Estoques mistos da tartaruga verde (*Chelonia mydas*) no sul do Brasil, revelados por DNA mitocondrial e trajetórias de derivadores superficiais.

Maíra Carneiro Proietti[1], Júlia Wiener Reisser, Paul Gerhard Kinas, Rodrigo Kerr, Danielle Monteiro, Luis Fernando Marins e Eduardo Resende Secchi

[1] Laboratório de Tartarugas e Mamíferos Marinhos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, mairaproietti@furg.br

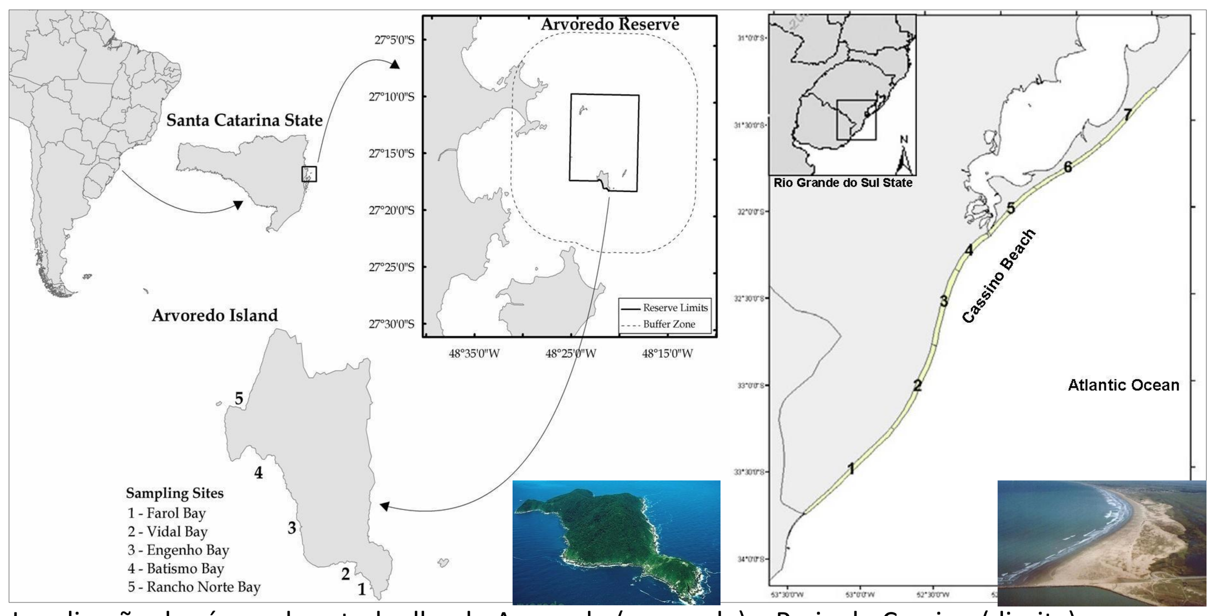
Introdução

A tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) possui distribuição circumglobal e um complexo e longo ciclo vital envolvendo grandes escalas temporais e geográficas, tornando o estudo direto destes animais muitas vezes difícil. Abordagens indiretas através de análises moleculares podem auxiliar a elucidação de diversos aspectos de sua biologia e comportamento. O presente trabalho estudou haplótipos da região controle do DNA mitocondrial de tartarugas-verdes de duas áreas de alimentação sul-brasileiras, a Ilha do Arvoredo (SC) e a Praia do Cassino (RS), para:

1) diferenciar geneticamente as áreas
2) elucidar origens natais das tartarugas das áreas de estudo através de Análise Bayesiana de Estoque Misto (MSA)
3) desenvolver novas *prioris* informativas para a MSA
4) indicar possíveis padrões de dispersão de recém-nascidos para as áreas estudadas

Materiais e métodos

Áreas de estudo



Localização das áreas de estudo: lha do Arvoredo (esquerda) e Praia do Cassino (direita)

Ilha do Arvoredo, SC

Maior ilha da REBIO do Arvoredo

Costões rochosos com alta diversidade bentônica

Alta ocorrência *C. mydas*

Fidelidade comprovada

Praia do Cassino, RS

Praia arenosa extensa

Pouco substrato consolidado

Alta ocorrência encalhes *C. mydas*

Fidelidade não comprovada

Amostragem

Ilha do Arvoredo

Captura em mergulho, 115 animais, 33,5 - 83,0cm (média 40,1 cm)

Praia do Cassino

Animais encalhados, 101 animais, 29,0 - 71,5cm (média 49,2 cm)

Laboratório

Extração DNA - fenol:clorofórmio → **PCR - *primers* LTCM1 e HDCM1 (*D-loop*)** → **Purificação e seqüenciamento**

