis eram quantitativas e o expoente de transformação com valor padrão  $c=2$  (Hammer, 2018).

## **2.9 - EXTRAÇÃO DE DNA**

Neste trabalho, utilizamos animais encontrados mortos dentro dos ninhos, que foram abertos manualmente após a eclosão, portanto nenhum animal foi sacrificado. O tempo de morte dos indivíduos coletados não pode ser identificado. Foi coletado tecido muscular daqueles que estavam em estágio inicial de decomposição (tecidos frescos, sem descoloração e que não apresentavam cheiro forte resultante de decomposição). Cerca de 500  $\mu$ L de tecido muscular foram coletados das patas anteriores de cada espécime e fixado em etanol absoluto em ependorfs de 1 mL.

Usando o protocolo de Doyle & Doyle (1987), foram feitas três extrações do DNA. Seguiu-se então com o mesmo protocolo, fazendo modificações no tempo de lise celular. Ainda foi feita a extração com alteração do material para purificação do DNA, usando fenol: clorofórmio. Também foram feitas extrações de DNA por meio dos Kits de

extração Wizard® Genomic DNA Purification Kit e Wizard® SV Genomic DNA Purification System.

Foi feita eletroforese em gel de agarose 0,8% para visualização do DNA, além de quantificação em espectrofotômetro NanoDrop One (Thermo Scientific).

### **3 – RESULTADOS**

#### **3.1 - IDENTIFICAÇÃO DAS VARIAÇÕES MORFOLÓGICAS**

Em mais de 50% da amostra tombada foi observada algum tipo de variação no número de escudos do casco (n=144), impedindo a identificação específica dos mesmos. Neste trabalho, chamaremos de *anômalos* os indivíduos que apresentam alguma variação quanto à morfologia típica das espécies analisadas. Os morfótipos anômalos constituem variações morfológicas das espécies, podendo corresponder a plasticidades fenotípicas conhecidas (assimetrias de escudos e/ou presença de escudos supranumerários) ou potenciais híbridos. Foram identificadas três espécies na amostra: *Caretta caretta*, *Lepidochelys olivacea* e *Eretimochelys imbricata*, além de cinco morfótipos diferentes entre os anômalos.

Os indivíduos aqui identificados como anômalos apresentaram variação no número de escudos laterais na carapaça e de escudos inframarginais ou variações apenas no número de escudos inframarginais. Também foram observados 133 espécimes com escudos supranumerários entre os escudos frontais. Outras características diagnósticas, como o número de escudos pré-frontais e a forma da carapaça, não apresentaram variação.

Variações muito parecidas foram unidas em apenas um morfótipo e os morfótipos e com apenas um representante foram excluídos da análise. No Quadro 2 são descritos os oito morfótipos encontrados na praia de Guriri. Foi utilizada a seguinte fórmula a fim de facilitar a identificação da descrição do morfótipo: n° de escudos laterais (EL) na carapaça/ n° de escudos inframarginais (EIM) direitos/ n° de escudos inframarginais esquerdos. O número de escudos laterais só foi incluído uma vez na fórmula pois não houve assimetria em nenhum dos espécimes usados na análise. O símbolo “\*” foi usado ao lado dos EIM que apresentavam poros.

Quadro 2: Descrição dos oito morfótipos encontrados na praia de Guriri.

MORFÓTIPO	ESPÉCIE	DESCRIÇÃO	FÓRMULA	N
<b>M1</b>	<i>Caretta caretta</i>	5 EL de cada lado e 3 EIM sem poros decada lado	5/3/3	55
<b>M2</b>	<i>Lepidochelys olivacea</i>	6 ou mais EL de cada lado e 4 EIM comporos de cada lado	$\geq 6/4^*/4^*$	12
<b>M3</b>	<i>Eretimochelys imbricata</i>	4 EL de cada lado e 4 EIM sem poros decada lado	4/4/4	3
<b>M4</b>	Anômalo	5 EL de cada lado e 4 EIM sem poros decada lado	5/4/4	59
<b>M5</b>	Anômalo	5 EL de cada lado e 5 EIM sem poros decada lado	5/5/5	4
<b>M6</b>	Anômalo	5 EL de cada lado, 3 EIM sem poros no ladodireito e 4 EIM sem poros no lado esquerdoou 5 EL de cada lado, 4 EIM sem poros no lado direito e 3 EIM sem poros no lado esquerdo	5/3/4 ou 5/4/3	54
<b>M7</b>	Anômalo	5 EL de cada lado, 3 EIM sem poros no ladodireito e 5 EIM sem poros no lado esquerdoou 5 EL de cada lado, 5 EIM sem poros no lado direito e 3 EIM sem poros no lado esquerdo	5/3/5 ou 5/5/3	4
<b>M8</b>	Anômalo	5 EL de cada lado, 4 EIM sem poros no ladodireito e 5 EIM sem poros no lado esquerdoou 5 EL de cada lado, 5 EIM sem poros no lado direito e 4 EIM sem poros no lado esquerdo	5/4/5 ou 5/5/4	9

A figura 3 ilustra a forma média dos escudos da cabeça de cada morfótipo. As imagens foram feitas no programa TPS Thin-plate Spline (Rohlf, 2004), onde a média de cada morfótipo é comparada à média geral e a diferença entre elas é quantificada pela distância de procrustes ( $d^2$ ).

Constatou-se a presença de mais de um morfótipo em um mesmo ninho. Vale destacar o ninho tombado como H4, onde foram encontrados seis morfótipos diferentes, incluindo todos os morfótipos das espécies puras. Os 3 espécimes identificados como *Eretmochelys imbricata* estavam em ninhos diferentes, identificados como ninhos de *Caretta caretta*. O ninho 29 apresentou espécimes com morfologia de *C. caretta*, *E. imbricata* e um morfótipo intermediário entre as duas espécies. A relação dos morfótipos se encontram no Anexo III.

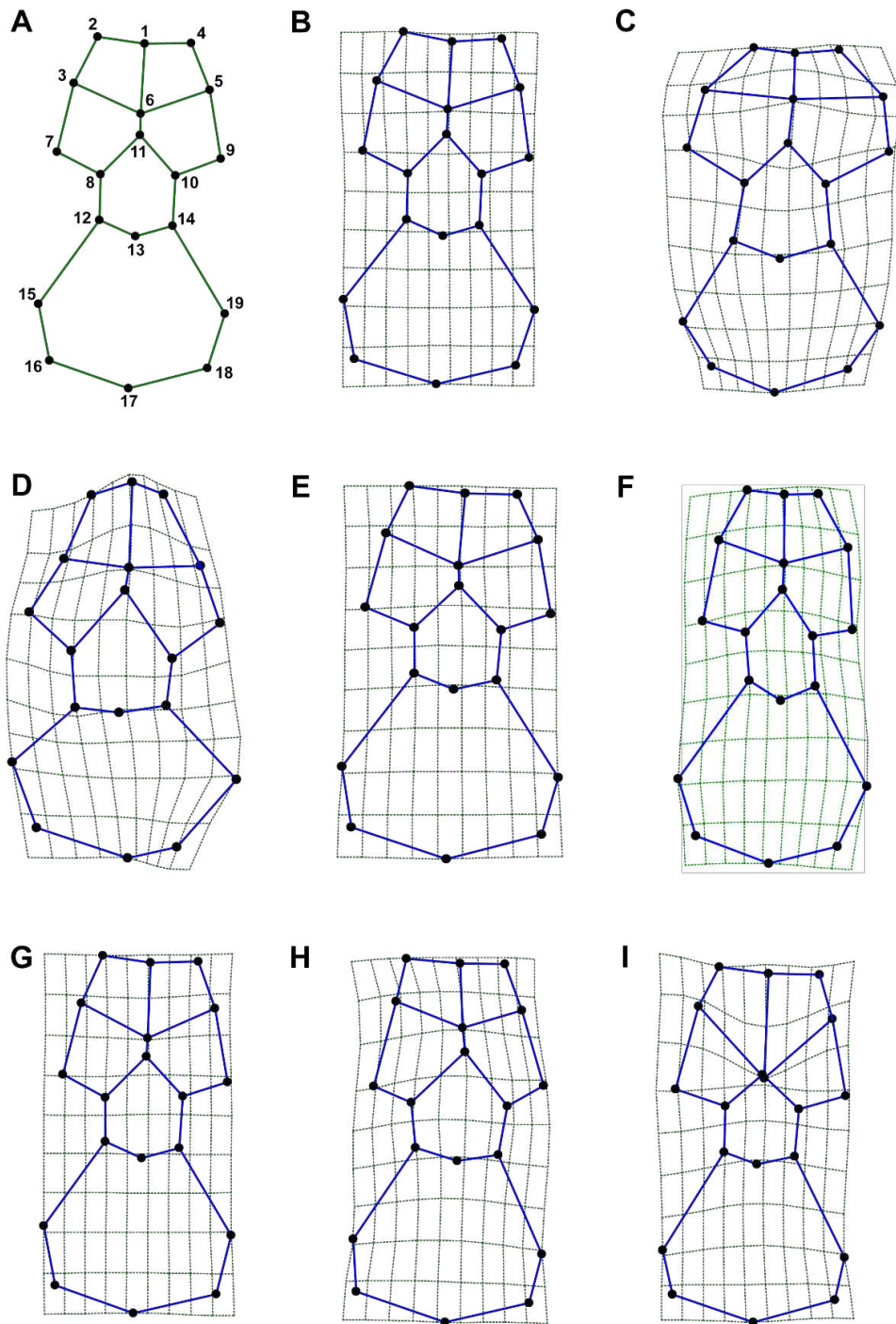


Figura 3: Forma média dos oito morfótipos encontrados na praia de Guriri, ES. A) Média geral, com os marcos anatômicos numerados na ordem de digitalização. B) Média do M1 ( $d^2=0,00784$ ). C) Média do M2 ( $d^2=0,05204$ ). D) Média do M3 ( $d^2=0,05766$ ). E) Média do M4 ( $d^2=0,01090$ ). F) Média do M5 ( $d^2=0,03663$ ). G) Média do M6 ( $d^2=0,00687$ ). H) Média do M7 ( $d^2=0,02757$ ). I) Média do M8 ( $d^2=0,03606$ ).

### 3.2 - ANÁLISE UNIVARIADA

A Figura 4 mostra o Box Plot que compara as médias de tamanho da cabeça entre os oito morfótipos. Visualmente não há grandes diferenças entre eles. O resultado do teste Kruskal-Wallis ( $p= 0,162$ ) aponta que não há diferença significativa entre as médias dos morfótipos analisados.

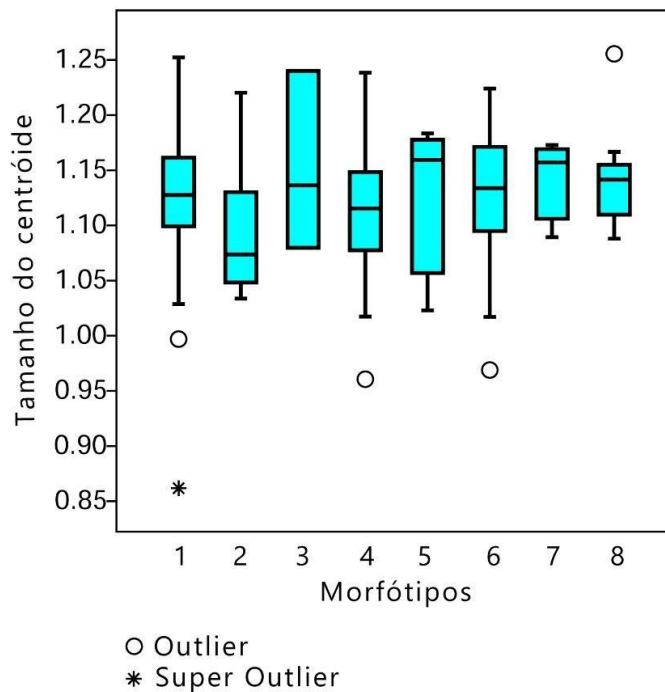


Figura 4: Box Plot do tamanho do centróide da cabeça dos oito morfótipos descritos neste trabalho.

### 3.3 - ANÁLISES MULTIVARIADAS

#### 3.3.1 - ANÁLISE DE PRINCIPAIS COMPONENTES (PCA)

A PCA da amostra total (Figura 5) mostra uma grande sobreposição entre os oito morfótipos encontrados no morfoespaço representado por pares de PCs (PC1xPC2, PC1xPC3 e PC2xPC3). O PC 1 (variação=30,7%) está associado principalmente ao alongamento e estreitamento do focinho no escore positivo, enquanto a região ocular se alarga. Também ocorre um estreitamento na região caudal no escore positivo. O PC 2 (variação=18,7%) corresponde à localização do contato medial entre o 2º par de escudos pré-frontais (MA 6). No escore positivo o contato entre eles ocorre mais próximo ao

escudo frontal e o focinho possui o formato de “V” mais pronunciado. Também no escore positivo, há um sutil alargamento na região posterior da cabeça. O PC 3 (variação=10,7%) está associado principalmente ao formato do focinho, que no escore positivo apresenta o formato em “V”, quando toda a parte anterior da cabeça fica mais fina e a parte posterior alarga-se. O PC 4 (variação= 7%) corresponde ao estreitamento da cabeça, principalmente na região central e caudal. O PC 5 (variação= 6%) está associado ao alargamento da região ocular no escore positivo. O PC 6 (variação=5,7%) descreve o estreitamento da região ocular enquanto a região mais rostral alarga-se. Os seis PCs descritos estão acima da linha de Broken stick.

A PCA apenas dos anômalos (Figura 6) também não mostra uma boa estruturação. O PC 1 retém 33,3% da variação e está associado principalmente ao alongamento e estreitamento do focinho no escore positivo, enquanto a região ocular se alarga. Também ocorre um estreitamento na região caudal no escore positivo. O PC 2, que retém 18,5% da variação, está associado à região do contato medial entre o 2º par de escudos pré-frontais. No escore positivo, o contato ocorre mais próximo ao escudo frontal. O PC 3, que retém 9,2% da variação, está associado, ao aumento da largura de todo o crânio nos escores positivos. O PC 4 (variação=7%), em escores positivos descreve o aumento da largura na porção rostral, e central do crânio, enquanto a porção caudal estreita-se. O PC 5 (variação= 6,5%) está na linha de corte de Broken stick, e corresponde, no escore positivo, ao estreitamento do focinho enquanto a região central sofre um leve alargamento.

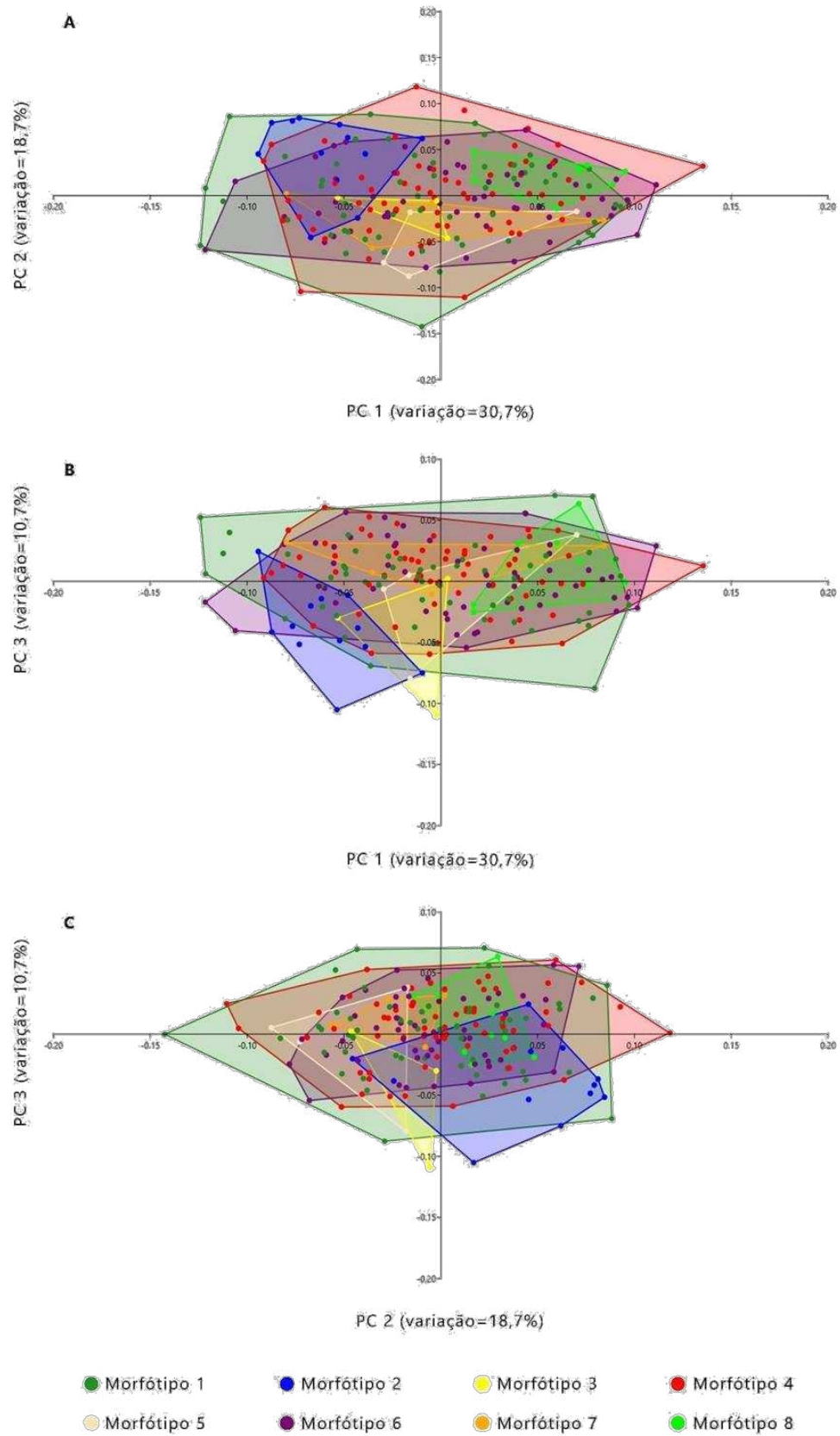


Figura 5: Plots da Análise de Principais componentes (PCA) com a amostra total separada nos oito morfótipos descritos neste trabalho. A) PC1 X PC2; B) PC1 X PC3; C) PC2 X PC3.