Análise de dados

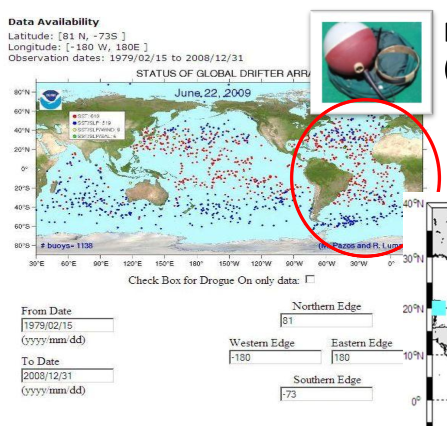
Classificação dos haplótipos

Testes de diferenciação e AMOVA (entre as áreas de estudo e outras áreas de alimentação do Oc. Atlântico)

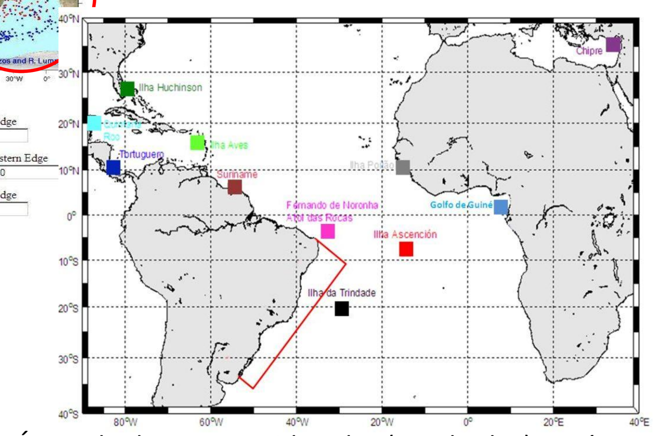
Análise de derivadores superficiais

Pressuposto: bóias = filhotes

Cálculo do número de bóias que passam por áreas de desova incluídas na MSA e chegam a uma área-alvo na costa leste brasileira e cálculo bayesiano da probabilidade *a posteriori* de cada área fornecer bóias à costa)



Página da NOAA com dados de bóias disponíveis (www.aoml.noaa.gov)



Áreas de desova consideradas (quadrados) e a área-alvo

Análise Bayesiana de Estoque Misto: estimativa de origens natais, considerando *prioris* não-informativas e *prioris* informativas de acordo com: dados de bóias de deriva; número de fêmeas/ano; combinação das duas últimas *prioris*

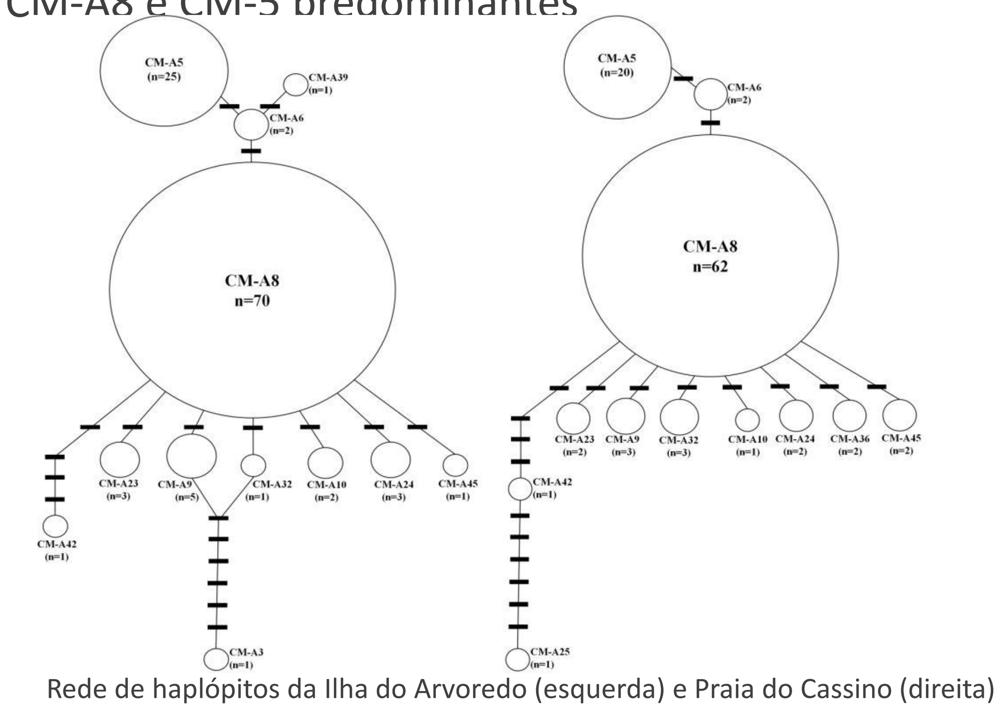
Resultados

Haplótipos

12 haplótipos por área, 10 compartilhados

Máximo 12 variações

CM-A8 e CM-5 predominantes

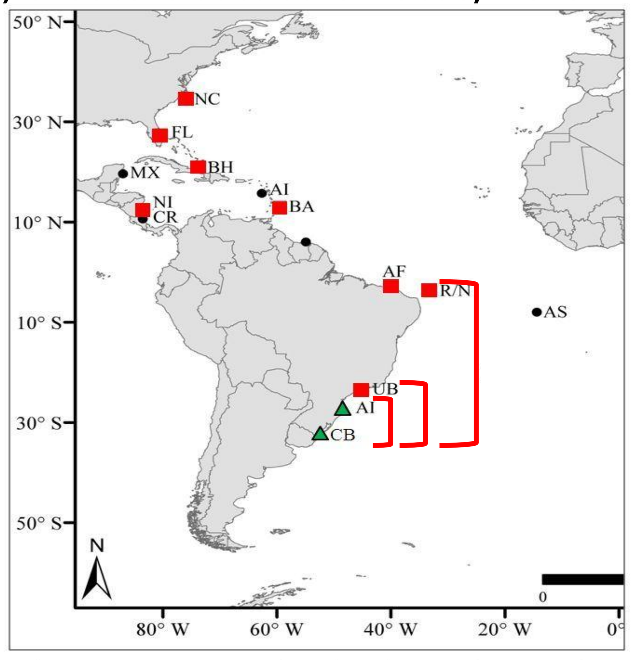


Rede de haplópitos da Ilha do Arvoredo (esquerda) e Praia do Cassino (direita)

Estruturação

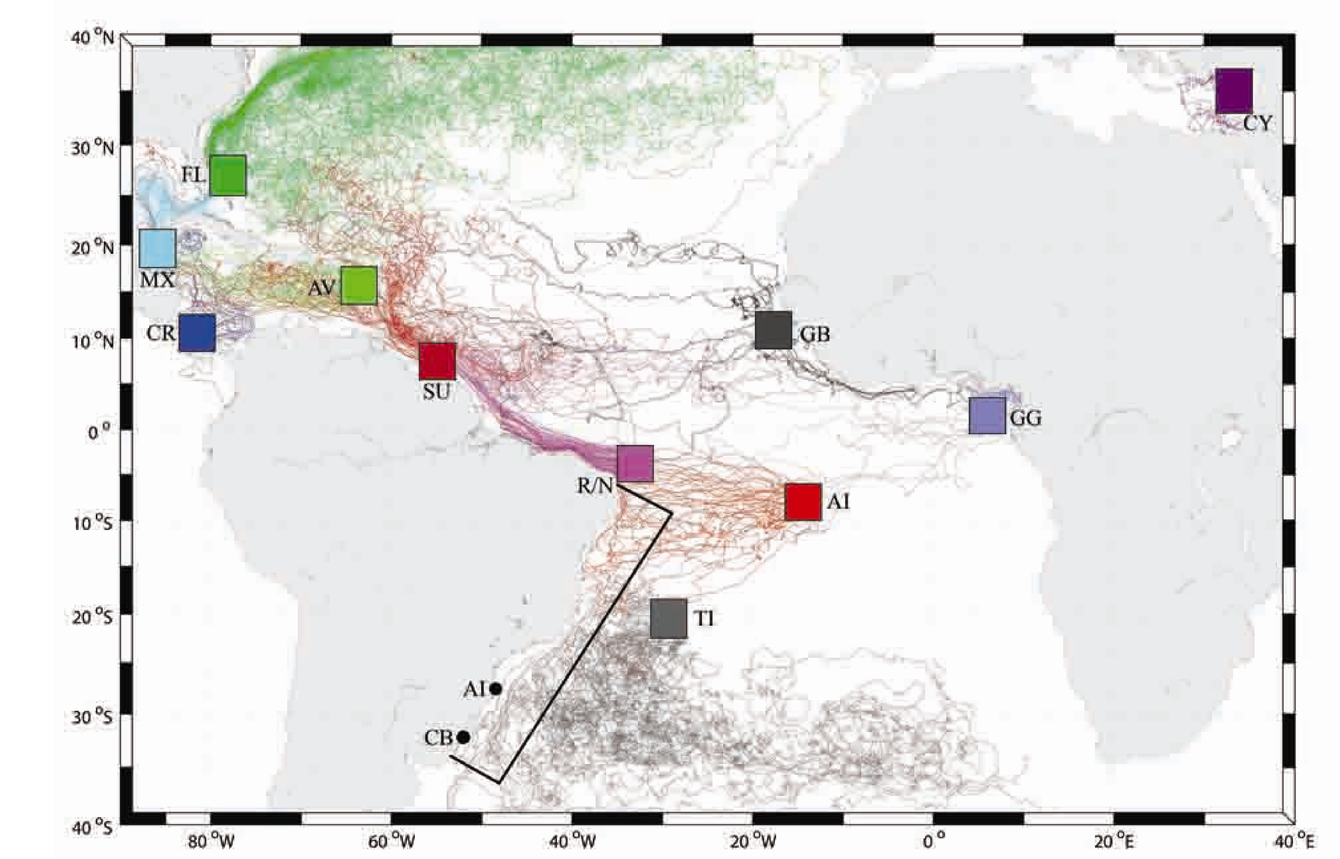
Áreas de estudo extremamente semelhantes