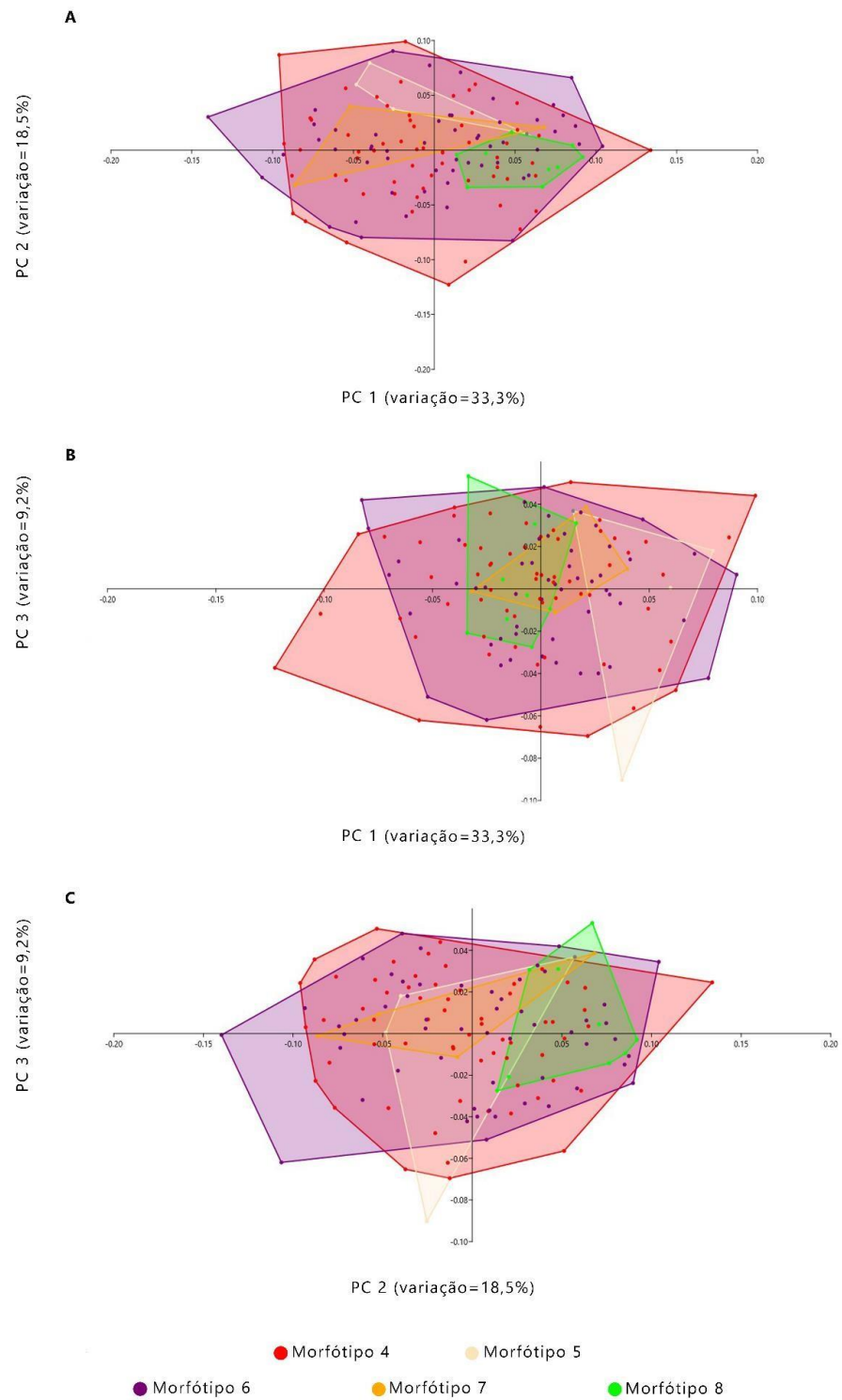


Figura 6: Plots da Análise de Principais componentes (PCA) com os cinco morfótipos anômalos descritos neste trabalho. A) PC1 X PC2; B) PC1 X PC3; C) PC2 X PC3.

### 3.3.2 - ANÁLISE DISCRIMINANTE

Levando em conta que nenhuma estruturação foi facilmente visualizada nos PCAs, pois há grande sobreposição entre os morfótipos, foi realizada uma análise discriminante a partir de variáveis canônicas dos oito morfótipos, já que essa análise amplifica as diferenças entre os grupos, gerando uma melhor visualização da estruturação dos grupos. É necessário explicitar que as premissas foram negligenciadas, portanto essa análise não possui verdade estatística, e foi usada neste trabalho apenas para facilitar a visualização dos morfótipos distintos. Os resultados (Figura 7) demonstram que os indivíduos de *Lepidochelys olivacea* (M2) apresentam escores negativos do CV1 maiores e *Eretmochelys imbricata* (M3), escores positivos do CV2 maiores. *Caretta caretta* (M1) e os demais morfótipos anômalos (M4-M8) se concentram em escores (dos CV1 e CV2) mais próximos de zero, isto é, escores não tão altos para ambas variáveis canônicas.

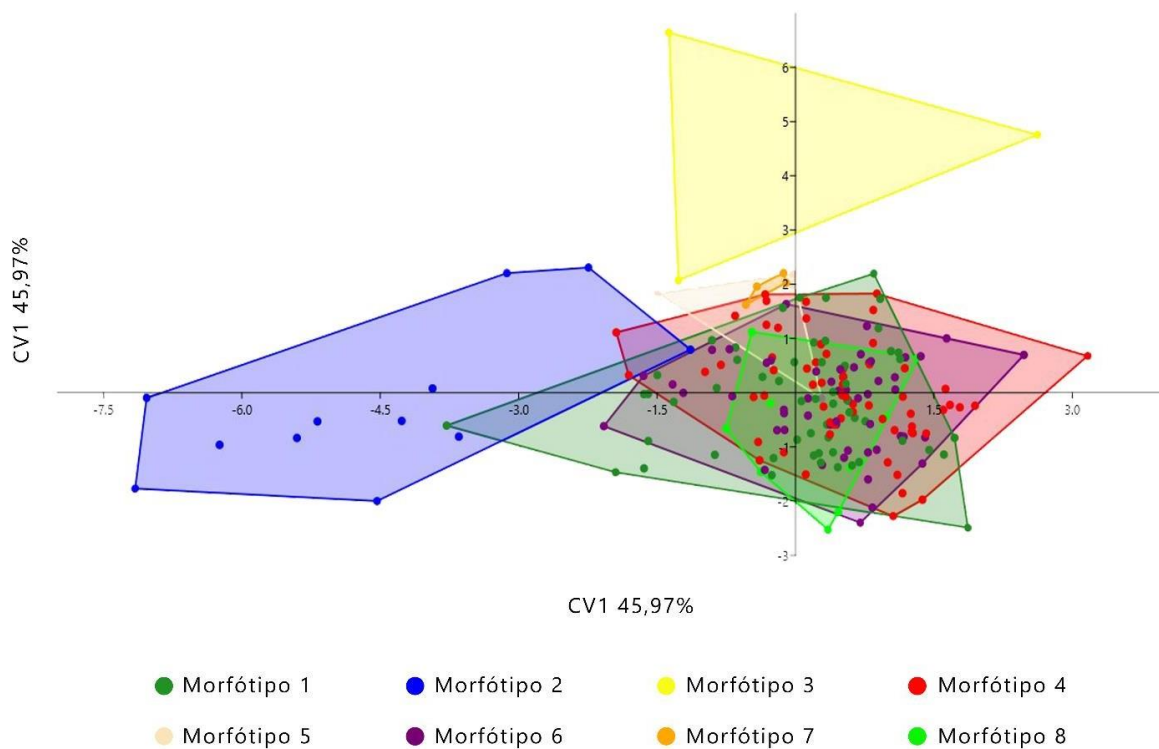


Figura 7: Análise discriminante realizada com os oito morfótipos descritos neste trabalho.

### 3.3.3 - ANÁLISE DE PRINCIPAIS COORDENADAS (PCoA)

O resultado, apresentado na Figura 8, plota o M1 (*Caretta caretta*) próximo aos morfótipos M4 e M6, todos com escores negativos na CV1 e muito próximos à zero na CV2. O M2 (*Lepidochelys olivacea*) apresenta escores muito positivos nos dois CVs. O M3 (*Eretmochelys imbricata*) apresenta escore muito positivo para o CV1 e muito negativo para o CV2. Os outros morfótipos (M5, M7 e M8) ficam mais próximos ao M1, todos com escores negativos para o CV1. M5 e M7 apresentam escores negativos para o CV2, enquanto o M8 apresenta escore positivo.

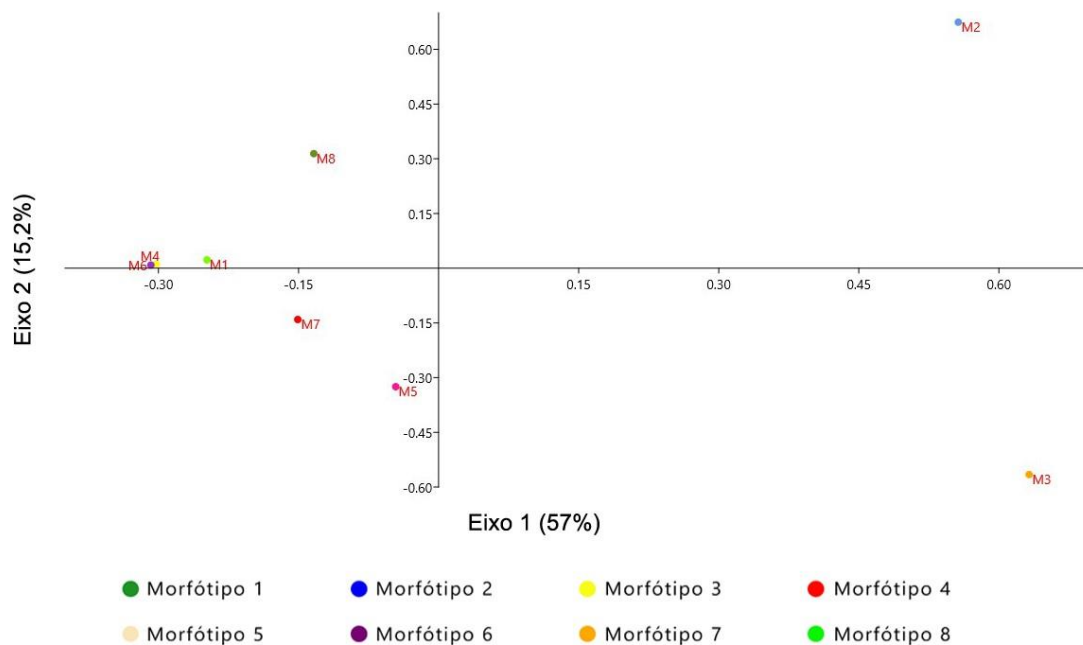


Figura 8: Análise de Principais Coordenadas (PCoA) mostrando a similaridade entre os oito morfótipos descritos neste trabalho.

Ainda usando PCoA, comparamos três ninhos com maior n amostral (ninho 22: n=35; ninho 26: n=84; ninho H4: n=35) a fim de visualizar se as distâncias entre morfótipos diferentes dentro de um ninho são maiores ou menores do que entre os mesmos morfótipos em ninhos diferentes. Todos esses ninhos foram identificados em campo como de fêmeas de *Caretta caretta*. O resultado (Figura 9) mostra que os espécimes de um mesmo ninho são mais semelhantes entre si do que a outros de ninhos diferentes.