Estruturação em relação à maioria das áreas de forrageio, exceto Ubatuba e Rocas/Noronha



Áreas de forrageio comparadas às áreas de estudo; colchetes representam ausência de estruturação.

Trajetórias de bóias de deriva

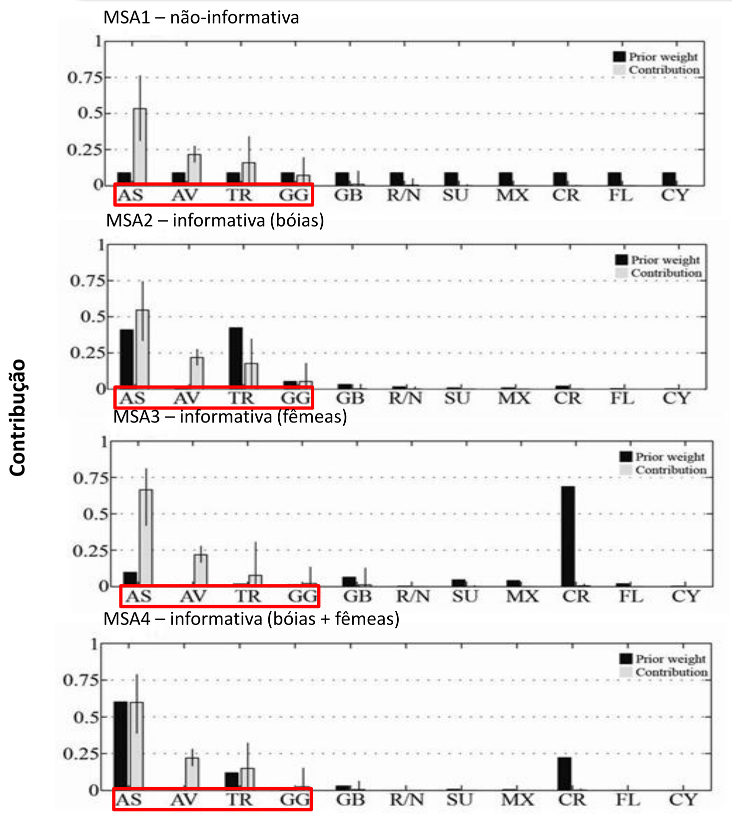


Estoque	N	Y	P
Ascensão	56	30	0.410
Trindade	58	30	0.424
Rocas/Noronha	140	2	0.017
Golfo de Guiné	45	2	0.053
Guiné Bissau	23	0	0.033
Chipre	29	0	0.026
Costa Rica	36	0	0.021
Suriname	84	0	0.009
México	93	0	0.009
I. Aves	106	0	0.008
Flórida	195	0	0.004

Número de bóias que passou por cada área de desova (N), número destas que chegou à área-alvo (Y), e probabilidade de uma bóia sair de uma área e chegar à costa leste brasileira

Trajetórias das bóias de deriva que passaram pelas áreas de desova do Atlântico: Trindade (TI), Ascenção (AI), Rocas/Noronha (R/N), Golfo de Guiné (GG), Guiné Bissau (GB), Chipre (CY), Suriname (SU), Ilha Aves (AV), Costa Rica (CR), México (MX) e Flórida (FL)

Análise de estoque misto



Ascenção, Aves, Trindade e Golfo de Guiné: maiores contribuições

Prioris não afetaram muito resultados

MSAs para o sul do Brasil, com ICs, peso das *prioris* (barras pretas) e estimativas de contribuições (barras cinza)

Considerações finais

Contribuições de Ascenção e Trindade condisseram com dados de bóias; Aves pode estar superestimada e África subestimada

Embora não tenham modificado muito as MSAs, o uso de *prioris* mais informativas é aconselhado

Apesar de serem unidades geneticamente indistinguíveis sugerimos que diferentes estratégias de manejo sejam adotadas paras as áreas de estudo devido às diferenças de estágios de vida e utilização dos habitats

Identificar as contribuições de estoques para áreas de alimentação possui importantes implicações para a conservação; é necessário descrever adequadamente mtDNA das populações de desova para melhorar dados genéticos de base utilizados nas estimativas.

FURG · Projeto Tartarugas Marinhas REBIOMAR do Arvoredo SC Brasil · Patadacobra Mergulho Adventures · Marinha do Brasil · NEMA Núcleo de Educação e Monitoramento Ambiental · CRAM Petrobras · Universidade Federal de Minas Gerais · CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico · The Rufford Small Grants Foundation www.ruffordsmallgrants.org · People's Trust for Endangered Species

Caracterização da região controle do DNA mitocondrial e análise de estoque misto de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) da Ilha do Arvoredo, SC

Maíra Carneiro Proietti[1], Paula Lara-Ruiz, Júlia Wiener Reisser, Luciano da Silva Pinto, Odir Antonio Dellagostin e Luis Fernando Marins

[1] Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Lab. de Tartarugas e Mamíferos Marinhos, Fundação Universidade Federal de Rio Grande

Introdução

A tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) é uma espécie de complexo ciclo vital, difícil de ser estudada diretamente. Uma ferramenta extremamente informativa para contornar esta dificuldade é a molecular; estes animais são alvo de diversos estudos genéticos populacionais, evolutivos e taxonômicos. O presente trabalho avaliou 49 seqüências da região controle do DNA mitocondrial de tartarugas-verdes capturadas na Ilha do Arvoredo, maior ilha da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo (SC), importante área de forrageio desta espécie no litoral sul brasileiro.

Metodologia

1. Área de estudo: Ilha do Arvoredo, SC (Figura 1).

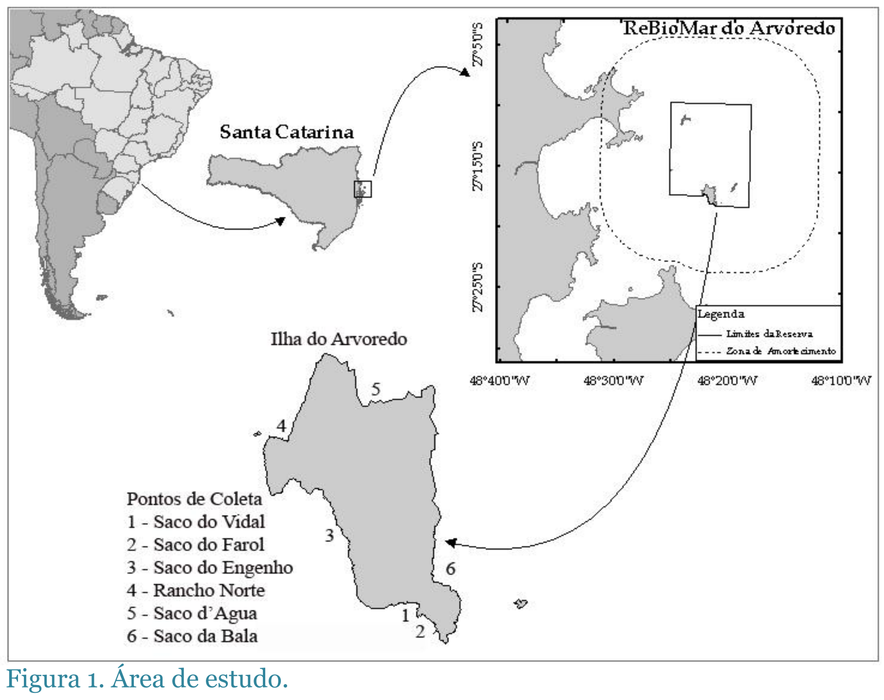


Figura 1. Área de estudo.

2. Amostragem biológica

- **Cinco expedições para amostragem biológica;**
- **Metodologia em campo (Figura 2):**

Figura 2. Captura manual (a); observação (b); biometria curva e retilínea (c); pesagem (d); registro fotográfico (e); marcação (f); coleta tecido com punch descartável (g); liberação do animal (h).

3. Análise laboratorial: 49 amostras

Extração DNA - fenol:clorofórmio → **PCR - *primers* LTCM1 e HDCM1 (*D-loop*)** → **Purificação e seqüenciamento**

4. Análise de dados

- **Seqüências obtidas (~ 500 pb) alinhadas com Clustal X 1.83 e classificadas de acordo com haplótipos Archie Carr Center (http://accstr.ufl.edu);**
- **Minimum spanning network construído com o programa TCS 1.3;**
- **Análises de diversidade haplotípica (*h*) e nucleotídica (π), e testes de diferenciação genética com outras áreas de forrageio do Atlântico realizados com Arlequin 3.11;**
- **Análise Bayesiana de estoque misto incorporando 12 áreas de desova do Atlântico realizada com o *software* Bayes.**

Resultados

- **Identificação de 8 haplótipos (Figuras 3 e 4) previamente descritos para o Oceano Atlântico:**