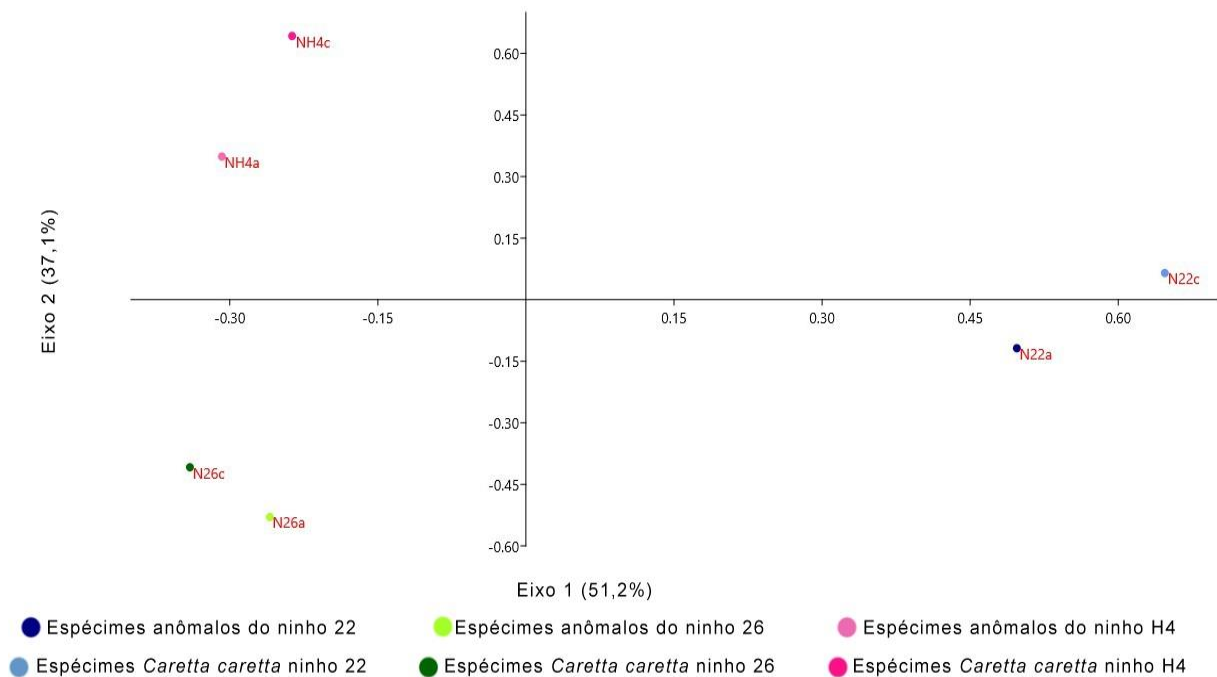


Figura 9: Análise de Principais Coordenadas (PCoA) mostrando a similaridade entre espécimes anômalos e de *Caretta caretta* coletados em três ninhos diferentes.

### 3.4 - TÉCNICAS MOLECULARES

As primeiras extrações feitas usando CTAB (Doyle & Doyle, 1987) resultaram em amostras de DNA altamente degradadas, porém muito concentradas. Mesmo com os ajustes feitos no protocolo o resultado obtido foi semelhante. Após todas as extrações, foi realizada eletroforese em gel de agarose para visualização do resultado. Muitas não ficavam visíveis, e resolvemos corar um dos géis com brometo para melhor visualização (Figura 10A). As extrações com Kits de extração da Wizard® também resultaram em amostras com DNA degradado (Figura 10B), mas também em altas concentrações.

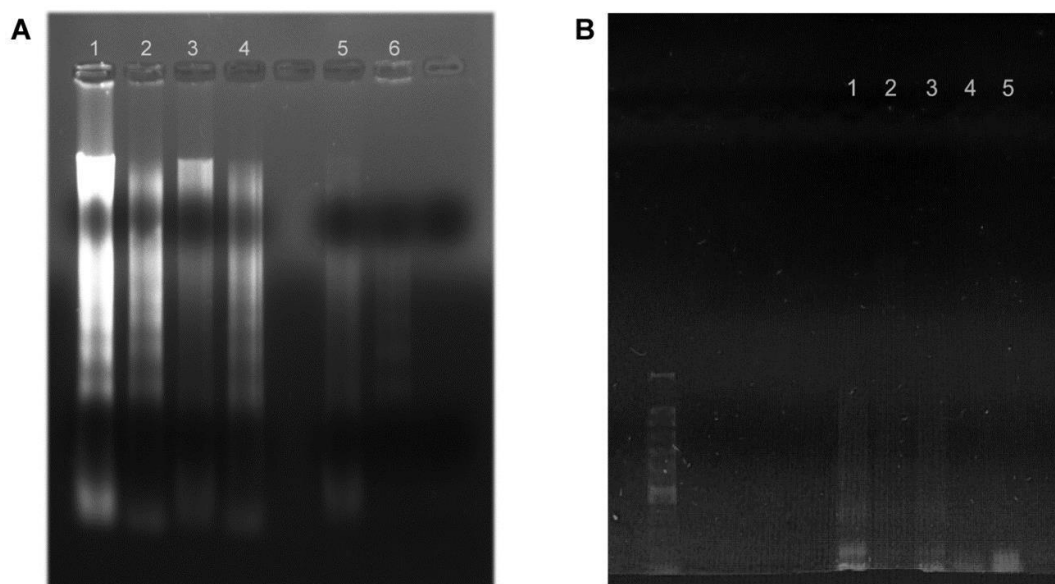


Figura 10: Fotos de resultados de extração de DNA: A) seguindo o protocolo de Doyle & Doyle (1987); B) usando o Kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System.

#### 4- DISCUSSÃO

As características morfológicas do casco, como forma, tamanho, coloração, número e disposição dos escudos, são importantes na identificação genérica e específica dos Testudines (Medem, 1976; Pritchard & Trebbau, 1984; Molina & Rocha, 1996). Neste trabalho foram descritos oito morfótipos encontrados na praia de Guriri, ES, em que cinco apresentam variações no número de escudos, o que impediu a identificação das espécies morfológicamente. Muitos autores também já descreveram variação no padrão de escutelação de tartarugas marinhas (Deraniyagala, 1939; Pritchard, 1979; Mast & Carr, 1989; Gadow, 1899; Özdemir & Türkozan, 2005; Türkozan *et al.*, 2010 e Cherepanov *et al.*, 2019).

Acredita-se que defeitos no padrão de escutelação da casco podem estar relacionados à distúrbios durante o processo de embriogênese, tais como baixa umidade no ninho (Lynn & Ullrich, 1950), exposição à temperaturas altas (Mallmann, 1994) ou baixas (Molina, 1995) durante a incubação. Segundo Mast & Carr (1989) o manuseio de ovos após a oviposição pode acarretar variabilidade dos escudos, além de morte de embriões. O transplante, a translocação e a incubação artificial de ovos de tartarugas

marinhas devem, portanto, ser feitos apenas quando necessário para não apresentar riscos à ninhada. Ainda não existe nenhum estudo na literatura sobre os aspectos geológicos da praia de Guriri, e talvez eles sejam determinantes no processo de formação dos escudos das tartarugas. Levanto também a hipótese de que as variações também podem estar associadas à presença de veículos na praia. Durante as coletas, foram visualizadas motos e carros andando nas areias das regiões menos povoadas, mesmo com a proibição por leis. Estudos também devem ser feitos para avaliar mais profundamente os impactos dessas infrações na formação embriológica de tartarugas marinhas.

Levando em conta o grande percentual de indivíduos na amostra com variações no número de escudos do casco, destacamos que a identificação pode ser prejudicada em campo. Além disso, medidas de conservação podem ser tomadas de maneira errônea, facilitando a vida e reprodução de híbridos. A possibilidade de usar a geometria dos escudos da cabeça para diferenciar as espécies seria uma forma de evitar erros quando houver variações no casco que impeçam a identificação específica, aumentando a credibilidade das informações coletadas em campo.

Os resultados encontrados nas PCAs e na CVA mostram apenas a diferenciação de *Lepidochelys olivacea* (M2) e *Eretmochelys imbricata* (M3) dos demais morfótipos e entre si. O resultado da PCoA nos dá uma melhor visualização de quão diferente um morfótipo é do outro, e o resultado aponta que a diferença entre os morfótipos anômalos e *Caretta caretta* é menor em relação às outras espécies. Esse resultado pode nos indicar que os morfótipos anômalos são apenas variações fenotípicas de *C. caretta* que é a espécie de maior ocorrência na localidade (Santos *et al.* 2011).

Além dessa interpretação, se levarmos em conta que o litoral brasileiro têm alta taxa de hibridização em comparação com o restante das população mundial (Vilaça & Santos, 2013), podemos inferir que existam híbridos em nossa amostra. Levantamos a hipótese de que o M5 e o M7 são possíveis híbridos de *C. caretta* X *E. imbricata*, já que as distâncias de dissimilaridade entre esses morfótipos e essas espécies são menores. Também é o caso de M8, que pode ser um morfótipo híbrido de *C. caretta* X *L. olivacea*. Sem os resultados moleculares não podemos afirmar a hibridização, mas estudos com

morfometria geométrica podem ser usados para mensurar dissimilaridades entre morfótipos anômalos e de espécies puras. Caso realmente haja hibridização, esse fenômeno pode ser explicado, no caso das populações de tartarugas marinhas brasileiras, pela redução considerável causada pela caça e a degradação do habitat, que leva a uma diminuição de parceiros nas áreas de desova e pode estar contribuindo para o cruzamento de espécies diferentes (Lara-Ruiz *et al.*, 2006; Vilaça *et al.*, 2012; Proietti *et al.*, 2014; Kelez *et al.*, 2016).

A existência de mais de um morfótipo em um mesmo ninho pode ser explicada por algumas hipóteses: 1) variação fenotípica em alguns indivíduos de uma espécie pura; 2) hibridização; 3) erro na coleta de dados; 4) poliandria. Para morfótipos encontrados na primeira coleta, não podemos afirmar que não houve erro na coleta de dados, pois essa foi feita por terceiros, que na época trabalhavam no TAMAR, e temos apenas os dados repassados por eles. Como exemplo, temos o Ninho 26, onde encontramos exemplares de M1, M4, M5, M6, M7, M8 e ainda morfótipos excluídos da análise, por motivos já justificados.

Porém, a hipótese de poliandria pode explicar a maioria dos ninhos que apresentaram morfótipos de duas espécies puras. Estudos já demonstraram que a múltipla paternidade é comum entre as tartarugas marinhas (Pearse & Avise 2001; Lee *et al.* 2004; Zbinden *et al.* 2007; Uller & Olsson, 2008). Dados ainda não publicados de Ferreira *et al.* revelam múltipla paternidade em ninhos de *Caretta caretta* na praia de Povoação, localizada próxima à Guriri. 46% - 86% dos ninhos tinham múltiplos pais com uma média de 1.57 - 2.0 pais por ninho. Levando em consideração essa alta taxa de poliandria nas desovas de uma praia da mesma região, podemos levantar a hipótese de que também há múltipla paternidade em nossas amostras. Especificamente no ninho 29, onde foi encontrado morfótipos de *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata* e um morfótipo intermediário, a fêmea pode ter cruzados com mais um macho de espécies diferentes gerando filhotes com morfótipos intermediários e puros das duas espécies.

Ressaltamos a importância da parceria entre o TAMAR e os pesquisadores. Os dados coletados pela fundação, juntamente com estudos morfológicos e moleculares, pode aumentar o conhecimento que temos sobre as populações brasileiras de tartarugas,

além de revelar formas eficientes de conservação e manejo. Para isso é necessário que o TAMAR disponibilize condições de trabalho e pesquisa, além de facilitar o acesso aos seus dados de coleta. Ainda temos amostras de tecidos, e futuramente, outros protocolos de extração serão testados a fim de acrescentar dados aos nossos resultados. Esse é um estudo pioneiro de caracterização morfológica da população que desova na praia de Guriri.

## 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

-Foram identificados 8 morfótipos na praia de Guriri, ES, dentre eles, 3 de espécies puras:

- M1 identificado como *Caretta caretta*, com 5 escudos laterais de cada lado na carapaça e 3 escudos inframarginais sem poros de cada lado no plastrão;

- M2 identificado como *Lepidochelys olivacea*, com 6 ou mais escudos laterais de cada lado na carapaça e 4 escudos inframarginais com poros de cada lado no plastrão;

- M3 identificado como *Eretmochelys imbricata*, com 4 escudos laterais de cada lado na carapaça e 4 escudos inframarginais sem poros de cada lado no plastrão.

- M4, com 5 escudos laterais de cada lado na carapaça e 4 escudos inframarginais sem poros de cada lado no plastrão;

- M5, com 5 escudos laterais de cada lado na carapaça e 5 escudos inframarginais sem poros de cada lado no plastrão;

- M6, 5 escudos laterais de cada lado da carapaça, 3 escudos inframarginais sem poros no lado direito e 4 escudos inframarginais sem poros no lado esquerdo ou 5 escudos laterais de cada lado na carapaça, 4 escudos inframarginais sem poros no lado direito e 3 escudos inframarginais sem poros no lado esquerdo no plastrão.

- M7, 5 escudos laterais de cada lado da carapaça, 3 escudos inframarginais sem poros no lado direito e 5 escudos inframarginais sem poros no lado esquerdo ou 5 escudos laterais de cada lado na carapaça, 5 escudos inframarginais sem poros no lado

direito e 3 escudos inframarginais sem poros no lado esquerdo no plastrão.

- M8, 5 escudos laterais de cada lado da carapaça, 4 escudos inframarginais sem poros no lado direito e 5 escudos inframarginais sem poros no lado esquerdo ou 5 escudos laterais de cada lado na carapaça, 5 escudos inframarginais sem poros no lado direito e 4 escudos inframarginais sem poros no lado esquerdo no plastrão.

- A morfometria geométrica como ferramenta para identificação de espécies é válida, e contribui para estudos morfológicos com resultados mais robustos. Esse método é uma alternativa válida para evitar erros quando houver variações no casco que impeçam a identificação específica, aumentando a credibilidade das informações coletadas em campo.

- A presença de um morfótipo de *Eretmochelys imbricata* não é indício que esta espécie esteja desovando na praia de Guriri, algo incomum para a região. Pode estar havendo poliandria na população, o que explicaria a presença desse morfótipo em um ninho identificado como de *Caretta caretta*. Porém essa hipótese leva em conta de que também haja hibridização na população.

- Embora assimetrias e polimorfismos quanto ao número de escudos sejam relativamente comuns em tartarugas, a elevada observação de características diagnósticas das duas espécies num mesmo indivíduo pode ser indício de hibridização entre populações das duas espécies que desovam na Praia de Guriri. Assim, a diminuição da oferta de parceiros nas áreas de reprodução, pode estar favorecendo o cruzamento entre espécies que nidificam na região.

## 6- REFERÊNCIAS

ADAMS, D.C. *et al.* 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology*, v71, p.5-16.

ADRIENS, D. 2007. *Protocol for error testing in landmark based geometric morphometrics*.

ALLENDORF, F. W. *et al.* 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*, v16, p613-622.

AVISE, J. C. 1992. Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos*, v63, p62–76.

BAPTISTOTTE, C.; THOMÉ, J. C. A. & BJORNDAL, K. 2003. Reproductive biology and conservation status of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in Espírito Santo State, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology*, v.4, n.3, p.523- 529.

BARTON, N. H. 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*, v10, p551-568.

BONDIOLI, A. C. V. 2009. *Estrutura populacional e variabilidade genética de tartaruga verde (Chelonia mydas) da região de Cananéia, São Paulo*. Tese (Doutorado em Biologia/Genética) — Departamento de genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

BONIN, F.; DEVAUX, B. & DUPRÉ, A. 2006. *Turtles of the World*. Londres: A & C Black Publishers. ISBN: 9780713682359.

BOOKSTEIN 1997. Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Medical Image Analysis*, v1, p177-261.

BOOKSTEIN, F. L. 1991. *Morphometric tools for landmark data. Geometry and biology*. Cambridge Univ. Press: New York. 435 pp.

BRINKMAN, D. B.; HOLROYD, P. A. & GARDNER, J. D. 2013. *Morphology and Evolution of Turtles*. Dordrecht: Springer; 2013. ISBN: 9789400743083

CAMPBELL, L. M. 2003. Contemporary culture, use, and conservation of seaturtles, in: Lutz, P.L. et al. *The biology of sea turtles*, volume 2. CRC Marine Biology Series, pp. 307-338

CASALE, P. et al. 2017. Geometric morphometrics, scute patterns and biometrics of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in the central Mediterranean. *Amphibia- reptilia*. v. 38, n. 2, p.145-156.

CASTILHOS, J. C. & TIWARI, M. 2006. Preliminary data and observations from an increasing olive ridley population in Sergipe, Brazil. *Marine Turtles Newsletter*, n. 113, p. 6-7.

CEBALLOS, C. P. & VALENZUELA, N. 2011. The Role of Sex-specific Plasticity in Shaping Sexual Dimorphism in a Long-lived Vertebrate, the Snapping Turtle *Chelydra serpentina*. *Evolutionary Biology*. v38, p163–181

CERVELLI, M. et al. 2003. Structural and sequence evolution of U17 small nucleolar RNA (snoRNA) and its phylogenetic congruence in chelonians. *Journal of Molecular Evolution*, v. 57, p. 73-84.

CHEREPANOV, G. et al. 2019. Supernumerary scutes verify a segment-dependent model of the horny shell development in turtles. *Journal of Anatomy*.

CLAUDE, J. et al. 2004. Ecological Correlates and Evolutionary Divergence in the Skull of Turtles: A Geometric Morphometric Assessment. *Systematic Biology*. V53, p.937-952.

COELHO, V. F. et al. 2018. Intra-specific variation in skull morphology of juvenile *Chelonia mydas* in the southwestern Atlantic Ocean. *Marine Biology*. p. 165-174.

DERANIYAGALA, P. E. P. 1939. *Tetrapod Reptiles of Ceylon: Testudinales and Crocodylians*. London: Dubau & Co. Vol1.

DICKSON, B. V. & PIERCE, S. E. 2019. Functional performance of turtle humerus shape across an ecological adaptive landscape. *Evolution*. v73, p. 1265-1277.

DODD, C. K. 1988. Synopsis of the biological data on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* (Linnaeus 1758). *U.S. Biological Report*, n. 88, p.14.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, p.11-15.

DRYDEN, I. E. & MARDIA, K. V. 1998. *Statistical shape analysis*. John Wiley & Sons Ltd., Chischester, UK.

GADOW, H. 1899. *Orthogenetic variations in the shell of Chelonia*. In: Zoological Results based on Material from New Britain, New Guinea, Loyalty Islands and Elsewhere, Collected during the Years 1895, 1896, and 1897 (ed. Willey A), part 3, pp. 207–222. Cambridge: University Press.

GAFFNEY, E. S.; MEYLAN, P. 1988. A phylogeny of turtles. In: Benton, M.J. (Ed.). *The phylogeny and classifications of tetrapods*. Oxford: Clarendon, v. 1, p. 157- 219.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T. & RYAN, P. D., 2018. *PAST: Palaentological Statistics, software package for education and data analises*. Versão 3.20. *Palaentologia Electronica* 4(1):9 pp.

KELEZ, S. *et al.* 2016. First record of hybridization between green *Chelonia mydas* and hawksbill *Eretmochelys imbricata* sea turtles in the Southeast Pacific. *PeerJ*, v4, e1712.

KIRCHER, L. & WYNEKEN, J. 2017. Sex Estimation by Geometric Morphometric Analysis of Loggerhead (*Caretta caretta*) Sea Turtle Hatchlings. *Marine TurtleNewsletter*. v154, p. 12-15.

KRENZ, J. G. *et al.* 2005. Molecular phylogenetics and evolution of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 37, p. 178-191.

LARA-RUIZ P. *et al.* 2006. Extensive hybridization in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. *Conservation Genetics* v7, p773-781.

LEE P. L. M. *et al.* 2004. Polyandry in a marine turtle: females make the best of a bad job. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v101

LI, C. *et al.* 2008. An ancestral turtle from the Late Triassic of southwestern China. *Nature*, v. 456, n. 7221, p.497-501.

LYNN, G. & ULLRICH, S. M. C. 1950. Experimental production of shell abnormalities. In turtles. *Copeia*, v4, p253-262.

LYSON, T. *et al.* 2013. Evolutionary Origin of the Turtle Shell. *Cell Biology*. v23, n12 p1113–1119.

MALLET, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, v20, p229-237.