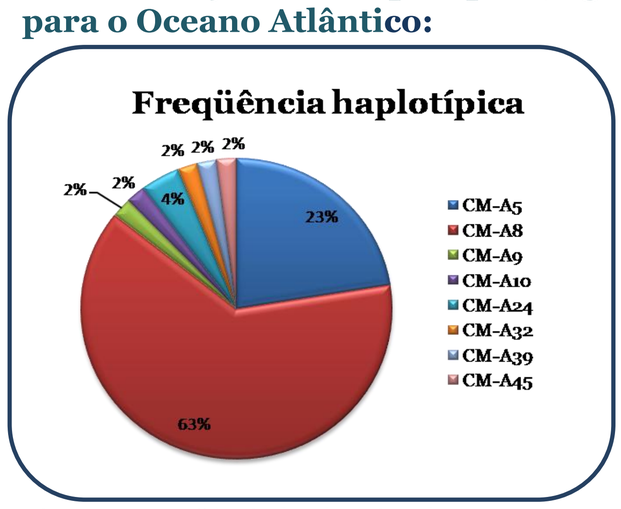


Figura 3. Freqüência haplotípica das tartarugas-verdes da Ilha do Arvoredo.

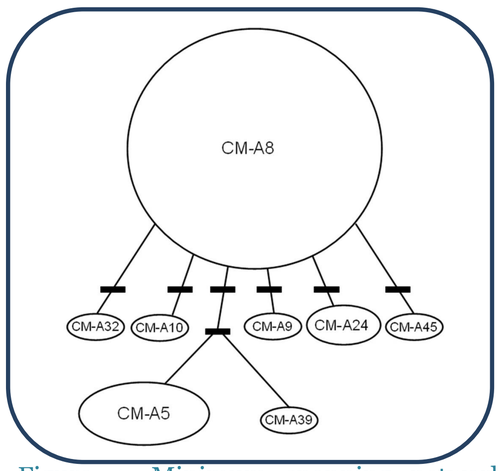


Figura 4. Minimum spanning network entre haplótipos.

- **Diversidade haplotípica (*h*) e nucleotídica (π) da área de estudo e outras áreas de forrageio descritas no Atlântico (Tabela 1):**

Tabela 1. Diversidades haplotípicas (*h*) e nucleotídicas (π) desvio padrão para as áreas de forrageio comparadas.

Área de forrageio	Haplótipos	*h*		π		n
Ilha do Arvoredo	8	0.5570	0.0697	0.0021	0.0016	49
Ubatuba	10	0.4460	0.0556	0.0020	0.0015	113
Rocas/Noronha	6	0.5887	0.0911	0.0019	0.0015	32
Almofala	13	0.7168	0.0306	0.0067	0.0039	117
Barbados	8	0.7734	0.0276	0.0105	0.0057	60
Bahamas	6	0.3703	0.0650	0.0066	0.0038	79
Nicaragua	2	0.1831	0.0621	0.0039	0.0025	60
Florida	6	0.4855	0.0668	0.0032	0.0021	62
North Carolina	8	0.6778	0.0310	0.0052	0.0031	106
Média	7	0.5334		0.0040		68

- **Testes de diferenciação (Exact tests e AMOVA Φ_{ST}) entre a área de estudo e as áreas de forrageio da Tabela 1: a agregação da Ilha do Arvoredo é significativamente diferente (P < 0,05) da maior parte das áreas, exceto Ubatuba (SP) e Atol das Rocas/Fernando de Noronha (RN/PE), que se encontram próximas à área de estudo, no Atlântico Sudoeste.**

- **Análise de estoque misto: Ilha Ascension (Reino Unido) é o maior contribuinte para a área de estudo (Tabela 2):**

Tabela 2. Análise Bayesiana de estoque misto baseado considerando prioris não-informativos, com média, desvio padrão (D.P), quantil 2.5% , mediana e quantil 97.5%.

Estoque	Média	D.P.	2.5%	Mediana	97.5%
Ilha Ascension	0.6801	0.1171	0.3869	0.7029	0.8407
Ilha Aves	0.2296	0.0597	0.1257	0.2257	0.3592
Ilha da Trindade	0.0218	0.0535	0.0000	0.0001	0.1852
Guinea Bissau	0.0197	0.0542	0.0000	0.0000	0.1948
Bioko	0.0174	0.0504	0.0000	0.0000	0.1710
Rocas/Noronha	0.0161	0.0471	0.0000	0.0000	0.1700
São Tomé	0.0062	0.0220	0.0000	0.0000	0.0663
Suriname	0.0019	0.0064	0.0000	0.0000	0.0199
México	0.0019	0.0064	0.0000	0.0000	0.0196
Costa Rica	0.0019	0.0063	0.0000	0.0000	0.0193
Flórida	0.0017	0.0058	0.0000	0.0000	0.0177
Chipre	0.0017	0.0056	0.0000	0.0000	0.0159