MALLMANN, M. T. O. 1994. Influência da temperatura de incubação na determinação sexual em *Geochelone carbonaria* (Spix, 1824) (Reptilia, Testudines, Testudinidae). Dissertação (Mestrado em Zoologia). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. 1995. *Métodos quantitativos em morfologia*. São Paulo, Eduerj. ISBN: 9789765016631

MARCOVALDI, M. A. & CHALOUPKA, M. 2007. Conservation status of the loggerhead sea turtle in Brazil: an encouraging outlook. *Endangered Species Research*, v3, p. 133-143.

MARCOVALDI, M. A. & LAURENT, A. 1996. A six season study of marine turtle nesting at Praia do Forte, Bahia, Brazil, with implications for conservation and management. *Chelonian Conservation and Biology*, v2, p. 55-59.

MARCOVALDI, M. A. & MARCOVALDI, G. G. 1999. Marine turtles of Brazil: the history and structure of Projeto TAMAR-IBAMA. *Biological Conservation*. n. 91, p. 35-41.

MARCOVALDI, M. A. 2001. *Status and distribution of the olive ridley turtle, Lepidochelys olivacea, in the western atlantic ocean*. In: KAREN L.; ECKERT and F.; GROBOIS, A. A. (eds). IUCN/SSC/MTSG, WWF, e UNEP Caribbean Environment Programme.

MARCOVALDI, M. A. *et al.* 2011. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) no Brasil. *Revista Biodiversidade Brasileira*. Ano I, n. 1, p 20-27.

MARCUS *et al.* 1996. *Advances in Morphometrics*. NATO ASI series A: Life Sciences, Vol. 284, Plenum Press, New York.

MÁRQUEZ, M. R. 1990. Sea turtles of the world: an annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. FAO species catalogue. FAO Fisheries Synopsis, Rome, n. 125, v. 11, 81 p.

MAST, R. B. & CARR, J. L. 1989. Carapacial scute variation in Kemp's Ridley sea turtle (*Lepidochelys kempfi*) hatchlings and juveniles. In: International Symposium on Kemp's Ridley Sea Turtle Biology, Conservation and Management. National Marine Fisheries Service Southeast, p. 2002-2219.

MEDEM, F. 1976. Recomendaciones respecto a contar el escamado y tomar las dimensiones de nidos, huevos y ejemplares de los Crocodylia e Testudines. *Lozania*, v20, p1-17.

MEYLAN, A. B. & DONNELLY, M. 1999. Status justification for listing the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) as critically endangered on the 1996 IUCN Red List of Threatened Animals. *Chelonian Conservation and Biology*. v. 3, n. 2, p. 200-224.

MILLER, J. D. *et al.* 2017. A field key to the developmental stages of marine turtles (Cheloniidae) with notes on the development of *Dermochelys*. *Chelonian Research Foundation*, v16, n2, p111-122.

MOLINA, F. B. & ROCHA, M. B. 1996. *Identificação, caracterização e distribuição dos quelônios da Amazônia brasileira*. Apostila da aula ministrada no mini-curso “Metodologia de Pesquisa e Classificação de Quelônios”, realizado durante o “XI Encontro sobre Quelônios da Amazônia”, organizado em agosto de 1996, em Belém (PA), pelo CENA QUAUA/IBAMA.

MOLINA, F. B. 1995. *Observações sobre a biologia e o comportamento reprodutivo de Trachemys dorbignyi (Duméril & Bibron, 1835) em cativeiro (Reptilia, Testudines, Emydidae)*. Tese (Doutorado em Zoologia). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

MONTEIRO, L. R. & REIS, S. F. 1999. *Princípios de morfometria geométrica*. 1ed. SP: Holos.

ÖZDEMİR, B. & TÜRKOZAN, O. 2006. Carapacial scute variation in green turtle, *Chelonia mydas* hatchlings in Northern Cyprus. *Turkish J Zool*, v30, p141–146.

PASSAMANI, M. & MENDES, S. L. 2007. *Espécies da fauna ameaçadas de extinção no Estado do Espírito Santo*. Vitória : Instituto de Pesquisas da Mata Altântica.

PEARSE, D. E. & AVISE, J. C. 2001. Turtle Mating Systems: Behavior, Sperm Storage, and Genetic Paternity. *Journal of Heredity*, v92(2), p206-11

PLOTKIN, P. T. 2007. *Biology and Conservation of Ridley Sea Turtles*. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press, p.59-87.

PRITCHARD, P. C. H. & MORTIMER, J. A. 1999. *Taxonomy, external morphology and species identification*. In: ECKERT, K. L.; BORNDAL, K. A.; ABREU- GROBOIS, F. A.; DONNELLY, M. (eds). *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication, n. 4, 235, p21-38.

PRITCHARD, P. C. H. & TREBBAU, P. 1984. *The turtles of Venezuela*. 2ª ed. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 403 p. ISBN: 9780916984113.

PRITCHARD, P. C. H. 1979. *Encyclopedia of Turtles*. T.F.H. Publ. Inc., Neptune, New Jersey. 859 pp.

PRITCHARD, P.C.H. 1979. *Encyclopedia of Turtles*. T.F.H. Publ. Inc., Neptune, New Jersey. 859 pp.

PROIETTI, M. C. *et al.* 2014. Hawksbill X loggerhead sea turtle hybrids at Bahia, Brazil: where do their offspring go? *PeerJ*, v2, e255.

RHYMER, J. M. & SIMBERLOFF, D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v27, p83–109.

ROHLF, F. J. & MARCUS, L. F. 1993. A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, v8(4), p129-132.

ROHLF, F. J. & SLICE, D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology*, v39(1), p40-59.

ROHLF, F. J. 2004. *tpsSplin*. Version 1.20. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.

ROHLF, F. J. 2017. *tpsDig, digitize landmarks and outlines*. Version 1.76. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.

ROHLF, F. J. 2017. *tpsRwl, relative warps analyses*. Version 1.69. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.

ROHLF, F. J. 2017. *tpsSmall, testing amount of shape variation*. Version 1.34. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.

ROHLF, F. J. 2018. *tpsUtil, file utility program*, Version 2.31. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.

SANTOS, A. S. *et al.* 2011. *Plano de ação nacional para a conservação das Tartarugas Marinhas*. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, (Série Espécies Ameaçadas, 25). ISBN: 9788561842369.

SCHOCH, R. R.; SUES, H. 2015. A Middle Triassic stem-turtle and the evolution of the turtle body plan. *Nature*, v. 523, n. 7562, p.584-587.

SEMINOFF, J. A. *et al.* 2003. Hybridization of the green turtle (*Chelonia mydas*) and hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in the Pacific Ocean: indication of absence of gender bias in the directionality of crosses. *Bulletin of Marine Science*, v73, p643-652.

SHAFFER, H. B.; MEYLAN, P. & MCKNIGHT, M. L. 1997. Tests of turtle phylogeny: molecular, morphological and paleontological approaches. *Systematic Biology*, v. 2. N 46, p. 235-268.

SILVA, A. C. C. D. *et al.* 2007. Nesting biology and conservation of the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) in Brazil, 1991/1992 to 2002/2003. *J. Mar. Biol. Ass.*, v87, p. 1047-1056.

STAYTON, C. T. 2011. Biomechanics on the half shell: functional performance influences patterns of morphological variation in the emydid turtle carapace. *Zoology*. v114, p. 213-223.

SÖNMEZ, B., C. *et al.* 2016. Sex determination of green sea turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings on the basis of morphological characters. *Journal of Black Sea. Mediterranean Environment*. v22, p. 93-102.

THOMÉ, J. C. *et al.* 2007. Nesting biology and conservation of the leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*) in the State of Espírito Santo, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology*. Massachusetts, v. 6, n. 1, p. 15-27.

TÜRKOZAN, O. *et al.* 2001. Carapacial scute variation in Loggerhead Turtles, *Caretta caretta*. *Zoology in the Middle East*, v24, n1, p137-142

ULLER, T. & OLSSON, M. 2008. Multiple paternity in reptiles: patterns and processes. *Molecular Ecology*, v17, p2566–2580.

VALENZUELA, N. *et al.* 2004. Geometric morphometric sex estimation for hatchling turtles: A powerful alternative for detecting subtle sexual shapedimorphism. *Copeia*. v4, p. 735–742.

VILAÇA, S. T. & SANTOS, F. R. 2013. Molecular data for the sea turtle population

in Brazil. *Dataset Papers in Science*. Article 196492, p1-7

VILAÇA, S. T. *et al.* 2012. Nuclear markers reveal a complex introgression pattern among marine turtle species on the Brazilian coast. *Molecular Ecology*, v21, p4300-4312.

WYNEKEN, J. 2001. *The anatomy of sea turtle*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC470, US Department of Commerce, 172p.

ZANGERL, R. & JOHNSON, R. G. 1957. The nature of shield abnormalities in the turtle shell. *Fieldiana Geol.*, v10, n29, p341-362.

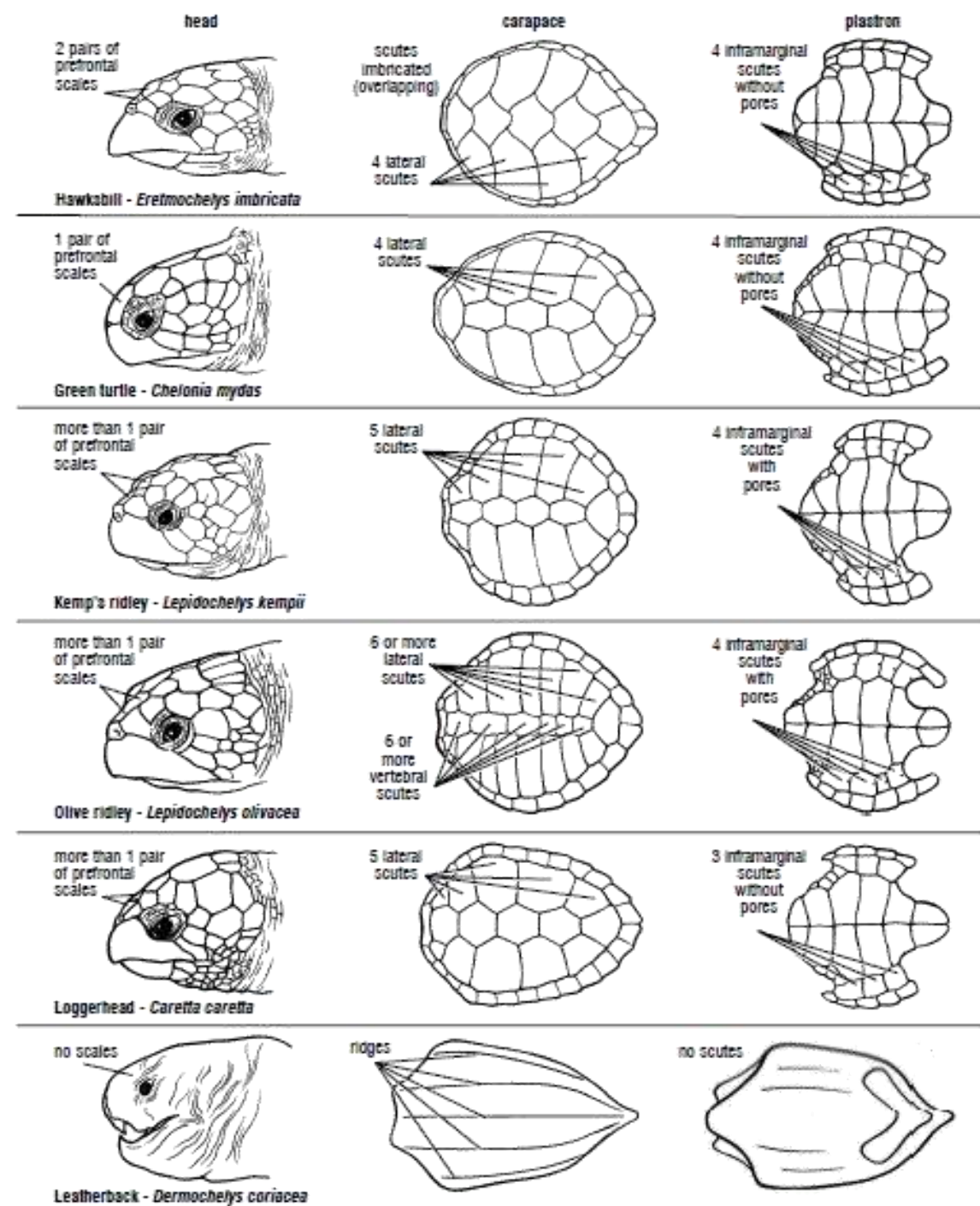
ZBINDEN, J. A. *et al.* 2007. High frequency of multiple paternity in the largest rookery of Mediterranean loggerhead sea turtles. *Molecular Ecology*, v16, p3703– 3711.

ZELDITCH, M. L., D. L. SWIDERSKI, H. D. SHEETS. 2012. *Geometric Morphometrics for Biologists: a primer*. 2nd Edition, Elsevier Academic Press, San Diego, 443p. ISBN: 9780123869036.

## ANEXO I

## CHAVE PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE TARTARUGAS MARINHAS

Fonte: WYNEKEN, J. 2001. *The anatomy of sea turtle*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC470, US Department of Commerce, 172p.



## ANEXO II

### CHAVE PARA IDENTIFICAÇÃO DA FASE DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Fonte: Tradução feita de MILLER, J. D. et al. 2017. A field key to the developmental stages of marineturtles (Cheloniidae) with notes on the development of *Dermochelys*. *Chelonian Research Foundation*, v16, n2, p111-122.

(% DT [tempo de desenvolvimento] = % de tempo de incubação desde a oviposição até a saída dos ovos incubados a 29 ° C)

1a. Embrião reconhecível como uma tartaruga, com pigmento na carapaça.....	23
1b. Embrião diferente do acima.....	2
2a. Embrião com membros torcidos de forma plana contra os lados do corpo e compigmentação de íris.....	21
2b. Embrião diferente do acima.....	3
3a. Embrião com cabeça e olhos definidos e com brotos laterais protuberantes.....	17
3b. Embrião diferente do acima.....	4
4a. Embrião principalmente em forma de disco, sem protuberâncias oculares.....	5
4b. Embrião alongado com protuberâncias oculares definidas.....	13
5a. Blastóporo moldado como uma fenda transversal ou como um crescente largo, anteriormente aberto.....	<b>Fase 6 [0,5 ± 0,5% DT]</b>
5b. Embrião diferente do acima.....	6
6a. Blastóporo posterior em forma de abertura crescente.....	<b>Fase 7 [1,2 ± 0,5% DT]</b>
6b Embrião diferente do acima.....	7
7a. Blastóporo em forma de "U" invertido; dobra da cabeça indicada.....	<b>Fase 8 [2,8 ± 0,5% DT]</b>
7b. Embrião diferente do acima.....	8
8a. Blastóporo em forma de "U" invertido; dobra da cabeça localizada posteriormente em forma de abertura crescente; nenhum somito presente.....	<b>Fase 9 [3,8 ± 0,5% DT]</b>

<b>8b.</b> Embrião diferente do acima.....	<b>9</b>
<b>9a.</b> 2 ou 3 pares de somitos presentes; as cristas neurais tocam a extremidade posterior da cabeça.....	<b>Fase 10 [4,8 ± 0,5% DT]</b>
<b>9b.</b> Mais de 4 pares de somitos presentes.....	<b>10</b>
<b>10a.</b> 5 ou 6 pares de somitos presentes; cristas neurais tocando ou se fundindo ao longoda linha média da cabeça.....	<b>Fase 11 [5,7 ± 0,5% DT]</b>
<b>10b.</b> Mais de 6 pares de somitos presentes.....	<b>11</b>
<b>11a.</b> 8-10 pares de somitos presentes; âmnio cobre cerca de metade do comprimento total.....	<b>Fase 12 [6,7 ± 0,5% DT]</b>
<b>11b.</b> Mais de 11 pares de somitos presentes.....	<b>12</b>
<b>12a.</b> 12-14 pares de somitos presentes; canal neurocêntrico delimitado posteriormente por uma crista baixa; âmnio cobre cerca de três quartos do comprimento total.....	<b>Fase 13 [7,6 ± 0,5% DT]</b>
<b>12b.</b> Mais de 14 pares de somitos presentes.....	<b>13</b>
<b>13a.</b> 15-17 pares de somitos presentes; boca aberta; âmnio cobre o canal neurocêntrico.....	<b>Fase 14 [8,6 ± 0,5% DT]</b>
<b>13b.</b> Mais de 17 pares de somitos presentes.....	<b>14</b>
<b>14a.</b> 19-21 pares de somitos presentes; boca aberta como um profundo " V "; primeira fenda faríngea aberta; tubo amniótico posterior formado.....	<b>Fase 15 [11,5 ± 1% DT]</b>
<b>14b.</b> Mais de 21 pares de somitos presentes.....	<b>15</b>
<b>15a.</b> 23-25 pares de somitos presentes; lente diferenciada no olho, fendas faríngeas 1 e 2 abertas; pequenos brotos de membros visíveis na parede lateral do corpo.....	<b>Fase 16 [13,4 ± 1% DT]</b>
<b>15b.</b> Mais de 26 pares de somitos presentes.....	<b>16</b>
<b>16a.</b> 29-34 pares de somitos presentes; os brotos dos membros se abaixam lateralmente;todas as fendas da faringe são abertas.....	<b>Fase 17 [16,3 ± 1% DT]</b>
<b>16b.</b> Mais de 35 pares de somitos presentes.....	<b>17</b>
<b>17a.</b> 35-40 pares de somites presentes; placas digitais não livres da parede do corpo; abas desenvolvidas nas bordas anteriores de todas as fendas da faringe.....	<b>Fase 18 [19,2 ± 1% DT]</b>

- 17b.** Mais de 40 pares de somitos presentes.....**18**
- 18a.** 40-45 pares de somitos presentes; placas digitais livres da parede do corpo e projetadas lateralmente.....**Fase 19 [22,0 ± 1% DT]**
- 18b.** Mais de 45 pares de somitos presentes.....**19**
- 19a.** Placas digitais parcialmente ou completamente torcidas em plano contra a parede do corpo; íris não pigmentada; fissuras faríngeas quase fechadas.....**Fase 20 [25,0 ± 1% DT]**
- 19b.** Não é como acima.....**20**
- 20a.** Iris pigmentada ao longo de sua borda posterior; o rudimento de carapaça é uma crista na parede lateral do corpo e se estende acima das bases dos membros; placas digitais sem serrações; placa digital não separada do membro por uma crista.....**Fase 21 [29,5 ± 1% DT]**
- 20b.** Não é como acima.....**21**
- 21a.** Uma crista distal define o limite do membro da placa digital; cume marginal da carapaça marcada por serrações pequenas e baixas; Fissuras faríngeas fechadas. ....**Fase 22 [34,5 ± 1% DT]**
- 21b.** Não é como acima.....**22**
- 22a.** A borda posterior da carapaça completa pelo menos por uma crista baixa; fronteira anterior incompleta; serrações digitais presentes indicadas como cumes e sulcos rasos.....**Fase 23 [39,4 ± 1% DT]**
- 22b.** Embrião diferente do acima.....**23**
- 23a.** Borda anterior da carapaça indicada pelo menos por uma crista baixa do pescoço; a borda posterior da área inframarginal é definida, anterior não é; escudos da carapaça indicados; podem ocorrer manchas de pigmentação na carapaça; serrações digitais presentes como cumes e sulcos.....**Fase 24 [45,0 ± 1% DT]**
- 23b.** Embrião diferente do acima.....**24**
- 24a.** Periferia da carapaça completa (anterior e posteriormente); todos os escudos se diferenciaram; escama corporal e das nadadeiras indiferenciadas; as escamas de marcação podem ser indicadas; serrações digitais alongadas; presença de rudimento de garra.....**Fase 25 [53,0 ± 2% DT]**
- 24b.** Embrião diferente do acima.....**25**
- 25a.** Escudos de carapaça tornando-se pigmentados; escamas da cabeça, exceto sobre orelha, e papilas cutâneas presentes; todas escamas da nadadeiras estão presentes; escamas do topo podem ser pigmentados; escamas de marcação

presentes.....	<b>Fase 26 [62,0 ± 2% DT]</b>
<b>25b.</b> Embrião diferente do acima.....	<b>26</b>
<b>26a.</b> Escamas não pigmentadas sobre a região da orelha, exceto pigmentadas em caravanas; todas as escamas das nadadeiras presentes e pigmentadas; dobra plastronal transversal indicada como uma curva perpendicular ao eixo do corpo; volume de gema maior que o espécime.....	<b>Fase 27 [70,6 ± 2% DT]</b>
<b>26b.</b> Embrião diferente do acima .....	<b>27</b>
<b>27a.</b> Escamas sobre o ouvido pigmentadas; a dobra plastronal transversal forma um ângulo oblíquo entre os escudos abdominal e torácico; volume da amostra aproximadamente igual ao volume da gema.....	<b>Fase 28 [78,3 ± 2% DT]</b>
<b>27b.</b> Embrião diferente do acima.....	<b>28</b>
<b>28a.</b> A dobra plastronal transversal forma um ângulo agudo; escudos inframarginais formam sulco; pigmentação e morfologia características de “recém-nascidos” presentes; volume do espécime maior do que as relações de volume da gema 1,5 a 4:1 .....	<b>Fase 29 [86,0 ± 2% DT]</b>
<b>28b.</b> Embrião diferente do acima.....	<b>29</b>
<b>29a.</b> Massa de gema remanescente coberta com membrana pigmentada; escamas inframarginais dobradas perto do plastrão; a massa de gema é inferior a metade do volume de espécimes dentro da casca.....	<b>Fase 30 [94,7 ± 2% DT]</b>
<b>29b.</b> Saída pelo menos das nadadeiras dianteiras da casca do ovo.....	<b>30</b>
<b>30a.</b> Embrião saindo da casca do ovo; massa de gema afastada no abdômen; a dobra plastronal transversal forma um ângulo agudo; membranas úmidas ainda em anexo; espécime que não está pronto para emergir do ninho.....	<b>Fase 31a [100 ± 2% DT]</b>
<b>30b.</b> Embrião fora da casca do ovo; massa de gema ausente; a dobra plastronal transversa forma um ângulo oblíquo ou quase ausente; as membranas em anexo aparecem desgastadas; espécime pronto para emergir.....	<b>Fase 31b [102 ± 2% DT]</b>

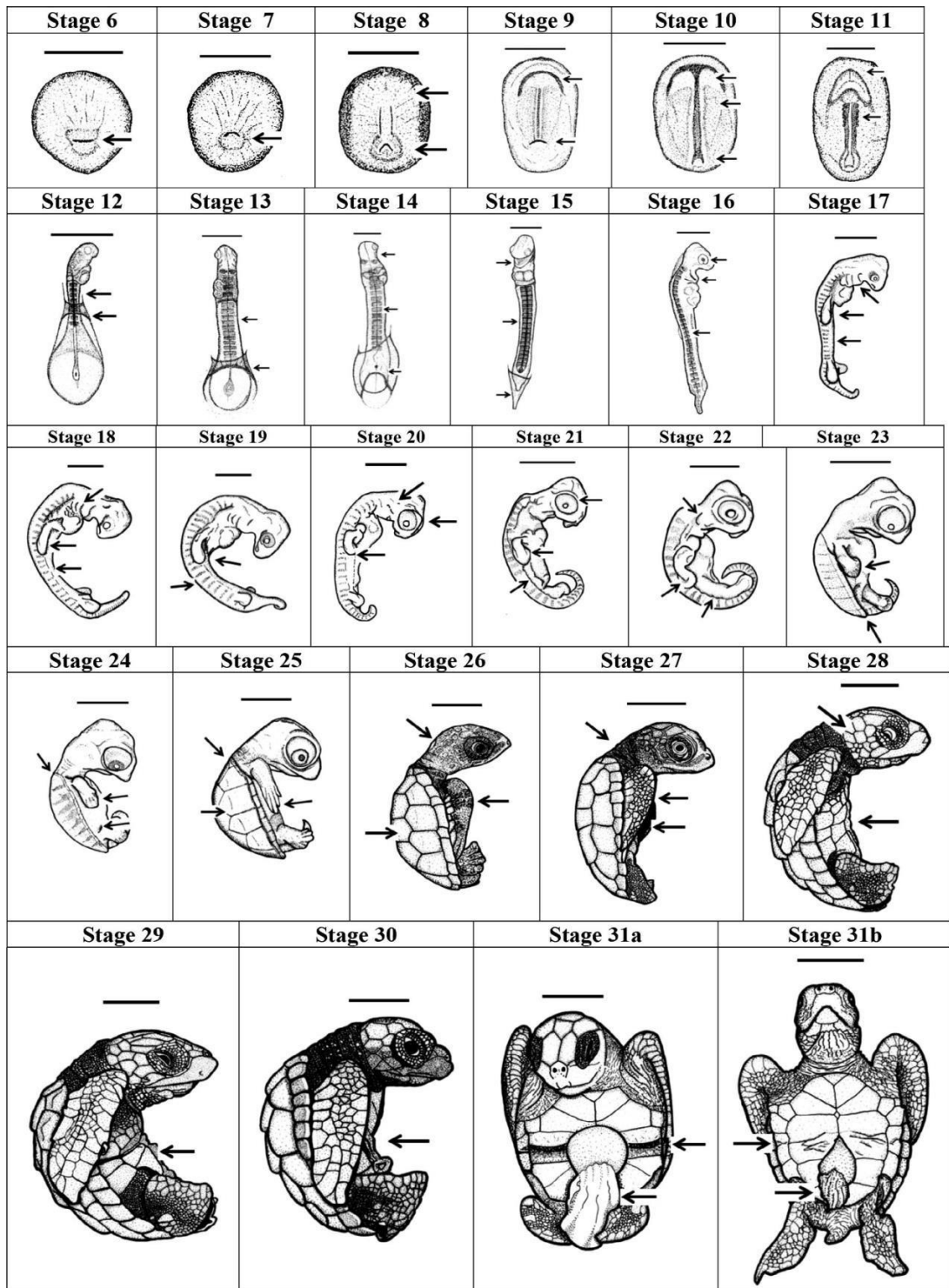


Figure 1. Illustrations of the embryonic stages of marine turtles based on developmental stage definitions by Miller (1985b). DT (development time) = time from oviposition to pipping. Arrows indicate key characteristics. Bar = 1 mm: stages 6–20; 5 mm: stages 21–24; 10 mm: stages 25–31

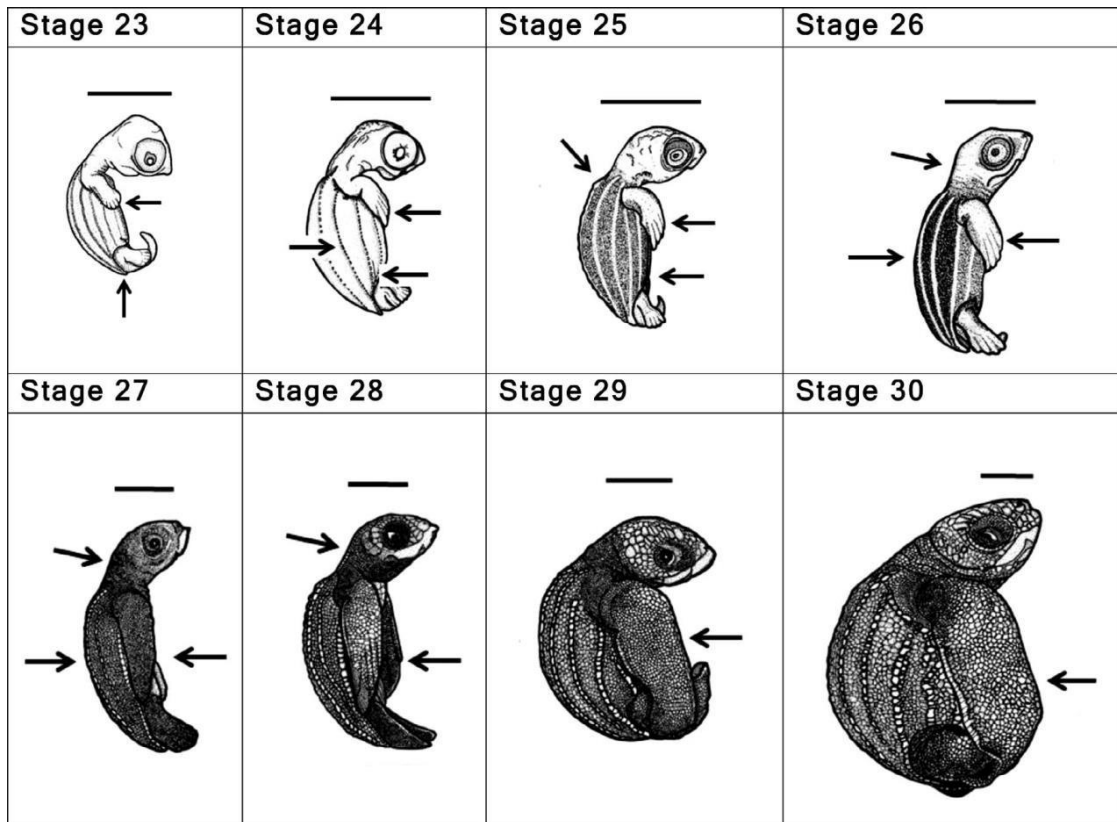


Figure 2. Developmental stages 23–30 of *D. coriacea* embryos based on Miller (1985b). Arrows indicate key characteristics. Bar = 10 mm: stages 23–30.

**ANEXO III****RELAÇÃO DOS MORFÓTIPOS ENCONTRADOS EM CADA NINHO**

MORFÓTIPO	NINHOS
M1	H4, N5, N6, N9, N11, N14, N15, N17, N18, N22, N26, N27, N31, N32
M2	H2, H4, N25, N27, N30
M3	H2, H4, N29
M4	H4, N1, N5, N7, N11, N16, N20, N22, N26, N28, N32
M5	N26
M6	H4, N4, N5, N7, N11, N16, N19, N20, N21, N22, N24, N26, N28, N29, N31, N32, N33
M7	N26
M8	H4, N20, N26, N28