- **Estes resultados demonstram as extensas relações entre o local de estudo e outras áreas de alimentação e reprodução do Oceano Atlântico; tal entendimento é essencial para o estabelecimento de estratégias adequadas para o manejo e conservação desta espécie ameaçada.**

CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
The Rufford Small Grants Foundation www.ruffordsmallgrants.org
PEOPLE'S TRUST FOR ENDANGERED SPECIES

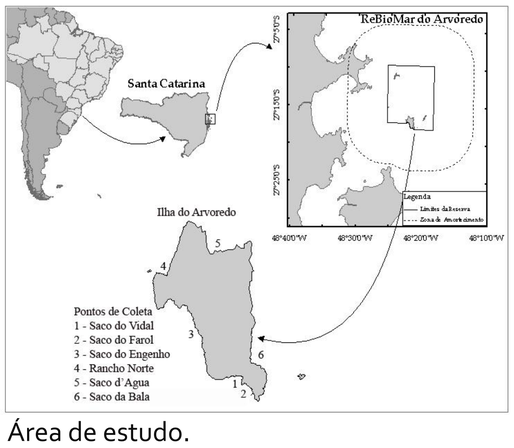
Tartarugas marinhas da Ilha do Arvoredo, SC: resultados de três anos de pesquisa.

Maíra Carneiro Proietti[1], Júlia Wiener Reisser, Paul Gerhard Kinas, Luis Fernando Marins, Ivan Sazima e Eduardo Resende Secchi

[1] Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Lab. de Tartarugas e Mamíferos Marinhos, Universidade Federal de Rio Grande

Introdução e metodologia

De dezembro de 2004 a abril de 2008 realizamos dez expedições à Ilha do Arvoredo, maior ilha da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, Santa Catarina, para estudamos diversos aspectos biológicos, ecológicos, genéticos e patológicos de juvenis de duas espécies de tartarugas marinhas, tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) e de pente (*Eretmochelys imbricata*).

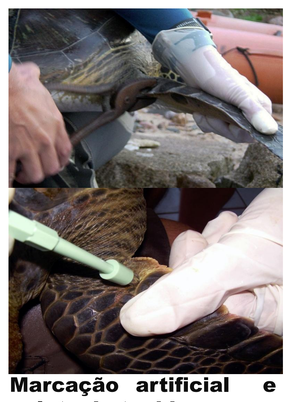


Área de estudo.

Captura manual.

Observação do animal.

Pesagem, biometria curvilínea e retilínea.

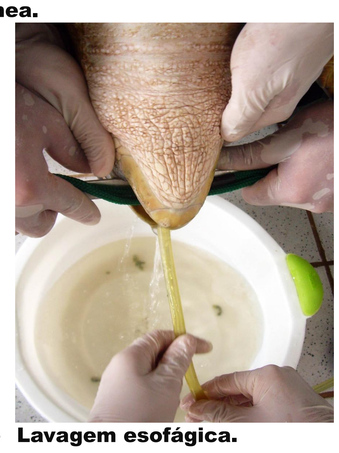


Marcação artificial e coleta de tecido.

Fotografia dos perfis faciais para foto-identificação.

Fotografia e coleta de epibiontes.

Biometria, fotografia e coleta de fibropapilomas.



Lavagem esofágica.

Liberação.

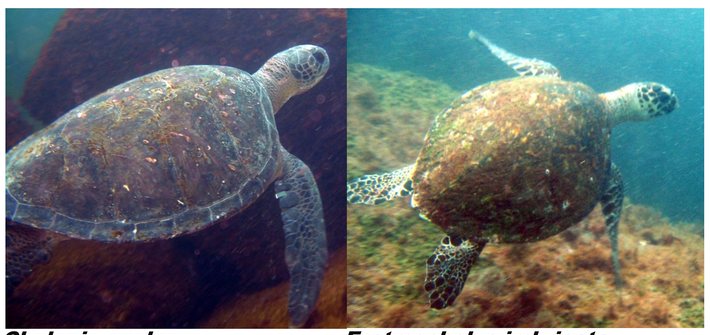
Resultados

Capturas, pesagem, biometria e marcação

131 indivíduos de *Chelonia mydas* (com 43 recapturas de 31 indivíduos) e cinco de *Eretmochelys imbricata* (com duas recapturas de um indivíduo).

Comprimentos curvilíneos de carapaça de 33,5-83 cm e 36-59,5 cm, respectivamente.

Intervalos entre captura e recaptura de poucos dias a mais de três anos, demonstrando residência na área.



Chelonia mydas *Eretmochelys imbricata*

Fibropapilomatose

Prevalência de 8,3%, ocorrência em classes de tamanho intermediárias.

Diâmetros de 0,3 a >25 cm, texturas e cores variadas, localizadas principalmente nos olhos, nadadeiras, região do pescoço e caudal.

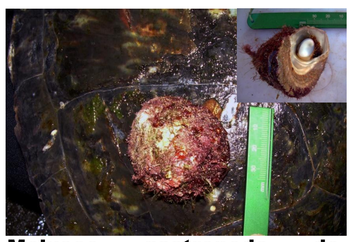
Coleta de oito tumores para futura análise histopatológica.

Exemplos de tumores característicos da fibropapilomatose.

Epibiota

Extremamente diversificada, incluindo micro e macroalgas, cianobactérias, moluscos, crustáceos e esponjas.

Craca *Chelonibia testudinaria*, em cabeça e casco.



Molusco gastropoda do gênero Astraea, em casco.

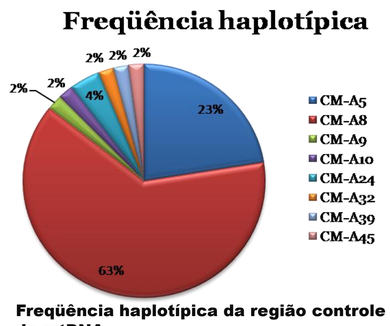
Cascos de *E. imbricata* exibindo grande diversidade.

Casco de *C. mydas* com grande cobertura. No detalhe, cianobactérias, clorofíceas e diatomáceas podem ser vistas por microscopia eletrônica.

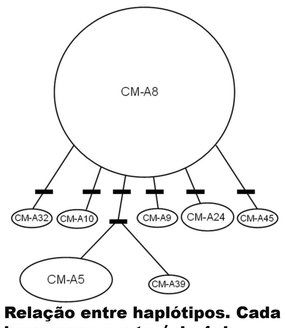
Genética populacional

Análises da região controle do DNA mitocondrial (mtDNA) de 49 tartarugas-verdes revelaram a presença de oito haplótipos.

Indivíduos da Ilha de Arvoredo compõem um estoque misto, sendo provenientes de diversas áreas de desova do Atlântico, principalmente Ilha Ascensión (Reino Unido).



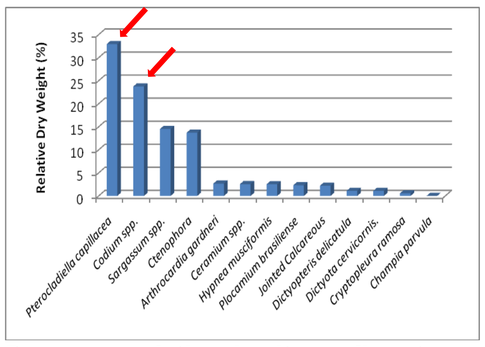
Freqüência haplotípica da região controle do mtDNA.



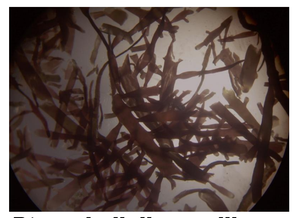
Relação entre haplótipos. Cada barra representa ≠ de 1pb.

Lavagem esofágica

Análise de 30 conteúdos esofágicos de tartarugas-verdes revelou preferência alimentar pelas macroalgas *Pterocladiella capillacea* e *Codium* spp.



Peso seco relativo dos itens alimentares encontrados nas lavagens esofágicas.



***Pterocladiella capillacea* vista em lupa.**

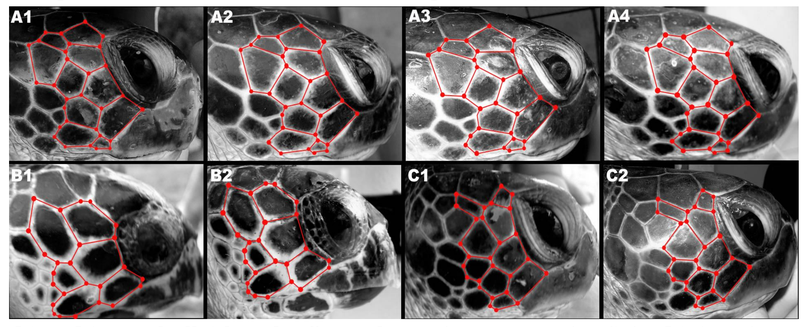
***Codium* spp.**

Foto-identificação

O arranjo das escamas faciais demonstrou ser uma excelente ferramenta para foto-identificação dos indivíduos.

Foi possível identificar diversos indivíduos que haviam perdido as marcas artificiais.

Fotografias em diferentes momentos ilustram esta possibilidade (linhas vermelhas destacam os padrões individuais das placas):



A1 a A4: um indivíduo de *C. mydas.* Intervalos entre foto A1 (captura inicial) e fotos A2, A3 e A4 foram 194, 572 e 906 dias.
B1 e B2: um indivíduo *de E. imbricata.* Intervalo entre fotos: 708 dias.
C1 e C2: um indivíduo de *C. mydas.* Intervalo entre fotos: 909 dias.

Apoio e fincanciamento: