



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMÁTICA, USO E
CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

CIBELE CASTRO MONTEIRO

FILOGEOGRAFIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE TARTARUGAS MARINHAS
DA COSTA SEMIÁRIDA DO ATLÂNTICO EQUATORIAL OCIDENTAL BASEADA
EM SEQUÊNCIAS DE DNA MITOCONDRIAL E NUCLEAR

FORTALEZA

2024

CIBELE CASTRO MONTEIRO

FILOGEOGRAFIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE TARTARUGAS MARINHAS DA
COSTA SEMIÁRIDA DO ATLÂNTICO EQUATORIAL OCIDENTAL BASEADO EM
SEQUÊNCIAS DE DNA MITOCONDRIAL E NUCLEAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade. Área de concentração: Genética de Populações e Conservação.

Orientador: Dr. Rodrigo Maggioni

Coorientador: Dr. Vicente Vieira Faria

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M775f Monteiro, Cibeles Castro.

Filogeografia e diversidade genética de tartarugas marinhas da Costa Semiárida do Atlântico Equatorial Ocidental baseado em sequências de DNA mitocondrial e nuclear / Cibeles Castro Monteiro. – 2024.

131 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

Coorientação: Prof. Dr. Vicente Vieira Faria.

1. Quelônios. 2. Genética de populações. 3. Ceará. I. Título.

CDD 578.7

CIBELE CASTRO MONTEIRO

FILOGEOGRAFIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE TARTARUGAS MARINHAS DA
COSTA SEMIÁRIDA DO ATLÂNTICO EQUATORIAL OCIDENTAL BASEADO EM
SEQUÊNCIAS DE DNA MITOCONDRIAL E NUCLEAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade. Área de concentração: Genética de Populações e Conservação.

Orientador: Dr. Rodrigo Maggioni

Coorientador: Dr. Vicente Vieira Faria

Aprovada em: 09/12/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Juliana de Carvalho Gaeta
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Tallita Cruz Lopes Tavares
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Simone Almeida Gavilan
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof. Dr. Vitor Luz Carvalho
ONG Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos
(AQUASIS)

A Deus, Nossa Senhora, minha família e
às tartarugas, que tanto já me ensinaram e
ainda me ensinarão.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta tese representa o fechamento de um ciclo desafiador e transformador, que só foi possível graças ao apoio incondicional de pessoas e instituições que marcaram profundamente minha jornada acadêmica e pessoal.

À minha família, minha base e maior fonte de inspiração, expresso minha eterna gratidão. Aos meus pais, por me ensinarem a sonhar alto e nunca desistir, mesmo diante das adversidades. Ao meu noivo Arthur, meu companheiro de vida e de sonhos, obrigada por estar ao meu lado em cada etapa deste percurso, compartilhando as alegrias e me confortando nos momentos difíceis. Sua paciência, amor e incentivo foram pilares fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Aos meus amigos de laboratório Jhonatas, Vilany, Juliana, Karen, Álvaro e Rafael, que se tornaram uma verdadeira família ao longo desses anos, meu sincero agradecimento por todos os cafés, sorvetes, caminhadas e momentos de descontração, tornando a jornada mais leve e também pelos momentos de discussões de pesquisa e compartilhamento de saberes a todo momento. A parceria e o companheirismo de vocês foram inestimáveis. Aos técnicos do CEDECAM, Rafael e Graça, por todo o auxílio, ensinamentos e suporte durante o dia a dia e durante os experimentos de bancada, por sempre estarem dispostos a ajudar no que fosse preciso, e repassar seus conhecimentos, meu muito obrigada! Também á toda equipe do CEDECAM, por todo suporte e apoio durante a pesquisa.

Aos meus amigos pessoais, que sempre estiveram presentes, mesmo à distância, com palavras de motivação, mensagens de apoio e, sobretudo, com amizade genuína. Obrigada por acreditarem em mim e celebrarem cada conquista ao meu lado.

Agradeço ao meu orientador, professor Rodrigo Maggioni, que prontamente assumiu o desafio desta orientação. Obrigada por todos os ensinamentos, momentos de trocas e discussões da pesquisa, foram sempre enriquecedores!

Agradeço à banca convidada, Juliana, Simone, Tallita e Vitor e aos suplentes, Rafael e Sandra, pela disponibilidade e aceite em contribuir com a presente pesquisa. Obrigada também ao meu coorientador, professor Vicente, pelas valiosas contribuições no artigo publicado e na tese.

Em especial, agradeço a ONG AQUASIS por disponibilizar todas as amostras de tecidos de tartarugas marinhas utilizadas na pesquisa, por sempre estarem dispostos a contribuir e a tirar dúvidas sobre as coletas e pelo belíssimo trabalho que fazem para a conservação das espécies marinhas no nosso litoral.

Agradeço também à FUNCAP pela bolsa de doutorado concedida, que possibilitou a realização deste trabalho. Esse suporte foi essencial para que eu pudesse me dedicar à pesquisa, contribuindo de forma decisiva para a conclusão deste estudo. Obrigada ao programa de Pós Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade, por todo apoio e orientações durante esses anos.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta caminhada, meu muito obrigada. Cada um de vocês, de diferentes formas, contribuiu para que este sonho se tornasse realidade. Dedico esta conquista a todos vocês.

“Seja corajoso, seja curioso, seja determinado, supere as probabilidades. É possível.” (Stephen Hawking)

RESUMO

O litoral do Ceará mostra-se como uma região importante para o grupo das tartarugas marinhas, incluindo registros de desovas, regiões de alimentação e identificada como rota migratória. No entanto, não está claro o papel e o grau de conexão das tartarugas marinhas da costa cearense no contexto das populações de quelônios mundiais. Estudos genéticos trazem importantes avanços nas informações ecológicas para o grupo. No entanto, predominam até o momento as análises de genes mitocondriais, que podem ser insuficientes para responder às questões de conectividade e interações interespecíficas. No presente estudo, foi utilizado material genético de origem mitocondrial (COI) e nuclear (RAG1, RAG2) amplificados por PCR convencional, para amostras de tartarugas marinhas encalhadas coletadas em monitoramentos no litoral leste do Ceará, pela Associação de pesquisa e Conservação de Ecossistemas Aquáticos (AQUASIS) entre os anos de 2010 e 2022. De acordo com o Sistema de Monitoramento da Biota Aquática (SIMBA), na região há prioritariamente ocorrências envolvendo a Tartaruga verde. Foi feito o sequenciamento de SANGER do DNA amplificado e foram obtidas 102 sequências para as espécies *Chelonia mydas* (n=88), *Caretta caretta* (n=6), *Eretmochelys imbricata* (n=4) e *Lepidochelys olivacea* (n=4), que foram analisadas juntamente com 80 sequências disponíveis no banco de dados GenBank. As sequências disponíveis foram em sua maioria para a espécie *C. mydas* e obtidas de sequências mitocondriais, o que dificulta a compreensão das características genéticas disponibilizadas pelo macho. Essa informação é especialmente importante para o grupo, que possui o sistema de acasalamento poliândrico. No banco de dados genômico contém pouca ou nenhuma informação de sequências para as espécies e genes utilizados, principalmente sobre sequências nucleares. Os resultados indicam que as tartarugas de populações coletadas no Ceará compartilham haplótipos com outras localidades do Oceano Atlântico, incluindo amostras da Guiana Francesa, Porto Rico e EUA e também do Oceano Pacífico, como amostras da Austrália e do Mar Mediterrâneo, possuindo também haplótipos particulares da região tanto na abordagem nuclear quanto na mitocondrial. Para os genes RAG1 e RAG2 houve haplótipos que foram compartilhados por mais de uma espécie de diferentes locais. Esse fato traz informações sobre a possibilidade de trocas genéticas entre diferentes espécies, sendo indicado o uso de mais genes nucleares juntamente com genes mitocondriais, para se conhecer os estoques

genéticos referentes a fêmea e ao macho. Grupos amostrais de diferentes regiões geográficas parecem estar geneticamente conectadas, com a possibilidade de fluxo gênico permeado pelo comportamento migratório das espécies, mesmo entre diferentes oceanos ou há ainda um compartilhamento de genes ancestrais por essas localidades. Foram identificadas regiões que são bem conservadas entre diferentes espécies, mostrando uma proximidade genética, o que pode favorecer a ocorrência de introgressão dentro do grupo. Aqui chamamos a atenção para a região do Nordeste do Brasil, que parece ser extremamente importante para a conservação das espécies de tartarugas marinhas, em que há a ocorrência de animais em diferentes estágios de vida e que por apresentar uma conectividade genética com outras regiões, também pode ser afetada por impactos externos.

Palavras-chave: quelônios; genética de populações; Ceará.

ABSTRACT

The coastline of Ceará stands out as an important region for sea turtles, including records of nesting sites, feeding grounds, and its identification as a migratory route. However, the role and degree of connection of sea turtles from the Ceará coast within the context of global turtle populations remain unclear. Genetic studies have provided significant advances in ecological information about this group. Nevertheless, analyses have so far predominantly focused on mitochondrial genes, which may be insufficient to address questions of connectivity and interspecies interactions. In this study, mitochondrial (COI) and nuclear (RAG1, RAG2) genetic material amplified by conventional PCR was used for analyses of stranded sea turtle samples collected during monitoring along the eastern coast of Ceará by the Association for Research and Conservation of Aquatic Ecosystems (AQUASIS) between 2010 and 2022. According to the Aquatic Biota Monitoring System (SIMBA), the region primarily reports occurrences involving the green turtle. The amplified DNA was sequenced using the Sanger method, yielding 102 sequences for the species *Chelonia mydas* (n=88), *Caretta caretta* (n=6), *Eretmochelys imbricata* (n=4), and *Lepidochelys olivacea* (n=4). These sequences were analyzed alongside 80 sequences available in the GenBank database. The available sequences were mostly for the species *C. mydas* and derived from mitochondrial DNA, which limits insights into genetic characteristics contributed by males. This information is particularly significant for the group, which exhibits a polyandrous mating system. The genomic database contains little or no sequence information for the studied species and genes, especially regarding nuclear sequences. The results indicate that sea turtles from populations collected in Ceará share haplotypes with other locations in the Atlantic Ocean, including samples from French Guiana, Puerto Rico, and the USA, as well as from the Pacific Ocean, such as samples from Australia and the Mediterranean Sea. The turtles also exhibit unique haplotypes specific to the region in both nuclear and mitochondrial analyses. For the RAG1 and RAG2 genes, some haplotypes were shared among different species from various locations. This provides information about the potential for genetic exchange between species, suggesting that the use of additional nuclear genes along with mitochondrial genes is essential to better understand the genetic stocks contributed by both females and males. Sample groups from different geographic regions appear to be genetically connected, with the possibility of gene

flow facilitated by the migratory behavior of these species, even across oceans, or through the sharing of ancestral genes among these locations. Highly conserved regions were identified across different species, indicating genetic proximity, which may favor the occurrence of introgression within the group. This study highlights the importance of the northeastern region of Brazil for sea turtle conservation, as it hosts individuals at different life stages and, due to its genetic connectivity with other regions, could also be affected by external impacts.

Keywords: chelonian; population genetics; nuclear DNA; Ceará.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Espécies de tartarugas marinhas	41
Figura 2 –	Mapa de ocorrência/distribuição das espécies de tartarugas marinhas ao redor do mundo	45
Figura 3 –	Localidades em que foram coletadas as amostras de tecido de tartarugas marinhas no litoral leste do Ceará utilizadas para as análises genéticas	52
Quadro 1 –	Reagentes utilizados na PCR convencional para amostras de tartarugas marinhas	54
Quadro 2 –	Primers e as condições de termociclagem que foram utilizados para as amplificações de DNA de tartarugas marinhas por meio de PCR convencional	55
Quadro 3 –	Quantidade de sequências utilizadas (n), selecionadas do banco de dados (GenBank) e obtidas por sequenciamento de SANGER do presente trabalho (Sequências obtidas) separas por espécies (<i>Chelonia mydas</i> , <i>Caretta caretta</i> , <i>Eretmochelys imbricata</i> e <i>Lepidochelys olivacea</i>) e por gene (COI, RAG1 e RAG2)	59
Figura 4 –	Matriz de diferenciação genética (FST) pareada entre Populações de <i>Chelonia mydas</i> analisadas para o gene COI	64
Figura 5 –	Matriz de diferenças pareadas médias entre populações de <i>Chelonia mydas</i> para o gene COI gerada pelo software R	65
Figura 6 –	Rede de haplótipos para sequências parciais do gene COI de <i>Chelonia mydas</i> partir do método de <i>Minimum Spanning Network</i>	67
Figura 7 –	Rede de haplótipos para sequências parciais do gene COI de <i>Caretta caretta</i> a partir do método de <i>Minimum Spanning Network</i>	73
Figura 8 –	Rede de haplótipos para sequências parciais do gene COI de <i>Eretmochelys imbricata</i> a partir do método de <i>Minimum Spanning Network</i>	75
Figura 9 –	Rede de haplótipos para sequências parciais do gene COI de <i>Lepidochelys olivacea</i> a partir do método de <i>Minimum Spanning Network</i>	78
Figura 10 –	Árvore filogenética para o gene COI, construída pelo Método <i>Neighbor-Joining</i> , aplicando o modelo de dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1980). Números próximos aos ramos correspondem à consistência após 10.000 replicações por <i>Bootstrap</i>	80
Figura 11 –	Rede de haplótipos para o gene nuclear RAG1 com sequências de <i>Chelonia mydas</i> , <i>Eretmochelys imbricata</i> ,	

	<i>Lepidochelys olivacea</i> e <i>Caretta caretta</i> do Brasil e EUA a partir do método de <i>Minimum Spanning Network</i>	90
Figura 12 –	Detalhe da rede de haplótipos para o gene nuclear RAG1 mostrando o haplótipo hap_2 compartilhado por <i>E. imbricata</i> , <i>L. olivacea</i> e <i>C. caretta</i> a partir do método de <i>Minimum Spanning Network</i>	92
Figura 13 –	Árvore filogenética para o gene RAG1, construída pelo Método <i>Neighbor-Joining</i> , aplicando o modelo de dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1980). Números próximos aos ramos correspondem à consistência após 10.000 replicações por <i>Bootstrap</i>	95
Figura 14 –	Rede de haplótipos para o gene nuclear RAG2 com as sequências de <i>Chelonia mydas</i> , <i>Eretmochelys imbricata</i> , <i>Lepidochelys olivacea</i> e <i>Caretta caretta</i> do Brasil, EUA e Guiana a partir do método de <i>Minimum Spanning Network</i>	97
Figura 15 –	Detalhe da rede de haplótipos para o gene nuclear RAG2 mostrando o haplótipo hap_2 compartilhado por <i>E. imbricata</i> , <i>L. olivacea</i> e <i>C. caretta</i> a partir do método de <i>Minimum Spanning Network</i>	99
Figura 16 –	Árvore filogenética para o gene RAG2, construída pelo Método <i>Neighbor-Joining</i> , aplicando o modelo de dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1980). Números próximos aos ramos correspondem à consistência após 10.000 replicações por <i>Bootstrap</i>	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados de diversidade genética para <i>Chelonia mydas</i> , <i>Caretta caretta</i> e <i>Eretmochelys imbricata</i> gerados a partir das sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI).....	61
Tabela 2 -	Matriz de distância genética pareada entre conjunto amostral de <i>Chelonia mydas</i> com base no gene COI gerada com base no método <i>Kimura-2-Parameter</i> (K2P).....	66
Tabela 3 -	Matriz de distâncias genéticas pareadas entre populações de <i>Caretta caretta</i> para o gene COI gerada com base no método <i>Kimura-2-Parameter</i> (K2P).....	71
Tabela 4 -	Matriz de distâncias genéticas pareadas entre populações de <i>Eretmochelys imbricata</i> para o gene COI gerada com base no método <i>Kimura-2-Parameter</i> (K2P).....	77
Tabela 5 -	Dados de diversidade genética para <i>Chelonia mydas</i> , <i>Caretta caretta</i> , <i>Eretmochelys imbricata</i> e <i>Lepidochelys olivacea</i> gerados a partir de sequências do gene nuclear RAG1	82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	METHODS USED IN SEA TURTLE GENETIC AND MOLECULAR STUDIES	29
3	ESTUDOS GENÉTICOS E FILOGEOGRAFIA DE TARTARUGAS MARINHAS	41
3.1	Revisão de literatura	41
3.1.1	<i>Tartarugas marinhas: um breve resumo sobre suas principais características e distribuição</i>	41
3.1.2	<i>Tartarugas marinhas no Brasil</i>	47
3.1.3	<i>Filogeografia de tartarugas marinhas</i>	49
4	METODOLOGIA	51
4.1	Obtenção e organização das amostras	51
4.2	Extrações de DNA	53
4.3	Amplificação das sequências de interesse	54
4.4	Sequenciamento de DNA e análise dos resultados	55
4.5	Estimativa da diversidade genética	56
4.6	Comparações com o banco de dados de sequências genéticas e estimativas das relações filogenéticas	56
4.7	Construção e Análise das Redes de Haplótipos	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	Análises moleculares das amostras para os genes COI, RAG 1, RAG 2	57
5.2	Sequências de DNA obtidas e comparação com banco de dados	58
5.3	Dados Genéticos das populações estudadas	59
5.3.1	<i>Citocromo oxidase subunidade I (COI)</i>	60
5.3.1.1	<i>Diversidade genética de Chelonia mydas para o gene COI</i>	62
5.3.1.2	<i>Rede de haplótipos de Chelonia mydas para o gene COI</i>	67
5.3.1.3	<i>Diversidade genética de Caretta caretta para o gene COI</i>	69
5.3.1.4	<i>Rede de haplótipos de Caretta caretta para o gene COI</i>	72
5.3.1.5	<i>Análises genéticas e rede de haplótipos de Eretmochelys imbricata para o gene COI</i>	74
5.3.1.6	<i>Análises genéticas para Lepidochelys olivacea</i>	77

5.3.1.7	Árvore filogenética para o gene COI	79
5.3.2	Gene RAG1	81
5.3.2.1	Análises genéticas de <i>Chelonia mydas</i> para o gene RAG1	83
5.3.2.2	Análises genéticas de <i>Caretta caretta</i> para o gene RAG1	85
5.3.2.3	Análises genéticas de <i>Eretmochelys imbricata</i> para o gene RAG1	86
5.3.2.4	Análises genéticas de <i>Lepidochelys olivacea</i> para o gene RAG1	88
5.3.2.5	Rede de haplótipos para o gene RAG1.....	89
5.3.2.6	Árvore filogenética para o gene RAG1.....	94
5.3.3	Gene RAG2	96
5.3.3.1	Rede de haplótipos para o gene RAG2.....	96
5.3.3.2	Árvore filogenética para o gene RAG2.....	100
6	CONCLUSÕES	102
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
	REFERÊNCIAS	104
	APÊNDICE A – INFORMAÇÕES DAS AMOSTRAS QUE FORAM UTILIZADAS NO ESTUDO	121
	APÊNDICE B – NÚMEROS DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS UTILIZADAS	123
	APÊNDICE C – DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES E LOCAIS OBSERVADOS NOS HAPLÓTIPOS PARA A REGIÃO MITOCONDRIAL	127
	APÊNDICE D – DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES E LOCAIS OBSERVADOS NOS HAPLÓTIPOS PARA O LOCUS NUCLEAR RAG1	128
	APÊNDICE E – DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES E LOCAIS OBSERVADOS NOS HAPLÓTIPOS PARA O LOCUS NUCLEAR RAG2	129
	APÊNDICE F – NÚMEROS DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS DEPOSITADAS NO NCBI PARA O GENE COI	130

1 INTRODUÇÃO

Tartarugas marinhas são répteis amplamente distribuídos ao redor do globo. Atualmente são conhecidas sete espécies, divididas em duas famílias: Cheloniidae e Dermochelyidae (Meylan; Meylan, 1999). No Brasil, ocorrem cinco espécies, (Marcovaldi; Dei Marcovaldi, 1999), que estão distribuídas distintamente ao longo de toda a costa. Destas, quatro são classificadas nacionalmente como vulneráveis ou em algum grau de perigo de extinção (MMA, 2022).

A costa brasileira é de extrema importância para as tartarugas marinhas, incluindo áreas de alimentação, reprodução e desova ao longo de todo o litoral (Bomfim *et al.*, 2021; Fernandes *et al.*, 2017). O país passou por um longo período de consumo de ovos, abate de fêmeas e coleta de cascos, o que reduziu consideravelmente a quantidade de tartarugas marinhas no litoral brasileiro (Marcovaldi; Dei Marcovaldi, 1999). Historicamente, os fatores antrópicos atrelados à falta de estudos significativos com o grupo, ocasionaram enormes prejuízos ecológicos no Brasil, como por exemplo o declínio de algumas populações de tartarugas marinhas no litoral brasileiro (Marcovaldi *et al.*, 2011).

As espécies de tartarugas marinhas são geneticamente próximas e o período reprodutivo de algumas se sobrepõe em determinadas regiões, o que pode facilitar a ocorrência de hibridização (Bowen; Karl, 2007). O Brasil se destaca como uma região que possui alta taxa de ocorrência do fenômeno do hibridismo entre as espécies de tartarugas marinhas da família Cheloniidae. Soares *et al.*, 2017 relatam que essa ocorrência de hibridismo na costa brasileira aparenta ser um fenômeno persistente. Com base nessas observações foi sugerido que sejam feitos monitoramentos genéticos constantes, atrelados à estudos de ecologia, comportamento e evolução desses híbridos, para se averiguar qual proporção e impacto esse fenômeno está acarretando para as populações (Arantes *et al.*, 2020; Brito *et al.*, 2020).

Pesquisas que tenham como objetivo trazer informações relevantes sobre os estoques genéticos de tartarugas marinhas são importantes devido às altas taxas de fluxo gênico que ocorrem entre populações nas bacias oceânicas mediadas por machos (Roberts; Schwartz; Karl, 2004). Há relatos de eventos de fluxo gênico desde a ancestralidade nas populações de tartarugas marinhas da família Cheloniidae,

sendo a especiação com fluxo gênico comum em espécies marinhas (Vilaça *et al.*, 2021).

Estudos de genética de populações são importantes para se conhecer os estoques genéticos em diferentes locais. Para este fim, genes mitocondriais são constantemente utilizados. No entanto, a porção do genoma mitocondrial revela apenas uma parte das informações genéticas contidas no DNA por ser herdado apenas pela linhagem materna. Assim, além de genes mitocondriais, o uso de marcadores nucleares vem se tornando imprescindível em estudos de genética de tartarugas marinhas (Naro-Maciel *et al.*, 2008; Vilaça *et al.*, 2012; Arantes *et al.*, 2020; Brito *et al.*, 2020).

Para uma caracterização genética mais precisa e completa, análises combinadas de sequências mitocondriais e nucleares vêm sendo utilizadas. Estudos indicaram resultados diferentes no caso da utilização de apenas genes mitocondriais em comparação com a adição da amplificação de porções nucleares (Monzón-Argüello *et al.*, 2008; Arantes *et al.*, 2020). A exemplo disso, tem-se o uso de sequências mitocondriais amplificadas com o gene Citocromo oxidase b (COI) juntamente com amplificações utilizando genes de ativação da recombinação somática (RAG1 e RAG2), indicando resultados efetivos acerca da identificação de híbridos em juvenis (Brito *et al.*, 2020).

O litoral do estado do Ceará é uma importante área de alimentação, forrageio e rota de migração de Testudines marinhos. Por não se tratar de uma área prioritária documentada de desova desses animais, estudos na região ainda são escassos. Relata-se a necessidade de serem realizados mais estudos na região, destacando-se sua importância para a ecologia e conservação das tartarugas marinhas (Baudouin *et al.*, 2015; Bomfim *et al.*, 2021; Perazo *et al.*, 2021).

A costa cearense é ainda um importante corredor de alimentação para as espécies de tartarugas marinhas (Bezerra *et al.*, 2012). Ademais, é registrado um alto índice de encalhes de tartarugas marinhas, bem como a ocorrência de registros de captura desses animais em artefatos de pesca (Sales *et al.*, 2008; Poli *et al.*, 2014; Perazo *et al.*, 2021).

Diante do exposto, estudos que tragam informações sobre a composição genética das populações de tartarugas marinhas no Ceará são importantes para desvendar a origem e a conexão dessas tartarugas com as demais populações do Atlântico e também para identificar relações intraespecíficas. A extração de DNA de

amostras de tecido de tartarugas marinhas coletadas nos monitoramentos das praias cearenses, é uma forma de obter diversas informações sobre seu atual estado de conservação.

A hipótese que norteia a presente tese é a de que as tartarugas marinhas que ocorrem no litoral do Ceará possuem estoques genéticos diversificados, possuindo relações filogeográficas importantes para a compreensão da ecologia do grupo. Compreender com quais outras localidades ocorre o compartilhamento de haplótipos, traz informações importantes para ações de conservação do grupo, além de reforçar a importância ecológica da região. Além disso, considerando o nível de hibridização observado em outros locais da costa brasileira, seria possível examinar se há a ocorrência ou o indicativo de híbridos dentre os animais encalhados na região.

Para testar essas hipóteses isso foi traçado como objetivo geral a caracterização genética das tartarugas marinhas amostradas no litoral do Ceará por meio de marcadores mitocondriais e nucleares. E como objetivos específicos: (a) Ampliar a quantidade de dados disponíveis no banco de dados GenBank para os genes em questão (b) Investigar a estrutura populacional de tartarugas marinhas da região do Ceará por meio de sequências mitocondriais e nucleares; (c) Compreender as relações filogenéticas das tartarugas para a região e para outras localidades do mundo.

2 METHODS USED IN SEA TURTLE GENETIC AND MOLECULAR STUDIES

Artigo publicado em: Herpetological Journal Volume 34 (outubro 2024), 228–236
<https://doi.org/10.33256/34.4.228236>

Sea turtles have a tropical and subtropical distribution and can be found in nearly all seas and oceans. They have been the subject of considerable genetic research. However, it does not yet appear that the molecular techniques used for these genetic studies follow a consensus or universal set of tools to be followed for subsequent studies. This is not desirable since it may preclude data exchange and use among studies. Thus, the aim of this review was to survey the main genetic and molecular methods used for sea turtle research worldwide. To achieve this goal, a total of 95 scientific papers were compiled from online databases. We considered articles that used molecular tools for genetic analysis and provided detailed locality data. The following aspects were assessed: species studied, local of sample collection, type of tissue used for molecular studies and type of genetic material used. The seven known sea turtle species have different distribution patterns, with some overlapping of occurrence. *Chelonia mydas* has been studied genetically along the coasts of all continents. Skin is the most common type of tissue used for molecular analyses. From genetic studies on sea turtles, it is possible to verify the occurrence of hybridism. This phenomenon is relevant to the conservation of the species and was reported in six articles on this topic. Therefore, it is considered that genetic and molecular assays in sea turtles are important tools for biological evaluation and protection. The aim was to survey the main methods used in genetic and molecular research on marine turtles.

Keywords: DNA, Chelonian, Testudines, marine turtles

INTRODUCTION

Sea turtles are highly migratory reptiles that are even capable of transoceanic migrations (Boyle *et al.*, 2009). They have a relatively high rate of gene flow, complex population structure, and show multiple paternity (Bowen & Karl, 2007). Hybridization in sea turtles has been reported, indicating that genetic introgression occurs across species (Vilaça *et al.*, 2012). Population genetics studies of Testudines are

complicated, due to the constant modifications in populations and the long and complex life cycle, including the alteration of habitats during different life stages, which alters the behaviour of the group (McClellan & Read, 2007; Arthur *et al.*, 2008).

Molecular studies have provided significant insights into sea turtle populations worldwide, including results on genetics, phylogenetics, evolution and conservation (Naro-Maciel *et al.*, 2008, 2010; Barley *et al.*, 2010; Shamblin *et al.*, 2012a; Bradshaw *et al.*, 2018; Camacho-Sánchez *et al.*, 2022). Phylogenetic analyses using nuclear markers reveal a possible pattern of introgression between species of sea turtle populations in Brazil (Vilaça *et al.*, 2012). Furthermore, the combination of nuclear and mitochondrial markers analyses has proven to be effective for evolutionary and genetic studies in the group (Naro-Maciel *et al.*, 2008; Garofalo *et al.*, 2013; Vilaça *et al.*, 2022) and has allowed the identification of hybrids (Arantes *et al.*, 2020a; Arantes *et al.*, 2020b; Brito *et al.*, 2020). In addition, analyses of polymorphic regions and the use of microsatellite markers have provided interesting results that are relevant to the ecology and conservation of the group (Roden & Dutton, 2011; Chow *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021; Naguib *et al.*, 2022).

The present study aimed to compile the methodologies and results used from genetic and molecular analyses involving sea turtles worldwide. This information should provide a clear picture of the main gaps in the current knowledge about marine turtle genetics and indicate new approaches to study this complex group.

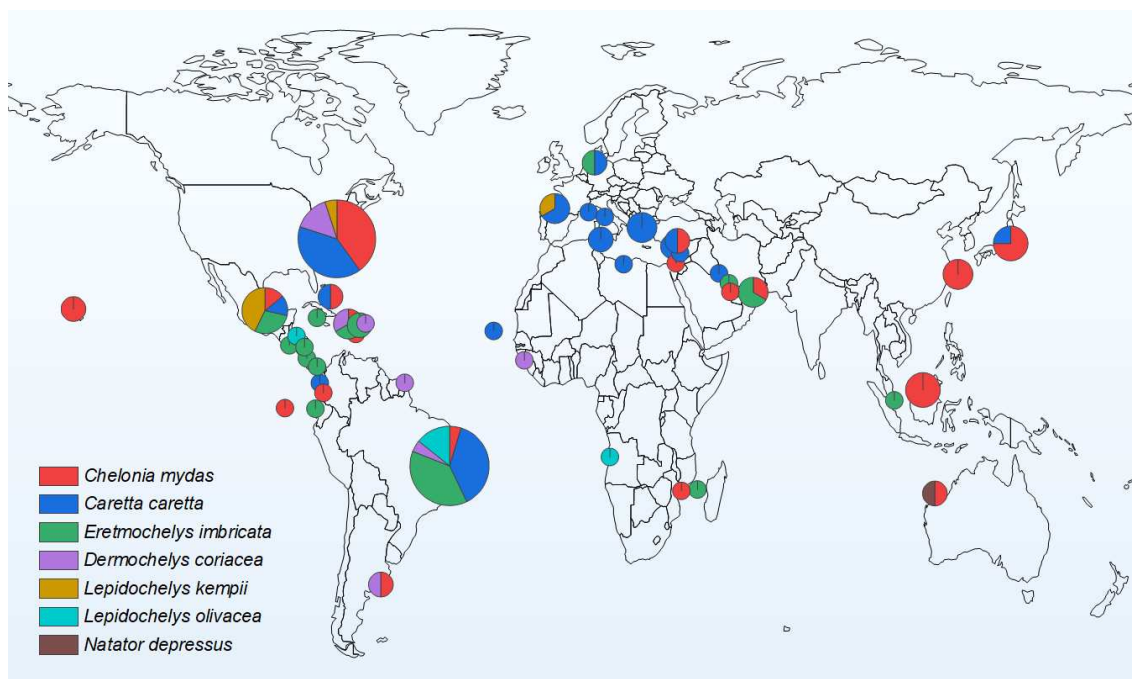
Sea turtles studies worldwide

We compiled 95 articles retrieved from scientific online platforms that covered studies on population genetics and phylogeography of all seven sea turtle species known worldwide. These articles were published between 2007 and 2022, and all of them specified the use of molecular analyses. Only studies in which the information about species and occurrence location are clear were considered for this survey. However, some research did not present clear information on specific points, such as the type of gene used for the amplification of the genetic material, the exact country in which the samples were collected or the type of tissue used for DNA extraction.

The articles analysed sea turtles recorded in 46 different countries, including. The continents that were most present in the studies were North America (n=27) and South America (n=18). The USA and Brazil were the countries most approached in the surveys.

The analyses indicate a predominance of studies about the genetics and phylogeography of sea turtles in the Atlantic Ocean (Fig. 1).

Figure 1 - Map of the reporting of sea turtle species, by sampling locations, registered in the literature.



Sea turtles are distributed worldwide in tropical waters. The Atlantic Ocean is an area of intense occurrence of species, in different stages of life and foraging behaviour (Hays *et al.*, 2006; Cantor *et al.*, 2020; Colman *et al.*, 2019). The site is also known as a refuge area for hatchlings during the period following emergence (a period known as the "lost years"). At this stage, the hatchlings are adrift at sea, being observed again only when they are young (Carr, 1987; Putman *et al.*, 2020).

Molecular analyses using mitochondrial DNA (mtDNA) indicate that the genetic structure of populations of *Caretta caretta* in the Atlantic Ocean is changing, requiring follow-up studies in the region. For *C. caretta*, the Atlantic Ocean proves to be a place of high complexity for genetic stocks and a complex network of migration paths

(Shamblin *et al.*, 2012b; LaCasella *et al.*, 2014; Naro-Maciel *et al.*, 2014). This complexity promotes high interest in investigative studies on the molecular genetics of Atlantic Sea turtle populations.

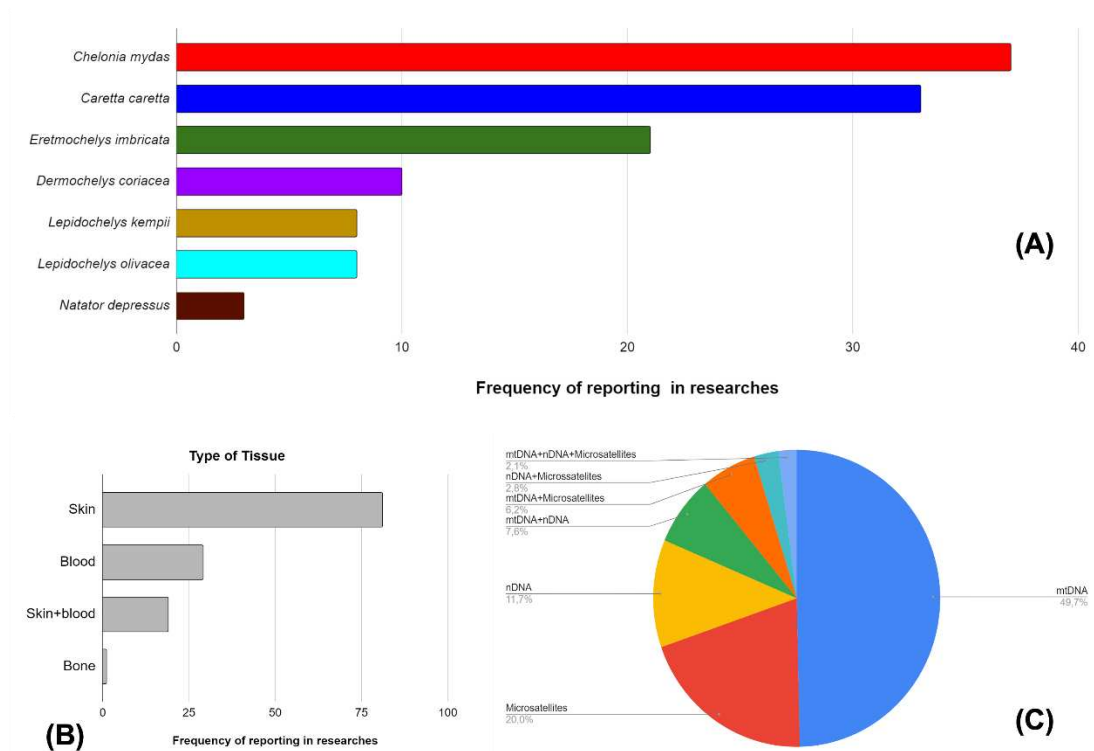
Our analyses indicate a prevalence of studies that included the species *C. caretta* (n=38), followed by *C. mydas* (n=34) and *E. imbricata* (n=25) (Fig. 2A). Studies revealed a high complexity of the genetic structure in *C. caretta*, with the occurrence of subpopulations, in addition to a correlation between foraging behaviour and genetic structure, indicating differences in location preference (Watanabe *et al.*, 2011).

The population of loggerhead (*C. caretta*) in the French Mediterranean, presents a complex diversity, in which different origins have been identified for different groups within this population, obtaining different and complex results with mitochondrial and nuclear analyses (Loisier *et al.*, 2021). Reports indicate hybridization of the species *C. caretta* and *E. imbricata* (Proietti *et al.*, 2014; Arantes *et al.*, 2020a).

It is possible that the large number of studies on loggerhead (*C. caretta*), green (*C. mydas*) and hawksbill (*E. imbricata*) sea turtles, are a consequence of the wide distribution of these species worldwide and of the reports of their hybridization. There is a well known connection between *C. mydas* foraging areas in Brazil and genetic evidence indicates that turtles from different regions share feeding areas, thus enabling greater connectivity between groups (Naro-Maciel *et al.*, 2007).

The sea turtle species share feeding and nesting areas. Evidence indicates that there is gene flow between species in different locations (Vilaça *et al.*, 2021; Roberts *et al.*, 2004). Genetic analyses of sea turtle populations are essential to fully understanding how gene flow occurs within the group, as well as the occurrence of subpopulations, new haplotypes and hybridization within and across populations (Vilaça *et al.*, 2012; Roden *et al.*, 2013; Arantes *et al.*, 2020b; Camacho-Sánchez *et al.*, 2022).

Figure 2 - Data summary panel: (A) frequency of reporting of sea turtles species according to literature, (B) frequency of reporting of type of sea turtles tissue used for molecular analyses, (C) percentage of reporting of type of genetic material used on molecular analyses.



METHODS FOR MOLECULAR ANALYSIS

Tissues used for DNA extraction

Four different tissues were reported for the extraction of DNA. Skin was the most frequent, as observed in Alstad *et al.* (2011), Arantes *et al.* (2020a), Brito *et al.* (2020) and Zhang *et al.* (2021) (Fig. 2B). “Muscle” was not frequently mentioned, but possibly some authors categorised this type of tissue as “skin/tissue”, not making it clear exactly which type of tissue was used. Blood was also a material used for the analyses, although much less frequently. Blood samples were used for the characterization of the complete mitochondrial genome, studies on hybridization impacts and characterization of molecular markers (Drosopoulou *et al.*, 2012; Dutton *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2018). Blood samples were not generally used for molecular analyses. This may be due to the fact that blood collections require laborious handling of live animals, and that some analyses with blood tissue must be performed promptly after collection, to avoid cell degradation. After collection, hematocrits are obtained by centrifuging the blood and are stored at 4°C (van de Merwe *et al.*, 2010), which is not always possible during field activities.

A study with *Lepidochelys kempii* compared the efficacy of blood samples, cheek swabs, cloacal swabs, tissue and dermal scales. The results showed that the quality of DNA obtained from blood and tissue was the same, with both techniques indicated for genetic studies (Stephens *et al.*, 2010). Collecting other tissue samples is generally more practical in the field than collecting blood, which requires much more specific training and more solid methodologies.

In a study carried out by Krestoff *et al.* (2021) was reported the use of bones for extracting DNA samples. The authors used bones from juvenile *L. kempii* between 1 and 2 years of age and obtained good quality of mtDNA sequences. This fact suggests a good alternative for molecular studies when there is no possibility of obtaining another type of tissue.

Non-invasive sampling has been used in various instances as a source for sea turtle DNA. Lanci *et al.* (2012) report the use of swabs with buccal and cloacal content to obtain samples for DNA extraction; even though the authors obtained good quality DNA, they still recommend extraction from tissues such as blood and skin to obtain high quality DNA. DNA extraction and analysis of microsatellite markers from eggshell samples of non-viable *C. caretta* hatchlings was efficient in terms of quantity and quality of genetic material (Shamblin *et al.*, 2011). Environmental DNA samples from sea turtles can also be extracted from the water and sand samples in nesting areas (Farrell *et al.*, 2022). The literature presents a good range of tissue possibilities for DNA extraction from sea turtles, all of them producing reliable results (Roden *et al.*, 2013; Proietti *et al.*, 2014; Bradshaw *et al.*, 2018). However, blood samples require greater storage and collection criteria, while bone samples demand a more complex methodology for cleaning and purifying the DNA after extraction. Skin seems to be the most versatile source of DNA, since it can be obtained from living or dead animals, at all life stages, with minimal animal discomfort.

Table 1. Sizes of fragments (bp) generated by PCR amplifications with corresponding mitochondrial targets, primers and molecular analyses

<i>Region</i>	<i>Species*</i>					
	<i>CM</i>	<i>CC</i>	<i>EI</i>	<i>DC</i>	<i>LO</i>	<i>LK</i>
<i>COI</i>						
<i>L-turtCOI/H-turtCOIc</i>	815					
<i>VF/VR</i>						624
<i>CONTROL REGION</i>						
<i>LTCM2/HDCM2</i>	457-481			496		
<i>LTCM1/HDCM1</i>	486-489					
<i>LCM15382/H950</i>	740-818	683-859	740-880	496-832	800-890	800
<i>LCM15382/CC443</i>		241-817				
<i>LCM15382/H599</i>		380				
<i>TCR5/TCR6</i>	380-396	380				
<i>CMD1 F/CMD5R</i>	200					
<i>LTEi9/H950</i>	800		740			
<i>TCR5/TCR6</i>	360					
<i>TCR6/L15926</i>			486			
<i>LTEi3/HDEi1</i>			550			
<i>L71/H599</i>		510				
<i>CMMTF1/TCR</i>	520					
<i>LTCM2/HDCM2</i>	481			496		
<i>HDCM-1/TCR5</i>		306				
<i>LCM15382/H950</i>	740-800	723-830	740-850	740	830-890	

<i>Ei9F/H95R</i>	800	
<i>TCR5/TCR6</i>	360	
16S		
<i>16SAR/16SBR</i>	550	
CYT-B		
<i>MT-NAD4F/MT-NAD4R</i>		371
STR		
<i>CM-D-1/CM-D-5</i>	400	

**CM*: *Chelonia mydas*; *CC*: *Caretta caretta*; *Ei*: *Eretmochelys imbricata*; *DC*: *Dermochelys coreacea*; *LO*: *Lepidochelys olivacea*; *LK*: *Lepidochelys kempii*

mtDNA and nDNA gene analyses

A high percentage of articles (65%) analysed mtDNA (Table 1) as the main methodology for genetic analysis. Of these, combinations of mtDNA and nuclear DNA analyses were used in 7% of the articles, and 6% combined mitochondrial and microsatellites markers, indicating interest in research through polymorphisms found in different species of sea turtles (Fig. 2C).

Mitochondrial sequences provide information on maternal lineages with no recombination and therefore the origins of different groups (Otálora *et al.*, 2018). They are also useful for species identification through barcode analysis (Camacho-Sánchez *et al.*, 2021).

The main amplified mitochondrial regions and the size of the respective fragments are shown in the table below. The only region that has been analysed in all species is the Control Region, specifically the fragment amplified by LCM15382/H950, which makes this region a strong candidate for identification and genetic comparison between species. Only one study in the data group carried out the complete sequencing of the mitochondrial genome, corresponding to *Caretta caretta*.

We observed a smaller variety of regions and primers for nuclear genes (Table 2), with no simultaneity of use between species for any of them. Specific data on the size of the fragment amplified with each gene in relation to different species was not provided. However, the CMOS, R35, RAG1, RAG2 and BDNF genes were used to amplify CM, EI, CC and LO samples (Brito *et al.*, 2020; Soares *et al.*, 2017; Vilaça *et al.*, 2012).

Table 2. Sizes of fragments (bp) generated by PCR amplifications with corresponding nuclear targets, primers and molecular analyses and the respective species used in the studies

<i>Region</i>	<i>Species*</i>						
	<i>CM</i>	<i>CC</i>	<i>EI</i>	<i>DC</i>	<i>LO</i>	<i>LK</i>	<i>ND</i>
<i>MHC</i>	162	162					
<i>CMOS</i>	x	601	601		x		
<i>RAG1</i>	x	x	368		x		
<i>RAG2</i>	x	x	620		x		
<i>R35</i>	x	x	439		x		
<i>BDNF</i>	x	x	559		x		
Other techniques							
<i>Microsatellite</i>	x	x	x	x	x	x	x
<i>SNP</i>	x						
<i>RFLP</i>	x						
<i>ddRAD</i>						x	

*CM: *Chelonia mydas*; CC: *Caretta caretta*; EI: *Eretmochelys imbricata*; DC: *Dermochelys coreacea*; LO: *Lepidochelys olivacea*; LK: *Lepidochelys kempii*; ND: *Natator depressus*

Use of highly polymorphic short tandem repeat (STR) markers for *C. mydas* revealed a genetic structure not previously found for the Mediterranean population, in addition to indicating novel migratory routes for the population (Tikochinski *et al.*, 2018). A study of sea turtle phylogenetics based on mitochondrial and nuclear genes shows similar results for both sets of markers (Naro-Maciel *et al.*, 2008). In contrast, a recent study indicated that *E. imbricata* individuals that had been identified both morphologically and by mtDNA analysis, showed evidence of hybridization with *C. caretta* when nuclear sequences were analysed (Brito *et al.*, 2020).

The combination of mtDNA and nDNA was also used to characterise the genetic diversity of different sea turtle populations in the Mediterranean, Turkey and Brazil (Yilmaz *et al.*, 2011; Garofalo *et al.*, 2013; Vilaça & Santos, 2013). This approach has similarly been used to investigate multiple paternity in *L. olivacea* in Honduras (Duran *et al.*, 2015). Thus, in complex genetic structures, with the occurrence of hybridism, gene flow and migratory behaviours, such as those found among sea turtles, it seems highly advisable to use methodologies that encompass both mitochondrial and nuclear regions, ensuring that no relevant genetic information is missing. The combination of both genetic markers has proven important for unravelling phylogenetic relationships and provided new perspectives on relationships between species, for example, on the position of *D. coriacea* within the genetic relationships of turtles (Deef, 2023).

The use of microsatellite markers was conspicuously abundant in sea turtle studies. This approach consists of genotyping mainly anonymous nuclear loci characterised by the presence of short tandem repeats (STR) of two, three or four nucleotides. Specific primers that allow amplification of 12 microsatellite loci in *C. mydas* from Hawaii have been described (Dutton & Frey, 2009). Microsatellite markers have also been described for *L. olivacea* (Aggarwal *et al.*, 2008), *E. imbricata* (Lin *et al.*, 2008; Miro-Herrans *et al.*, 2008) and *C. caretta* (Shamblin *et al.*, 2007).

The identification of microsatellite markers enables studies of population, kinship, reproductive and migratory behaviour of sea turtles. Inbreeding identification and cross-amplification tests were successfully performed for *C. mydas* using microsatellite markers (Dolfo *et al.*, 2023).

The genetic structure of populations of *E. imbricata* (Mostafavi *et al.*, 2011), *C. mydas* (Roden *et al.*, 2013) and *D. coriacea* (Dutton *et al.*, 2013), were also studied using microsatellite analyses. Tetranucleotide microsatellite loci have been described for *C. caretta* (Shamblin *et al.*, 2007, 2009) and *D. coriacea* (Alstad *et al.*, 2011). Co-dominant and selectively neutral molecular markers, such as microsatellites, are effective in studies on the level of variability between species in temporal and geographic contexts, including the philopatric behaviour of the group (Bradshaw *et al.*, 2018).

Hybrid identification

Hybridism in sea turtles has not been widely studied yet. On the Brazilian coast, there is a high level of hybridization between hawksbill and loggerhead turtles (Lara-Ruiz *et al.*, 2006; Proietti *et al.*, 2014; Arantes *et al.*, 2020a). Crossings between loggerhead and olive ridley also occur frequently (Soares *et al.*, 2017). It is possible that there is significant gene exchange between *C. caretta* and *E. imbricata* in the region (Arantes *et al.*, 2020b) which is an important migration, foraging and spawning route for five species of sea turtles. The high rates of hybridism observed to date indicate an important complexity of gene flow between species.

Molecular investigations based on mtDNA alone are insufficient to identify hybridization, given that information on paternal DNA is lacking. The maternal genetic signature may coincide with the morphology of the animal, masking a possible hybrid occurrence. Thus, studies with a combination of mtDNA and nDNA are indicated to obtain a more complete information about the genetics of populations (Brito *et al.*, 2020).

The behaviour of hybrid individuals may be different from their parent species, likely causing some kind of ecological imbalance in the dynamics of groups (Proietti *et al.*, 2014). Hybrid hatchlings have shown potential in their development, with no indication of a decline in eclosion success (Soares *et al.*, 2018). A study identified turtle hybrids in Abrolhos (Brazil), an area where this phenomenon was not previously reported, likely leading to a decrease in the reproductive success of the group (Arantes *et al.*, 2020a).

As these are complex populations that are in constant gene flow and migration, the authors encourage further studies on sea turtle populations, requiring a complete approach with mtDNA and nDNA. Monitoring and government conservation actions are also necessary, in order to instigate investigations of the problem around the world.

Next generation sequencing (NGS) and Restriction site Associated DNA sequencing (RADseq).

Phylogeny and characterization studies of hybrid animals were carried out using NGS, indicating that the technique brings significant advances in solving genetic problems in the group.

NGS has also made important contributions to the ecological studies of sea turtle populations. NGS was used to address aspects related to population studies of hybrid animals and investigation into paternity of multiple species, including fitness analyses. A study did not indicate negative impacts when they compared hatchling production rate per nest and viability of hybrid hatchling and parental species, when they investigated only the first generation of hybrids (F1) (Soares *et al.*, 2018).

Arantes *et al.*, 2020b, analysed population structure, identifying polymorphic sites and inter and intraspecific relationships. This study indicates that there is a male-mediated gene flow that connects populations of loggerhead and hawksbill turtles on the Brazilian coast, with the occurrence of second-generation hybrids (F2). However, the authors conclude that F2 hatchling female hybrids may not survive to adulthood or be less fertile

The ddRAD-seq technique is a powerful tool that does not require a reference genome and provides sequences from a sample of loci from across the genome. Microsatellites were identified in ddRAD sequences from *Lepidochelys kempii*, which provides additional material to be used in genetics and conservation research of the group (Hurtado *et al.*, 2016). Furthermore, ddRAD has been used in assays investigating hybridization and introgression patterns, in which the results indicate cytonuclear incompatibility, resulting in a population decline in future generations (Vilaça *et al.*, 2023).

Arantes *et al.* (2020a) used the 3RAD (triple-enzyme RADseq) protocol to investigate sea turtles from the Brazilian coast and identified the backcrossing of F1 hybrids and loggerhead turtles. This protocol works as efficiently as other RADseq analyses. However, a lower concentration of DNA is required, with lower initial costs, and can be pooled with other Illumina libraries (Bayona-Vásquez *et al.*, 2019).

Final considerations

In the past 15 years, studies on the population genetics and phylogeography of sea turtles based on DNA molecular data have provided significant advances in the knowledge of these endangered species, promoting a better understanding of their biology and providing a basis for the implementation of effective conservation measures. Although numerous articles have mostly made use of mtDNA sequences, recent studies highlight the importance of assessing nuclear as well as mitochondrial genetic information. Highly variable codominant markers, such as microsatellites, seem able to provide the highest amount of information possible, except for full genomic studies, possibly. The consensus is the use of microsatellites. This is a good strategy for various purposes in population genetics, relatively practical and more affordable because it is well established. Although there are more modern techniques, such as ddRAD and NGS.

Molecular assays to detect the genetic inheritance of two parental species of sea turtles were recently performed using (RAD-seq) and next generation sequencing (NGS) analysis. The results show a possible reduction in the success of hybrid offspring, caused by nuclear incompatibility (Vilaça *et al.*, 2023). The new molecular studies show important techniques that can be used to answer questions about the future of sea turtle species.

The reviewed studies report important discoveries about the genetics of sea turtle populations, especially in the Atlantic Ocean. The high complexity of the genetic composition of the Atlantic populations, the high rates of gene flow and the diversity of migratory routes, point to the need for continued studies in the area, including the combination of different techniques using mitochondrial and nuclear genes. Careful attention should be paid to the Mediterranean, which has been the subject of fewer sea turtle studies.

The occurrence of hybrids must be approached with the highest attention and urgency due to the indications of the appearance of hybrid individuals in regions where they were not found before. Efforts need to be made to minimise the impacts suffered by the sea turtles, which are quite vulnerable to the environmental changes that have occurred at a rapid rate in recent years. Countries that register sea turtles and their hybrids must have policies that value the preservation of their coasts and consider strategies to mitigate the problem of hybridism, a problem for which the causes are yet to be identified and fully understood.

Finally, we reinforce the importance of using methodologies that are less invasive for the animals. Knowledge about more effective methodologies in chelonian studies will help foster molecular biology studies aimed at obtaining results that can be directly applied to the conservation of all sea turtles.

REFERENCES

- Aggarwal, R.K., Lalremruata, A., Velavan, T.P., Sowjanya, A.P. & Singh, L. (2008). Development and characterization of ten novel microsatellite markers from olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Conservation Genetics*, 9(4), 981–984.
- Alstad, T.I., Shamblin, B.M., Bagley, D.A., Ehrhart, L.M. & Nairn, C.J. (2011). Isolation and characterization of tetranucleotide microsatellites from the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *Conservation Genetics Resources*, 3(3), 457–460.
- Arantes, L.S., Ferreira, L.C.L., Driller, M., Repinaldo-Filho, F.P.M., Mazzoni, C.J. & Santos, F.R. (2020a). Genomic evidence of recent hybridization between sea turtles at Abrolhos Archipelago and its association to low reproductive output. *Scientific Reports*, 10(1), 12847.
- Arantes, L.S., Vilaça, S.T., Mazzoni, C.J. & Santos, F.R. (2020b). New genetic insights about hybridization and population structure of hawksbill and loggerhead turtles from Brazil. *Journal of Heredity*, 111(5), 444–456.
- Arthur, K.E., Boyle, M.C. & Limpus, C.J. (2008). Ontogenetic changes in diet and habitat use in green sea turtle (*Chelonia mydas*) life history. *Marine Ecology Progress Series*, 362, 303–311.

- Barley, A.J., Spinks, P.Q., Thomson, R.C. & Shaffer, H.B. (2010). Fourteen nuclear genes provide phylogenetic resolution for difficult nodes in the turtle tree of life. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(3), 1189–1194.
- Bayona-Vásquez, N. J., Glenn, T. C., Kieran, T. J., Pierson, T. W., Hoffberg, S. L., Scott, P. A., ... & Faircloth, B. C. (2019). Adapterama III: Quadruple-indexed, double/triple-enzyme RADseq libraries (2RAD/3RAD). *PeerJ*, 7, e7724.
- Bowen, B.W. & Karl, S.A. (2007). Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology*, 16(23), 4886–4907.
- Boyle, M.C., FitzSimmons, N.N., Limpus, C.J., Kelez, S., Velez-Zuazo, X. & Waycott, M. (2009). Evidence for transoceanic migrations by loggerhead sea turtles in the southern Pacific Ocean. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1664), 1993–1999.
- Bradshaw, P.J., Broderick, A.C., Carreras, C., Fuller, W., Snape, R.T.E., Wright, L.I. & Godley, B.J. (2018). Defining conservation units with enhanced molecular tools to reveal fine scale structuring among Mediterranean green turtle rookeries. *Biological Conservation*, 222, 253–260.
- Brito, C., Vilaça, S.T., Lacerda, A.L., Maggioni, R., Marcovaldi, M.Â., Vélez-Rubio, G. & Proietti, M.C. (2020). Combined use of mitochondrial and nuclear genetic markers further reveal immature marine turtle hybrids along the South Western Atlantic. *Genetics and Molecular Biology*, 43(2), 1–11.
- Camacho-Sánchez, F.Y., Narváez-Zapata, J.A., Acosta-Sánchez, H.H., López-Hernández, M., Luzariaga-Neira, A., Rodríguez-González, H., Aguirre, A.A. & Reyes-López, M.A. (2022). Molecular Identification and Novel Mitochondrial COI Gene Haplotypes of Nesting Kemp's Ridley Turtles (*Lepidochelys kempii*) in Rancho Nuevo Sanctuary, Mexico. *Diversity*, 14(5), 390.
- Camacho-Sánchez, F.Y., Aguirre, A.A., Narváez-Zapata, J.A., Zavala-Norzagaray, A.A., Ley-Quinónez, C.P., Acosta-Sánchez, H.H., Rodríguez-González, H., Delgado-Trejo, C. & Reyes-López, M.A. (2021). DNA barcode analysis of the endangered green turtle (*Chelonia mydas*) in Mexico. *Genome*, 64(9), 879–891.
- Cantor, M., Barreto, A.S., Taufer, R.M., Giffoni, B., Castilho, P.V., Maranhão, A., Beatriz, C., Kolesnikovas, C., Godoy, D., Rogério, D.W., Dick, J.L., Groch, K.R.,

- Rosa, L., Cremer, M.J., Cattani, P.E., Valle, R.R. & Domit, C. (2020). High incidence of sea turtle stranding in the southwestern Atlantic Ocean. *ICES Journal of Marine Science*, 77(5), 1864-1878.
- Carr, A. (1987). New Perspectives on the Pelagic Stage of Sea Turtle Development. *Conservation Biology*, 1(2). <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.1987.tb00020.x>.
- Chow, J.C., Anderson, P.E. & Shedlock, A.M. (2019). Sea Turtle Population Genomic Discovery: Global and Locus-Specific Signatures of Polymorphism, Selection, and Adaptive Potential. *Genome Biology and Evolution*, 11(10), 2797–2806.
- Colman, L.P., Thomé, J.C.A., Almeida, A.P., Baptistotte, C., Barata, P.C.R., Broderick, A.C., Ribeiro, F.A., Vila-Verde, L. & Godley, B.J. (2019). Thirty years of leatherback turtle *Dermochelys coriacea* nesting in Espírito Santo, Brazil, 1988-2017: reproductive biology and conservation. *Endangered Species Research*, 39, 147-158.
- Deef, L.E.M. (2023) Molecular phylogenetics of some endangered turtles reveals new close genetic relationships. *International Journal of Biology and Chemistry*, 16(1), 17-32.
- Dolfo, V., Boissin, E., Tatarata, M. & Planes, S. (2023). Characterization of 25 new microsatellite markers for the green turtle (*Chelonia mydas*) and cross-species amplification in other marine turtle species. *Molecular Biology Reports*, 50, 4145–4154.
- Drosopoulou, E., Tsiamis, G., Mavropoulou, M., Vittas, S., Katselidis, K.A., Schofield, G., Palaiologou, D., Sartsidis, T., Bourtzis, K., Pantis, J. & Scouras, Z.G. (2012). The complete mitochondrial genome of the loggerhead turtle *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae): Genome description and phylogenetic considerations. *Mitochondrial DNA*, 23(1), 1–12.
- Duran, N., Dunbar, S.G., Escobar, R.A. & Standish, T.G. (2015). High frequency of multiple paternity in a solitary population of olive ridley sea turtles in Honduras. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 463, 63–71.
- Dutton, P.H., Roden, S.E., Stewart, K.R., LaCasella, E., Tiwari, M., Formia, A., Thomé, J. C., Livingstone, S.R., Eckert, S., Chacon-Chaverri, D., Rivalan, P. & Allman, P. (2013). Population stock structure of leatherback turtles (*Dermochelys*

coriacea) in the Atlantic revealed using mtDNA and microsatellite markers. *Conservation Genetics*, 14(3), 625–636.

Dutton, P.H. & Frey, A. (2009). Characterization of polymorphic microsatellite markers for the green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 354–356.

Farrell, J.A., Whitmore, L., Mashkour, N., Rollinson-Ramia, D.R., Thomas, R.S., Eastman, C.B., Burkhalter, B., Yetsko, K., Mott, C., Wood, L., Zirkelbach, B., Meers, L., Kleinsasser, P., Stock, S., Libert, E., Herren, R., Eastman, S., Crowder, W., Boverly, C., Anderson, D., Godfrey, D., Condrón, N. & Duffy, D. J. (2022). Detection and population genomics of sea turtle species via noninvasive environmental DNA analysis of nesting beach sand tracks and oceanic water. *Molecular Ecology Resources*, 22(7), 2471–2493.

Garofalo, L., Mastrogiacomo, A., Casale, P., Carlini, R., Eleni, C., Freggi, D., Gelli, D., Knittweis, L., Mifsud, C., Mingozi, T., Novarini, N., Scaravelli, D., Scillitani, G., Oliverio, M. & Novelletto, A. (2013). Genetic characterization of central Mediterranean stocks of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) using mitochondrial and nuclear markers, and conservation implications. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 23(6), 868–884.

Hays, G.C., Hobson, V.J., Metcalfe, J.D., Righton, D. & Sims, D.W. (2006). Flexible foraging movements of leatherback turtles across the North Atlantic Ocean. *Ecology*, 87(10), 2647–2656.

IUCN (2022). Sea turtle. IUCN Red List of Threatened Species. Downloaded on 9 July 2023.

<https://www.iucnredlist.org/search?query=sea%20turtle&searchType=species>.

Krestoff, E.S., Creecy, J.P., Lord, W.D., Haynie, M.L., Coyer, J.A. & Sampson, K. (2021). Mitochondrial DNA Evaluation and Species Identification of Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempii*) Bones After a 3-Year Exposure to Submerged Marine and Terrestrial Environments. *Frontiers in Marine Science*, 8, 646455.

LaCasella, E.L., Epperly, S.P., Jensen, M.P., Stokes, L. & Dutton, P.H. (2014). Genetic stock composition of loggerhead turtles *Caretta caretta* bycaught in the pelagic waters of the North Atlantic. *Endangered Species Research*, 22(1), 73–84.

- Lanci, A.K.J., Roden, S.E., Bowman, A., Lacasella, E.L., Frey, A. & Dutton, P.H. (2012). Evaluating Buccal and Cloacal Swabs for Ease of Collection and Use in Genetic Analyses of Marine Turtles. *Chelonian Conservation and Biology*, 11(1), 144–148.
- Lin, G., Chang, A., Yap, H.W. & Yue, G.H. (2008). Characterization and cross-species amplification of microsatellites from the endangered Hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*). *Conservation Genetics*, 9(4), 1071–1073.
- Lara-Ruiz, P., Lopez, G.G., Santos, F.R. & Soares, L.S. (2006). Extensive hybridization in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. *Conservation Genetics*, 7(5), 773–781.
- Loisier, A., Savelli, M.P., Arnal, V., Claro, F., Gambaiani, D., S  n  gas, J.B., Cesarini, C., Sacchi, J., Miaud, C. & Montgelard, C. (2021). Genetic composition, origin and conservation of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) frequenting the French Mediterranean coasts. *Marine Biology*, 168(52), 1-15.
- Mancino, C., Canestrelli, D. & Maiorano, L. (2022). Going west: Range expansion for loggerhead sea turtles in the Mediterranean Sea under climate change. *Global Ecology and Conservation*, 38, e02264.
- McClellan, C. M. & Read, A.J. (2007). Complexity and variation in loggerhead sea turtle life history. *Biology Letters*, 3(6), 592–594.
- Miro-Herrans, A.T., Velez-Zuazo, X., Acevedo, J.P. & McMillan, W.O. (2008). Isolation and characterization of novel microsatellites from the critically endangered hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*). *Molecular Ecology Resources*, 8(5), 1098–1101.
- Mostafavi, P.G., Shahnava  , S., Noroozi, M., Fatemi, M.R., Shahhosseiny, M.H. & Mahvari, A. (2011). Population genetic of *Eretmochelys imbricata* in two Islands in the northern part of the Persian Gulf using microsatellite markers. *Journal of Marine Science and Engineering*, 1, 69-73.
- Naguib, N.M., Yousef, S.S., El-Sharkawy, A., Moghaieb, R.E., Temraz, T.A. & Khashaba, E.H.K. (2022). Genetic polymorphism between and within Mediterranean and Red Sea populations of the green turtle (*Chelonia mydas*) as revealed by

sequence-related amplified polymorphism (SRAP). *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 26(2), 1–16.

Naro-Maciel, E., Reid, B.N., Alter, S.E., Amato, G., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Martin, M., Nairn, C.J., Shamblin, B. & Pineda-Catalan, O. (2014). From refugia to rookeries: Phylogeography of Atlantic green turtles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 461, 306–316.

Naro-Maciel, E., Reid, B., Fitzsimmons, N.N., Le, M., Desalle, R. & Amato, G. (2010). DNA barcodes for globally threatened marine turtles: A registry approach to documenting biodiversity. *Molecular Ecology Resources*, 10(2), 252–263.

Naro-Maciel, E., Le, M., FitzSimmons, N.N. & Amato, G. (2008). Evolutionary relationships of marine turtles: A molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(2), 659–662.

Naro-Maciel, E., Becker, J.H., Lima, E.H.S.M., Marcovaldi, M.Â. & DeSalle, R. (2007). Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. *Journal of Heredity*, 98(1), 29–39.

Otálora, K., Hernández-Fernández, J., Carlos Salcedo-Reyes, J., Otálora, K., Hernández-Fernández, J. & Salcedo-Reyes, C.J. (2018). Complete Colombian Caribbean loggerhead turtle mitochondrial genome: tRNA structure analysis and revisited marine turtle phylogeny. *Universitas Scientiarum*, 23(3), 355–381.

Proietti, M.C., Reisser, J., Marins, L.F., Marcovaldi, M.A., Soares, L.S., Monteiro, D.S., Wijeratne, S., Pattiaratchi, C. & Secchi, E. R. (2014). Hawksbill × loggerhead sea turtle hybrids at Bahia, Brazil: Where do their offspring go?. *PeerJ*, 2, e255.

Putman, N.F., Seney, E.E., Verley, P., Shaver, D.J., López-Castro, M.C., Cook, M., Guzmán, V., Brost, B., Ceriani, S.A., Mirón, R.J.G.D., Peña, L.J., Tzeek, M., Valverde, R.A., Cantón, C.C.G., Howell, L., Ley, J.A.R., Tumlin, M.C., Teas, W.G., Caillouet-Jr, C.W., Cuevas, E., Gallaway, B.J., Richards, P.M. & Mansfield, K.L. (2020). Predicted distributions and abundances of the sea turtle ‘lost years’ in the western North Atlantic Ocean. *Ecography*, 43(4), 506–517.

Rivas, M.L., Rodríguez-Caballero, E., Esteban, N., Carpio, A.J., Barrera-Vilarmau, B., Fuentes, M.M.P.B., Robertson, K., Azanza, J., León, Y. & Ortega, Z. (2023).

Uncertain future for global sea turtle populations in face of sea level rise. *Scientific Reports*, 13(1), 1–8.

Roberts, M.A., Schwartz, T.S. & Karl, S.A. (2004). Global Population Genetic Structure and Male-Mediated Gene Flow in the Green Sea Turtle (*Chelonia mydas*): Analysis of Microsatellite Loci. *Genetics*, 166(4), 1857–1870.

Roden, S.E. & Dutton, P.H. (2011). Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci in the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) and cross-species amplification. *Conservation Genetics Resources*, 3(1), 49–52.

Roden, S.E., Morin, P.A., Frey, A., Balazs, G.H., Zarate, P., Cheng, I.J. & Dutton, P.H. (2013). Green turtle population structure in the Pacific: New insights from single nucleotide polymorphisms and microsatellites. *Endangered Species Research*, 20(3), 227–234.

Santidrián-Tomillo, P., Fonseca, L.G., Ward, M., Tankersley, N., Robinson, N.J., Orrego, C.M., Paladino, F.V. & Saba, V.S. (2020). The impacts of extreme El Niño events on sea turtle nesting populations. *Climatic Change*, 159(2), 163–176.

Shamblin, B.M., Bjørndal, K.A., Bolten, A.B., Hillis-Starr, Z.M., Lundgren, I., Naro-Maciel, E. & Nairn, C.J. (2012a). Mitogenomic sequences better resolve stock structure of southern Greater Caribbean green turtle rookeries. *Molecular Ecology*, 21(10), 2330–2340.

Shamblin, B.M., Bolten, A.B., Bjørndal, K.A., Dutton, P.H., Nielsen, J.T., Abreu-Grobois, F. A., Reich, K.J., Witherington, B.E., Bagley, D.A., Ehrhart, L.M., Tucker, A.D., Addison, D.S., Arenas, A., Johnson, C., Carthy, R.R., Lamont, M.M., Dodd, M.G., Gaines, M.S., LaCasella, E. & Nairn, C.J. (2012b). Expanded mitochondrial control region sequences increase resolution of stock structure among North Atlantic loggerhead turtle rookeries. *Marine Ecology Progress Series*, 469, 145–160.

Shamblin, B.M., Dodd, M.G., Williams, K.L., Frick, M.G., Bell, R., & Nairn, C. J. (2011). Loggerhead turtle eggshells as a source of maternal nuclear genomic DNA for population genetic studies. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 110–115.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02910.x>

Shamblin, B.M., Faircloth, B.C., Dodd, M.G., Bagley, D.A., Ehrhart, L.M., Dutton, P.H., Frey, A. & Nairn, C.J. (2009). Tetranucleotide markers from the loggerhead sea

turtle (*Caretta caretta*) and their cross-amplification in other marine turtle species. *Conservation Genetics*, 10(3), 577–580.

Shamblin, B.M., Faircloth, B.C., Dodd, M., Wood-Jones, A., Castleberry, S.B., Carroll, J. P. & Nairn, C.J. (2007). Tetranucleotide microsatellites from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology Notes*, 7(5), 784–787.

Soares, L.S., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., dei Marcovaldi, M.A.G., Luz, P.B., Machado, R., Lo, R., McDaniel, S.F., Payton, A.C., Waltzek, T.B. & Wayne, M.L. (2018). Effects of hybridization on sea turtle fitness. *Conservation Genetics*, 19(6), 1311–1322.

Soares, L.S., Bolten, A.B., Wayne, M.L., Vilaça, S.T., Santos, F.R., dei Marcovaldi, M.A. G. & Bjorndal, K.A. (2017). Comparison of reproductive output of hybrid sea turtles and parental species. *Marine Biology*, 164, 1-10.

Stephens, S.H., White, V.C. & Alvarado Bremer, J.R. (2010). Assessment of Genetic Tissue Sampling Methods for the Critically Endangered Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempii*). *Marine Turtle Newsletter*, 128, 19-23.

Tikochinski, Y., Bradshaw, P., Mastrogiacomo, A., Broderick, A., Daya, A., Demetropoulos, A., Demetropoulos, S., Eliades, N.G., Fuller, W., Godley, B., Kaska, Y., Levy, Y., Snape, R., Wright, L. & Carreras, C. (2018). Mitochondrial DNA short tandem repeats unveil hidden population structuring and migration routes of an endangered marine turtle. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(4), 788–797.

van de Merwe, J.P., Hodge, M., Olszowy, H.A., Whittier, J.M., & Lee, S.Y. (2010). Using blood samples to estimate persistent organic pollutants and metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Marine Pollution Bulletin*, 60(4), 579–588.

Vilaça, S. T., Maroso, F., Lara, P., de Thoisy, B., Chevallier, D., Arantes, L. S., Santos, F. R., Bertorelle, G., & Mazzoni, C. J. (2023). Evidence of backcross inviability and mitochondrial DNA paternal leakage in sea turtle hybrids. *Molecular Ecology*, 32(3). <https://doi.org/10.1111/mec.16773>

Vilaça, S.T., Hahn, A.T., Naro-Maciel, E., Abreu-Grobois, F.A., Bowen, B.W., Castilhos, J.C., Ciofi, C., FitzSimmons, N.N., Jensen, M.P., Formia, A., Limpus, C.J., Natali, C., Soares, L.S., Thoisy, B., Whiting, S.D. & Bonatto, S.L. (2022). Global

phylogeography of ridley sea turtles (*Lepidochelys* spp.): evolution, demography, connectivity, and conservation. *Conservation Genetics*, 23(6), 995–1010.

Vilaça, S.T., Piccinno, R., Rota-Stabelli, O., Gabrielli, M., Benazzo, A., Matschiner, M., Soares, L.S., Bolten, A.B., Bjørndal, K.A. & Bertorelle, G. (2021). Divergence and hybridization in sea turtles: Inferences from genome data show evidence of ancient gene flow between species. *Molecular Ecology*, 30(23), 6178-6192.

Vilaça, S.T. & Santos, F.R. (2013). Molecular Data for the Sea Turtle Population in Brazil. *Dataset Papers in Science*, 2013, 1–7.

Vilaça, S.T., Vargas, S.M., Lara-Ruiz, P., Molfetti, É., Reis, E.C., Lôbo-Hajdu, G., Soares, L.S. & Santos, F.R. (2012). Nuclear markers reveal a complex introgression pattern among marine turtle species on the Brazilian coast. *Molecular Ecology*, 21(17), 4300–4312.

Watanabe, K.K., Hatase, H., Kinoshita, M., Omuta, K., Bando, T., Kamezaki, N., Sato, K., Matsuzawa, Y., Goto, K., Nakashima, Y., Takeshita, H., Aoyama, J. & Tsukamoto, K. (2011). Population structure of the loggerhead turtle *Caretta caretta*, a large marine carnivore that exhibits alternative foraging behaviors. *Marine Ecology Progress Series*, 424, 273–283.

Yilmaz, C., Turkoz, O. & Bardakci, F. (2011). Genetic structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) populations in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(4–6), 266–276.

Zhang, T., Lin, L., Gaillard, D., Chen, F., Chen, H., Li, M., Wu, S., Wang, Z. & Shi, H. (2021). Rapid authenticity testing of artificially bred green turtles (*Chelonia mydas*) using microsatellite and mitochondrial DNA markers. *PeerJ*, 9, e12410.

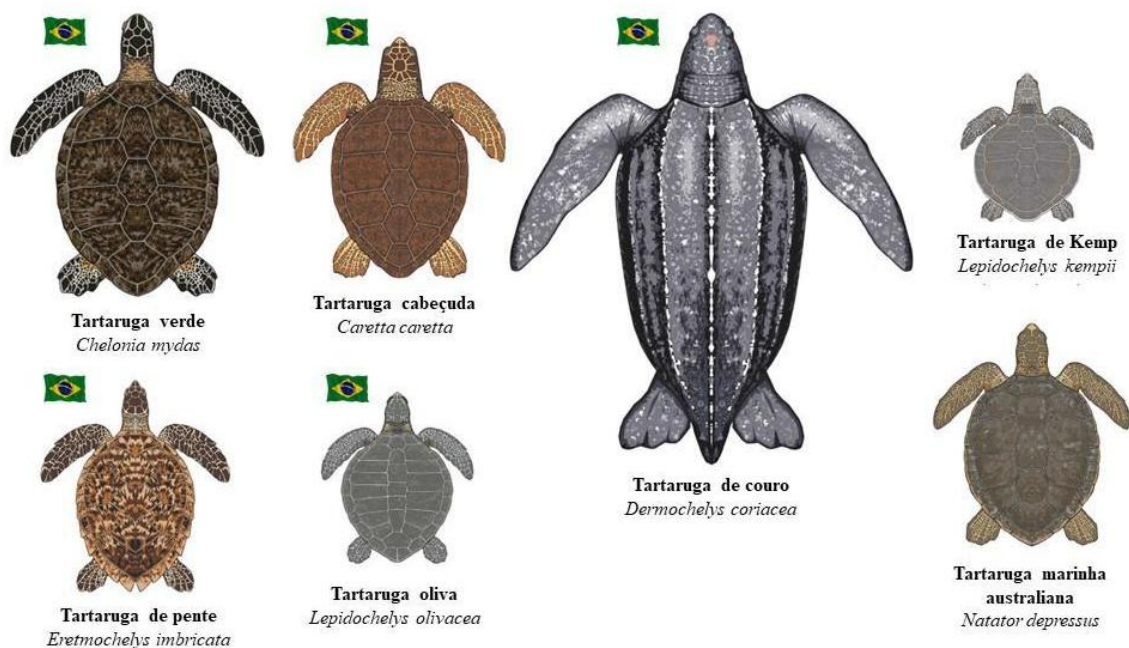
3 ESTUDOS GENÉTICOS E FILOGEOGRAFIA DE TARTARUGAS MARINHAS

3.1 Revisão de literatura

3.1.1 Tartarugas marinhas: um breve resumo sobre suas principais características e distribuição

Tartarugas marinhas são répteis, pertencentes a ordem Testudines e estão divididas em sete espécies e duas famílias: Cheloniidae, cujos representantes são *Chelonia mydas* (Tartaruga verde), *Caretta caretta* (Tartaruga cabeçuda), *Eretmochelys imbricata* (Tartaruga de pente), *Lepidochelys olivacea* (Tartaruga oliva), *Lepidochelys kempii* (Tartaruga de kempii), *Natator depressus* (Tartaruga marinha australiana) e a família Dermochelidae, que possui apenas uma espécie representante: *Dermochelys coriacea* (Tartaruga de couro) (Meylan; Meylan, 1999) (Figura 1).

Figura 1 – Espécies de tartarugas marinhas



FONTE: Adaptado de Turtle Foundation, disponível em <https://www.turtle-foundation.org/en/sea-turtles/>.

As tartarugas marinhas têm sido símbolo de lutas e estratégias em prol da conservação. Elas são espécies bandeiras que mediam discussões sobre o assunto e o interesse pela conservação das espécies servindo de pauta para a existência de projetos que visam a conservação da fauna marinha (Frazier, 2005; Marcovaldi; Dei Marcovaldi, 1999).

As sete espécies são distribuídas circunglobalmente, sendo prioritariamente encontradas em áreas tropicais (Figura 2). No entanto, há o registro de ocorrência de população em todos os oceanos, incluindo regiões temperadas (Reis; Goldberg, 2017).

A espécie *Natator depressus* possui uma região de distribuição mais restrita do que as demais, com sua ocorrência ligada a Oceania, com um alto padrão de filopatria para a região. Existem haplótipos compartilhados com outras regiões vizinhas, sendo observada uma conectividade entre as áreas de alimentação (Fitzsimmons *et al.*, 2020).

L. kempii tem sua área de nidificação estabelecida preferencialmente no Golfo do México e devido a este fato, esforços devem ser feitos para que haja um acompanhamento do rumo evolutivo que a espécie está seguindo, o qual parece se manter estável quanto a diversidade genética, embora haja a identificação de declínio populacional (Frandsen; Figueroa; George, 2019)

C. mydas é uma espécie altamente migratória e possui conectividade genética entre as áreas de alimentação, com um compartilhamento de haplótipos entre populações do oceano Índico e Pacífico. Essas regiões aparentam ser *hotspots* para a espécie, sendo necessários esforços para manter a preservação desses locais assegurando a existência futura da espécie (Jensen *et al.*, 2019).

A tartaruga cabeçuda é amplamente distribuída. Possui áreas de alimentação no México (Plotkin; Wicksten; Amos, 1993), Oceano Pacífico (Seminoff *et al.*, 2004) e intensos registros na região do Mar Mediterrâneo (Camedda *et al.*, 2014; Lucchetti; Sala, 2010). Para a espécie, existe um fluxo gênico entre populações dos oceanos Atlântico e Indo-Pacífico, com áreas de alimentação compartilhadas entre esses dois oceanos, indicando uma complexidade na estrutura populacional, inferindo uma alta capacidade de adaptação a diferentes habitats (Bowen *et al.*, 1995; Carreras *et al.*, 2011; Nihonmatsu-Cho, 1994). As áreas de desova também são amplamente distribuídas. Existem registros de desovas regulares ocorrendo na Itália (Mingozzi *et*

al., 2006), e Brasil, e destaca-se um comportamento de filopatria no nordeste brasileiro, um indicativo de fidelização em áreas de desova na região (Baptistotte *et al.*, 2003).

A tartaruga de pente (*E. imbricata*) possui uma área de desova importante no litoral do nordeste brasileiro, incluindo os estados do Rio Grande do Norte e Bahia (Marcovaldi *et al.*, 2012; Marcovaldi; Vieitas; Godfrey, 1999; Santos *et al.*, 2013). Regiões constantes de desovas também são encontradas no Havaí (Gaos *et al.*, 2021) e Caribe, sendo esta última também registrada como importante área de forrageio para a espécie (Maurer *et al.*, 2022).

A tartaruga oliva é uma espécie altamente cosmopolita e com altos índices de predação (Cáceres-Farias *et al.*, 2022). A espécie possui um comportamento de desovas em massa, as chamadas “*arribadas*” (Plotkin *et al.*, 1997), caracterizadas por uma agregação de fêmeas no momento da saída da água para realizarem suas desovas. Desse modo, milhares de ovos são depositados em uma mesma noite em uma única praia. (Plotkin *et al.*, 1997). Esse comportamento é especialmente registrado na Costa Rica (Fonseca *et al.*, 2023) e devido às altas densidades de ovos depositados, há uma intensa predação dessas ninhadas por humanos (Ruthig; Gramera, 2019).

O Golfo do México aparece como sendo uma área de alta importância para a tartaruga de couro (*D. coriacea*) (Evans *et al.*, 2021). A costa do Uruguai foi relatada como uma área de intensa ocorrência da espécie, sendo considerada uma área estabelecida de forrageio (Vélez-Rubio *et al.*, 2023) Quanto as desovas, a espécie foi registrada nidificando em praias do sudeste do Brasil e também há área de desova descrita no Piauí (Colman *et al.*, 2019) e Guiné Equatorial, este sendo considerado um *hotspot* para a espécie (Garzon *et al.*, 2023).

Uma característica importante do ciclo de vida das tartarugas marinhas é a alternância de habitat durante suas fases de vida. Desse modo, estudos que tratem de aspectos como conservação, filogeografia e genética, devem levar em consideração o complexo ciclo de vida desses animais. Esse grau de complexidade impede por muitas vezes que alguns estudos sejam realizados, ficando algumas áreas descobertas de conhecimento sobre o grupo (Reis; Goldberg, 2017).

As espécies são sensíveis a interferências e mudanças ambientais. Mudanças climáticas podem estar alterando os padrões de comportamento de

desova, como o mês preferível para a nidificação e a escolha do local para a deposição dos ninhos (Pike; Pike, 2013; Oliveira *et al.*, 2020).

Figura 2 – Mapa de ocorrência/distribuição das espécies de tartarugas marinhas ao redor do mundo.



FONTE: Elaborado pelo autor

A temperatura é um fator determinante na sexagem dos embriões. A temperatura entre 29 e 30 °C indica que provavelmente haverá um equilíbrio entre a quantidade de machos e de fêmeas da ninhada (Standora; Spotila, 1985). Com a temperatura global estando em constante elevação, ninhos de tartarugas tendem a produzir mais fêmeas do que machos, o que ocasiona um desequilíbrio na formação da prole (Poloczanska; Limpus; Hays, 2009). Esse fenômeno pode ser um indicativo de possíveis adaptações às alterações climáticas mundiais (Santidrián Tomillo; Spotila, 2020).

Tartarugas marinhas são animais migratórios, que podem se deslocar a grandes distâncias, incluindo deslocamentos entre os diferentes oceanos (Boyle *et al.*, 2009). Esse comportamento pode ser motivado por diversos fatores. Estudos indicam que elas realizem migração com a função de alimentação, reprodução e desova (Luschi *et al.*, 1998; Fukuoka *et al.*, 2016; Luschi; Hays; Papi, 2003).

A exemplo disso, *C. caretta* e *D. coreacea* podem viajar até acima de 10.000km de distância entre suas áreas de alimentação e de reprodução, retornando para suas respectivas áreas de reprodução aproximadamente a cada 2 anos (Hays; Scott, 2013).

A primeira migração ocorre logo após o nascimento, período conhecido como “*lost years*”, ainda pouco documentado. Existem dificuldades em estudos com os juvenis do grupo, devido ao seu rápido crescimento, comportamento migratório e tamanho muito pequeno ao nascerem (Mansfield; Wyneken; Luo, 2021). No entanto, pesquisas utilizando telemetria se mostram ferramentas eficazes para se compreender essa fase de vida (Briscoe *et al.*, 2016; Mansfield; Wyneken; Luo, 2021). Nesse ínterim, as tartarugas nadam por dias em busca de uma área para forrageio e se instalam (Carr, 1987). O comportamento dos juvenis não necessariamente é o mesmo dos indivíduos adultos. Juvenis de *C. mydas*, por exemplo, passam entre três e cinco anos após o nascimento tendo um comportamento alimentar carnívoro, enquanto os animais adultos são preferencialmente herbívoros (Reich; Bjorndal; Bolten, 2007).

Quelônios marinhos apresentam ainda um comportamento de retorno a algumas áreas ocupadas em determinadas fases do ciclo de vida. O chamado comportamento filopátrico é o retorno das fêmeas para as mesmas áreas de desova para as próximas temporadas reprodutivas, ficando fiéis a estas regiões (Reis; Goldberg, 2017).

As fêmeas adultas quando atingem a idade reprodutiva tendem a retornar para as mesmas regiões em que nasceram para realizarem suas desovas (Lee; Luschi; Hays, 2007). Esse comportamento filopátrico é mediado pelo campo magnético da terra e alterações neste campo podem gerar impacto para o grupo, ocasionando alterações no comportamento de retorno que é mediado por uma assinatura magnética, chamada de “*imprinting*”, registrado logo após a saída dos filhotes do ninho (Brothers; Lohmann, 2015; Lohmann *et al.*, 2013, 2019). Este comportamento também é registrado para machos, que tendem a utilizar preferencialmente a mesma área de reprodução (Shamblin *et al.*, 2012).

Estes animais apresentam também uma alta fidelidade as áreas de alimentação e modelos matemáticos indicam que conforme haja alterações nas correntes oceânicas, as áreas de forrageio também serão diferentemente escolhidas pelas tartarugas (Scott; Marsh; Hays, 2014).

Inicialmente, os estudos através de telemetria satelital eram utilizados para investigar a rota de fêmeas, fêmeas, que saem da água para realizar suas desovas, momento em que os equipamentos eram instalados. No entanto, essa metodologia também vem sendo utilizada para estudos com machos e juvenis. (Varo-Cruz *et al.*, 2013; Hays; Hawkes, 2018; Mansfield *et al.*, 2021). Por meio dessa tecnologia, existe a possibilidade de se rastrear as áreas prioritárias para ações de preservação ambiental para o grupo, mesmo que em alto mar, visando reduzir a quantidade de possíveis encalhes (Jeffers; Godley, 2016; Hart; Guzy; Smith, 2021).

3.1.2 Tartarugas marinhas no Brasil

A costa brasileira é uma área importante nos estudos ecológicos para as tartarugas marinhas. Cinco das sete espécies conhecidas ocorrem na região, sendo elas *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata*, *L. olivacea* e *D. coriacea* (Marcovaldi; Dei Marcovaldi, 1999).

A tartaruga-verde possui o hábito de desovar principalmente nas ilhas oceânicas. No Brasil, as principais áreas de desova da espécie são as Ilhas do Arquipélago dos Abrolhos (BA), Atol das Rocas (RN) e Fernando de Noronha (PE) (Bellini, 1996; Bellini *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 1995). Existe o registro esporádico de desovas da espécie em regiões continentais (Lima *et al.*, 2019). Com relação ao seu

status de vulnerabilidade à extinção no Brasil, uma portaria recente do ministério do Meio Ambiente (MMA, 2022) retirou essa espécie da lista brasileira de espécies ameaçadas de extinção. Tal melhora se deve aos esforços ambientais realizados ao longo da costa.

A tartaruga-cabeçuda está classificada como “vulnerável” pelo Ministério do meio ambiente. Sua desova ocorre preferencialmente no estado da Bahia, mas existem registros de desovas das espécies em outros locais da costa brasileira, como o Rio de Janeiro (Lima *et al.*, 2012). As desovas de tartarugas cabeçudas em áreas de temperaturas mais baixas como as do sudeste do Brasil, são importantes para a produção de filhotes do sexo masculino, pois ninhos depositados em regiões mais frias, tendem a produzir mais filhotes do sexo masculino (Baptistotte *et al.*; 1999; Lima *et al.*, 2012).

A tartaruga de pente está classificada como “em perigo” (MMA, 2022) e possui uma importante área de desova no estado do Rio Grande do Norte. A região se caracteriza por ser a segunda área de maior densidade de desovas da espécie (Santos *et al.*, 2013), sendo a região com maior densidade o estado da Bahia (Marcovaldi; Vieitas; Godfrey, 1999; Marcovaldi *et al.*, 2007).

A tartaruga-oliva, classificada como “vulnerável” (MMA, 2022), possui importantes sítios de desovas localizados nos estados de Sergipe e Bahia (Da Silva *et al.*, 2007; Colman *et al.*, 2014). A costa brasileira apresenta ainda uma significativa área de alimentação dessa espécie e regiões de migração pós desova (Colman *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2019). O litoral brasileiro é caracterizado como a segunda maior população de *L. olivacea* do Oceano Atlântico, tendo também como importantes sítios de desova Bahia, Sergipe (Castilhos *et al.*, 2022), Ceará e Rio Grande do Norte, (Bomfim *et al.*, 2021).

A tartaruga de couro (*D. coriacea*), também chamada de tartaruga gigante, possui áreas de desovas importante no estado do Espírito Santo (Thomé *et al.*, 2007; Colman *et al.*, 2019), no Pauí (Loebmann *et al.*, 2008) e Bahia (Gandu *et al.*, 2014) e é a espécie mais pelágica dentro do grupo das tartarugas marinhas (Eckert *et al.*, 2012). Essa espécie está classificada como “criticamente em perigo” na lista de espécies brasileiras ameaçadas (MMA, 2022). Existem registros de captura incidental de exemplares da espécie no estado do Ceará (Lima *et al.*, 2007) e encalhes registrados em Alagoas e em São Paulo (Bonfim *et al.*, 2022). Arraial do Cabo, no

estado do Rio de Janeiro, foi relatada como uma importante área de alimentação para a espécie na costa brasileira (Fonseca *et al.*, 2023).

Registros de encalhes de tartarugas marinhas na costa brasileira são comuns (Cantor *et al.*, 2020; Perazo *et al.*, 2021). De acordo com o SIMBA (Sistema de Informação de Monitoramento da Biota Aquática), existe o registro de 1.647 ocorrências de tartarugas marinhas no litoral do Ceará, incluindo registros de encalhes e desovas. Destas, 1.337 são de tartarugas verdes, indicando uma prevalência de ocorrência da espécie na região. Por abranger várias áreas de forrageio, alimentação e desova, esses animais são frequentemente avistados. Os Programas de monitoramentos de Praias (PMPs) são relatados com sucesso como ferramentas para obtenção de dados de registro populacional de tartarugas marinhas no Brasil (Poli *et al.*, 2014).

Estudos utilizando monitoramento por satélite têm sido realizados na costa brasileira a fim de compreender a rota migratória desses animais, incluindo o retorno entre área de alimentação e desova, além das áreas de reprodução (Godley *et al.*, 2003; Baudouin *et al.*, 2015).

A pesca incidental tem sido registrada como um importante problema para a conservação das tartarugas marinhas no litoral brasileiro (Gallo *et al.*, 2006; Sales; Giffoni; Barata, 2008). O aumento constante de iluminação nas praias de desova parece ser um problema significativo para a escolha do local de nidificação e para o direcionamento dos filhotes para o mar após a eclosão dos ninhos (Mascarenhas *et al.*, 2004; Simões; Silva; Moura, 2017; Colman *et al.*, 2020). Além disso, os problemas de interação antropogênica, como a ingestão de plástico, são uma das principais causas de mortalidade prematura dentro do grupo (Bugoni *et al.*, 2001; Ivar Do Sul *et al.*, 2011; Rizzi *et al.*, 2019).

3.1.3 Filogeografia de tartarugas marinhas

Estudos que envolvam grupos marinhos com ampla distribuição global, são trabalhos chave para se compreender os impactos ambientais, a biogeografia e a diversidade genética dentro das populações (Vilaça *et al.*, 2022). O grupo das tartarugas marinhas tem uma complexa estrutura populacional, incluindo a ocorrência frequente de múltiplas paternidades (Bowen; Karl, 2007), em que a fêmea tem um

comportamento promíscuo, copulando com diversos machos dentro de uma mesma temporada reprodutiva (Uller; Olsson, 2008; Joseph; Shaw, 2011; Lee *et al.*, 2018).

Estudos de genética populacional de Testudines são desafiadores, devido às constantes modificações nas populações e ao longo e complexo ciclo de vida, incluindo a mudança de habitats durante diferentes fases da vida, o que altera o comportamento do grupo (Arthur, Boyle; Limpus, 2008; McClellan; Read, 2007). Pesquisas moleculares têm mostrado resultados promissores sobre o conhecimento das populações de tartarugas marinhas em todo o mundo, incluindo genética, filogenia, evolução e conservação (Naro-Maciel *et al.*, 2008b, 2010; Barley *et al.*, 2010a, 2010b; Shamblyn; Bjorndal; Bolten, 2012; Bradshaw *et al.*, 2018; Camacho-Sánchez *et al.*, 2022).

Genes que amplificam sequências de regiões do DNA mitocondrial de tartarugas marinhas são largamente utilizados para estudos sobre a genética de populações do grupo. Dados fornecidos através de resultados com o uso de mtDNA fornecem informações importantes sobre a ligação e padrões de diversidade de tartarugas marinhas em diferentes estágios de vida (Phillips *et al.*, 2022).

Análises filogenéticas usando marcadores nucleares revelam um possível padrão de introgressão em populações de tartarugas marinhas no Brasil, o que leva a perda de variabilidade genética (Vilaça *et al.*, 2012). A combinação de análises com marcadores nucleares e mitocondriais têm se mostrado eficaz para estudos evolutivos e genéticos no grupo (Naro-Maciel *et al.*, 2008a; Garofalo *et al.*, 2013) além da identificação de híbridos (Arantes *et al.*, 2020; Brito *et al.*, 2020).

Análises utilizando regiões de polimorfismo e marcadores microssatélites também são opções efetivas e têm mostrado resultados relevantes para a ecologia e conservação do grupo (Roden; Dutton, 2011; Chow; Anderson; Shedlock, 2019; Zhang *et al.*, 2021; Naguib *et al.*, 2022).

A maioria das tartarugas marinhas está em alguma categoria de espécie ameaçada de acordo com a Lista Vermelha da IUCN (IUCN, 2022), e estudos moleculares são importantes para entender a complexidade populacional dentro do grupo. As mudanças ambientais são fatores que impactam o comportamento dos Testudines, pois são sensíveis a mudanças de temperatura, clima e modificações nos níveis do oceano (Tomillo; Spotila, 2020; Mancino; Canestrelli; Maiorano, 2022; Rivas *et al.*, 2023).

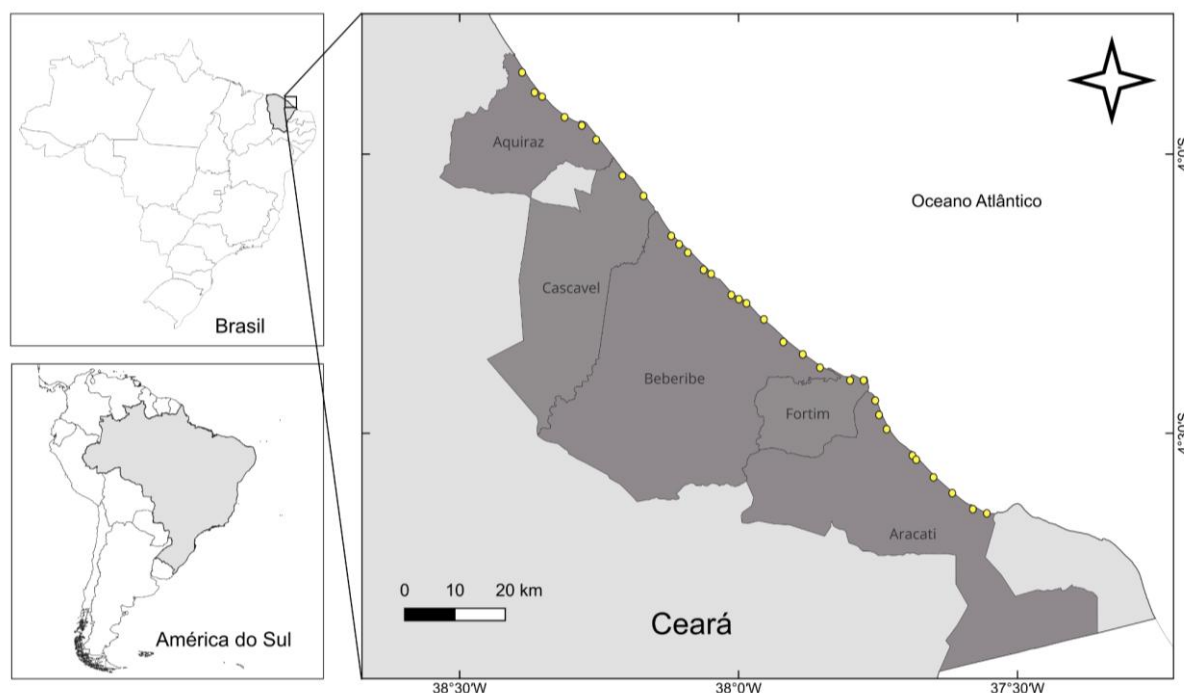
O hibridismo pode se tornar uma questão chave para a conservação de tartarugas marinhas, causando efeitos como a redução da taxa de reprodução, adaptabilidade superior do híbrido e introgressão (Soares *et al.*, 2017). Híbridos imaturos morfologicamente semelhantes a uma das espécies parentais podem adotar comportamentos de forrageio típicos dos seus progenitores, podendo ter um nicho mais abrangente (Proietti *et al.*, 2014). Há o indicativo de uma desvantagem reprodutiva de indivíduos híbridos quando comparados às espécies puras, o que mostra um impacto negativo em indivíduos híbridos (Arantes *et al.*, 2020).

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção e organização das amostras

Amostras de tecido de aproximadamente 600 exemplares de tartarugas marinhas provenientes de encalhes no litoral leste do estado do Ceará foram coletadas pela equipe de monitoramento de praia da ONG Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (AQUASIS). O material foi coletado durante o patrulhamento de praias em busca de registros de animais encalhados entre os anos de 2017 e 2022, sob Autorização de captura, coleta e transporte de material biológico (Abio) de número 1080/2019, emitida pelo IBAMA/MMA. Foram coletadas amostras de tecidos de tartarugas marinhas encalhadas no litoral leste do Ceará dos municípios de Aquiraz, Cascavel, Beberibe, Fortim e Aracati (Figura 3).

Figura 3 – Localidades em que foram coletadas as amostras de tecido de tartarugas marinhas no litoral leste do Ceará utilizadas para as análises genéticas



FONTE: Elaborado pelo autor

A coleta foi feita com o auxílio de um bisturi ou objeto perfuro-cortante, utilizado para retirar uma amostra de pele/músculo do animal, preferencialmente, e armazenada em microtubo com álcool etílico 70% (v/v).

As amostras foram cedidas ao Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos (CEDECAM) para compor a amostragem da presente pesquisa. O material biológico foi transportado para o Laboratório de Evolução e Conservação de Vertebrados Marinhos (EVOLVE) da Universidade Federal do Ceará (Campus do Pici), onde houve uma primeira triagem e organização das amostras. A catalogação final e armazenamento, bem como as demais etapas das análises, ocorreram no CEDECAM, localizado no Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR/UFC). Todas as amostras foram devidamente conferidas, identificadas e conservadas em álcool 70%. Posteriormente, foram iniciados os preparativos para as extrações do material genético.

4.2 Extrações de DNA

A extração do material genético foi feita através da utilização de protocolo usando Fenol-Clorofórmio, adaptado de Sambrook (1989). Uma porção de cada amostra foi seccionada do tecido principal, macerada e lavada com solução tamponada de TRIS HCl 10mM e em seguida drenada. Foi adicionado ao tecido 700µL de tampão de extração (TRIS HCl 1M, SDS 20%) e 30µL de Proteinase K (30µg/mL) e misturado por inversão. Inicialmente foram realizados testes para se verificar a melhor adequação no protocolo de extração quanto à temperatura e o tempo de incubação. Os melhores resultados foram os obtidos com a digestão realizada entre 16h e 20h overnight, incubadas em banho maria a 37°C. As amostras foram acrescidas de 350µL de Fenol e 350µL de Clorofórmio:Álcool isoamílico (24:1), misturadas por inversão durante 5 min e centrifugadas a 7.000 x g por 5min. 650µL do sobrenadante foi transferido para outro microtubo estéril e adicionado de 650µL de Clorofórmio:Álcool isoamílico (24:1) e misturadas por inversão durante 5 min, novamente misturadas por inversão e centrifugadas por 5 min.

Após a centrifugação, 500µL da fase aquosa foram transferidos para um novo microtubo estéril, adicionado 1mL de Etanol absoluto juntamente com 50µL de Acetato de sódio 3M e incubado em freezer por 15 min. As amostras foram então centrifugadas a 10.000g por 15min, e o sobrenadante descartado, mantendo-se o pellet da amostra (material sedimentado) no tubo. O pellet foi então lavado com 500µL de Etanol 70% (v/v) gelado, invertendo o tubo algumas vezes e centrifugado por 5 min a 10.000g. O Etanol foi descartado cuidadosamente e o pellet seco em hot-block (70°C / 10min). O pellet foi reidratado em 50µL de Tampão de eluição (Tris HCl 1M pH 7,5, EDTA pH 7,0). As amostras foram armazenadas e devidamente refrigeradas a -4°C.

Uma alíquota de 2µL do DNA extraído foi usada para a quantificação do material genético por espectrofotometria em NanoDrop™ 2000/2000c. Esta metodologia permite observar a concentração de material genético (DNA) e o grau de pureza das amostras, que foi mensurado através da relação entre 260nm – 280nm. O produto das extrações foi revelado em eletroforese em gel de agarose 1%, a fim de observar sua integridade.

4.3 Amplificação das sequências de interesse

As amostras de DNA selecionadas foram amplificadas através de PCR convencional (Reação em cadeia da polimerase) cujos reagentes e respectivos volumes estão expressos no quadro 1. O gene utilizado para a amplificação da porção mitocondrial do DNA foi o COI Fish (adaptado de Ward *et al.*, 2005). Para amplificar a porção nuclear, foram utilizados dois genes de ativação da recombinação somática RAG1 e RAG2 (adaptado de Villaça *et al.*, 2012), todos descritos no quadro 2, juntamente com suas respectivas condições de termociclagem.

Quadro 1 – Reagentes utilizados na PCR convencional para amostras de tartarugas marinhas

Reagente	Volume	Concentração Final
10x PCR buffer	1,25µL	1 ×
MgCl ₂	0,375µL	1,5 mM
dNTP	0,5µL	0,4 mM
Primer F	0,5µL	0,4 mM
Primer R	0,5µL	0,4 mM
Albumina	0,0625µL	0,01 µg/µL
Taq DNA polimerase	0,05µL	1 U
H ₂ O	7,262µL	n.s.a*
DNA	2µL	1,6 ng/µL

*n.s.a: não se aplica

Das amostras de DNA extraídos, foram selecionadas apenas sequências que demonstraram boas qualidades e concentração de material genético, verificados mediante quantificação e visualização por eletroforese em gel de agarose do produto da extração.

As reações de PCR seguiram um fluxo de baterias, no qual para a **Bateria 1**, todas as amostras foram submetidas à amplificação do gene COI; na **Bateria 2**, as

amostras que foram positivas para o gene COI foram submetidas à amplificação do gene RAG1; na **Bateria 3**, as amostras que foram positivas para o gene RAG1 foram submetidas à amplificação do gene RAG2.

Quadro 2 – *Primers* e as condições de termociclagem que foram utilizados para as amplificações de DNA de tartarugas marinhas por meio de PCR convencional

Nome Primer	Sequência	Região	Condição adaptada		Referência
RAG1 F	AGTCCATCTCTTGCCAGGTC	Nuclear	94° C 5 min, 30 ciclos (94 °C 30 s; 55°C 1 min; 72°C 1:30 min), 72°C 5 min	~ 368 pb	Adaptado de Vilaça <i>et al.</i> , 2012
RAG1 R	CAGCAGGAACAAAGTTAGGC				
RAG2 F	CTGCTATCTTCCCCCTCTCC	Nuclear	94 °C 5 min, 35 ciclos (94 °C 30 s; 62 °C 1 min; 72 °C 1 min), 72 °C 10 min	~ 620 pb	Adaptado de Vilaça <i>et al.</i> , 2012
RAG2 R	GTTGTCACACTGGTAGCCCC				
COI FISH F	TCAACCAAAGACATTGGCAC	Mitocondrial	94 °C 5 min, 35 ciclos (94 °C 40 s; 58 °C 40 s; 72 °C 1 min), 72 °C 10 min	~ 655 pb	Adaptado de Zemlak <i>et al.</i> , 2005
COI FISH R	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGCA				

A escolha dos genes para amplificação foi baseada em trabalhos descritos na literatura com estudos sobre de filogeografia e genética molecular de tartarugas marinhas (Brito *et al.*, 2020; Vilaça *et al.*, 2012). Os *amplicons* produzidos foram checados por eletroforese em gel de agarose a 1%(p/v) contendo o corante fluorescente GelRed® (Biotium, USA) e visualizados em transiluminador ultravioleta, com documentação digital. Os *amplicons* que apresentaram uma banda mais pronunciada e limpa, foram selecionados para serem sequenciados.

4.4 Sequenciamento de DNA e análise dos resultados

Para o sequenciamento dos fragmentos de DNA, foram selecionadas as amostras que apresentaram boas amplificações para os genes COI, RAG1, RAG2, sendo exigência para um bom resultado de sequenciamento que as amostras de DNA estejam nas melhores condições possíveis.

As amostras selecionadas foram enviadas para sequenciamento de SANGER, utilizando o reagente BigDye Terminator v3.1 e seguindo a metodologia do fabricante (Rosenblum *et al.*, 1997).

Todos os *amplicons* foram sequenciados nos dois sentidos e a seguir foram analisados e conferidos através do software MEGA versão 11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021).

4.5 Estimativa da diversidade genética

As análises de caracterização e diversidade genética foram realizadas utilizando os softwares Arlequin versão 3.5.2 (Excoffier; Laval; Schneider, 2005) e DNAsp (Rozas *et al.*, 2017). O Arlequin foi empregado para estimar a estrutura genética populacional, com base em análises de variância molecular (AMOVA) e cálculos de F_{st} entre populações. Para complementar a análise da diversidade genética, o DNAsp foi utilizado para avaliar parâmetros de diversidade nucleotídica e haplotípica, permitindo identificar polimorfismos e realizar a caracterização de haplótipos nas sequências analisadas.

4.6 Comparações com o banco de dados de sequências genéticas e estimativas das relações filogenéticas

As sequências obtidas no sequenciamento foram utilizadas juntamente com outras sequências de DNA de tartarugas marinhas disponíveis no GenBank para os genes em questão. O GenBank é um banco de dados público de sequências genéticas mantido pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Todas as sequências foram organizadas e submetidas a um alinhamento múltiplo no software MEGA (Tamura; Stecher; Kumar, 2021), utilizando o algoritmo ClustalW para assegurar a homologia entre as posições nucleotídicas.

Para inferir as relações evolutivas das amostras de tartarugas marinhas, foram construídas árvores filogenéticas utilizando o software MEGA11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021) e o método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). As distâncias evolutivas foram calculadas com o modelo Kimura de 2 parâmetros

(Kimura, 1980). O suporte das ramificações foi avaliado pelo teste de *bootstrap* com 10.000 replicações, e os valores de bootstrap acima de 50% foram indicados nas ramificações da árvore resultante. Apenas posições sem ambiguidade foram incluídas.

4.7 Construção e Análise das Redes de Haplótipos

As redes de haplótipos foram produzidas no programa PopART (Leigh, Bryant, 2015) a partir do método de *Minimum Spanning Network* (Bandelt, Forster, Röhl, 1999). Para isso, as sequências do presente estudo, separadas por gene investigado, foram submetidas ao alinhamento (ClustalW) com sequências (COI, RAG1 e RAG2).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises moleculares das amostras para os genes COI, RAG 1, RAG 2

Primeiramente, uma parte das amostras (n= 450) foi utilizada para amplificação por PCR com o *primer* COI. As amostras que tiveram uma boa amplificação para este gene (n= 162), foram selecionadas e amplificadas para o gene RAG1, que amplificou 73 amostras. Da mesma maneira ocorreu subsequentemente para o gene RAG2 (n= 57).

Algumas questões devem ser levadas em consideração neste caso, em que as amostras foram coletadas de animais encalhados, em sua maioria mortos e em diferentes graus de decomposição. Inicialmente fizemos uma amplificação total das amostras extraídas visando obtermos a maior quantidade de DNA possível e verificarmos como as amostras se comportariam com relação aos genes alvo e foram observadas várias amostras que acabaram não amplificando para a sequência mitocondrial. Os animais poderiam estar sob ação de intempéries ambientais há alguns dias, o que pode ocasionar algum grau de degradação do tecido e consequentemente uma baixa qualidade no DNA extraído.

Outro fator que pode ter comprometido a qualidade das amostras foi o tipo de tecido coletado em campo. Devido às condições adversas que os animais se encontravam, eventualmente havia amostras de placas, nadadeiras ou porções do casco dos animais, tecidos que conferem altos graus de queratina, interferindo na qualidade do material genético. O tipo de tecido pode interferir na qualidade e pureza do material genético extraído, sendo indicados passos de purificação para que as amostras fiquem com uma menor quantidade de substâncias contaminantes aos ácidos nucleicos. Em estudos que tem como objetivos análises moleculares, o mais comum é se utilizar tecidos de pele, em sua maioria de regiões musculares, seguido de sangue, o que ajuda na obtenção de materiais genéticos mais íntegros. (Monteiro *et al.*, 2024).

Em momento posterior, foi feita outra bateria de extrações de DNA, incluindo amostras de espécies que não tinham sido amplificadas nas tentativas anteriores, *L. olivacea* e *E. imbricata*. Foram realizadas mais 48 extrações, focando em aumentar os quantitativos dos genes nucleares e das espécies citadas. As extrações passaram pelos mesmos procedimentos de seleção para serem eleitas para o sequenciamento.

5.2 Sequências de DNA obtidas e comparação com banco de dados

Foram obtidas 102 sequências de DNA com boa qualidade resultantes do sequenciamento de Sanger (Quadro 3), extraídos de tartarugas marinhas de 39 amostras encalhadas no litoral leste do Ceará dos municípios de Aquiraz, Cascavel, Beberibe, Fortim e Aracati, utilizadas para as análises e comparadas com 80 sequências disponíveis no Banco de dados NCBI (APÊNDICE B).

O montante das sequências utilizadas inclui as sequências, que foram revisadas e conferidas no software MEGA 11 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). As conferências foram feitas criteriosamente, a fim de revisar os nucleotídeos presentes nas sequências afim de resolver ambiguidades. Foram então selecionadas sequências disponíveis no GenBank para a realização do alinhamento geral para os genes, comparação entre as espécies e montagem dos arquivos a serem analisados nos demais *softwares* de análises genéticas.

As sequências para o gene COI foram cadastradas no GenBank. Os números de acesso estão disponíveis no Apêndice F deste documento. As sequências para os genes RAG1 e RAG2 estão em processo de submissão.

5.3 Dados Genéticos das populações estudadas

Os resultados obtidos para os dados genéticos das populações estudadas, foram diretamente influenciados pela quantidade de dados disponíveis no banco de dados, bem como pela quantidade de sequências de DNA que foram obtidas para cada gene (Quadro 3). Algumas análises previstas não puderam ser realizadas por falta de informações disponíveis para a construção dos grupos filogenéticos e populações.

Quadro 3 – Quantidade de sequências utilizadas (n), selecionadas do banco de dados (GenBank) e obtidas por sequenciamento de SANGER do presente trabalho (Sequências obtidas) separas por espécies (*Chelonia mydas*, *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata* e *Lepidochelys olivacea*) e por gene (COI, RAG1 e RAG2)

	<i>Chelonia mydas</i>	<i>Caretta caretta</i>	<i>Eretmochelys imbricata</i>	<i>Lepidochelys olivacea</i>	TOTAL
COI					
Sequências obtidas	31	4	2	1	38
NCBI	19	6	19	3	47
TOTAL COI	50	10	21	4	85
RAG1					
Sequências obtidas	28	1	1	2	32
NCBI	6	4	3	7	20
TOTAL RAG1	34	5	4	9	52
RAG2					
Sequências obtidas	29	1	1	1	32
NCBI	3	2	2	6	13
TOTAL RAG2	32	3	3	7	45
TOTAL POR ESPÉCIE	116	18	28	20	182

Para os três genes, foram geradas sequências de DNA que foram comparadas com as que havia disponíveis no banco de dados NCBI, levando em consideração se a sequência havia sido amplificada com o mesmo gene a ser trabalhado e o local que a amostra havia sido coletada, visando abranger o máximo possível as localidades das amostras incluídas no estudo.

Os resultados das análises genéticas estão apresentados em subtópicos, separados inicialmente por gene, em seguida por espécie e para cada espécie, as análises que foram realizadas para as sequências obtidas com aquele respectivo gene. Os haplótipos identificados para cada gene, de acordo com cada local analisado e a respectiva espécie(s) estão dispostos nos apêndices C, D e E deste documento.

5.3.1 Citocromo oxidase subunidade I (COI)

As análises para as amostras amplificadas com o gene COI foram as mais completas, devido a maior disponibilidade de dados tanto no banco de dados genômico quanto com a quantidade de sequências que foram obtidas das amostras do estudo através das extrações de material genético.

A tabela 1 apresenta um panorama geral dos dados para as espécies de tartarugas marinhas que foram realizadas as análises genéticas e revela uma alta diversidade haplotípica em várias populações, particularmente no Brasil, com valores de Hd próximos de 1, como observado para as espécies *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata*, e *L. olivacea*.

Tabela 1 - Dados de diversidade genética para *C. mydas*, *C. caretta* e *E. imbricata* gerados a partir das sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI)

Espécie	População	Sequências	Sítios Polimórficos (S)	Haplótipos (h)	Média de Diferenças Nucleotídicas (K)
<i>Chelonia mydas</i>	China	7	3	4	0,857
<i>Chelonia mydas</i>	Caribe	6 (1)	0	1	0
<i>Chelonia mydas</i>	Índia	2	3	2	3
<i>Chelonia mydas</i>	Austrália	4	2	3	1
<i>Chelonia mydas</i>	Brasil	30 (28)	1	2	0,067
<i>Caretta caretta</i>	EUA	2	5	2	5
<i>Caretta caretta</i>	Mediterrâneo	3	0	3	0
<i>Caretta caretta</i>	Brasil	4 (4)	13	4	15,5
<i>Eretmochelys imbricata</i>	Colômbia	16	6	4	0,950
<i>Eretmochelys imbricata</i>	Austrália	2	2	2	2
<i>Eretmochelys imbricata</i>	Brasil	2 (2)	0	1	0

Entre () estão os valores referentes aos quantitativos oriundos do presente estudo

5.3.1.1 Diversidade genética de *Chelonia mydas* para o gene COI

Os resultados da análise genética das populações de *C. mydas* com base no gene mitocondrial COI, utilizando o *software* Arlequin, revelaram importantes *insights* sobre a diversidade genética dessa espécie em diferentes regiões geográficas.

A média de diferenças nucleotídicas para as amostras do Brasil foi de 0,067, indicando que as variações genéticas entre os indivíduos são relativamente pequenas, reforçando a proximidade genética encontrada entre as amostras pela rede de haplótipos. Já nas sequências do Caribe (México, EUA e Guiana), mesmo com seis sequências analisadas, não foram detectados sítios polimórficos, o que resultou em uma ausência de variação genética, refletindo uma homogeneidade entre os indivíduos analisados.

Na população da China, foram identificados três sítios polimórficos entre as sete sequências analisadas, resultando em quatro haplótipos distintos, com a média de diferenças nucleotídicas de $k=0,857$. Essa variabilidade sugere uma elevada taxa de diversidade genética, o que pode refletir um histórico de migração e fluxo gênico entre diferentes populações. No entanto, essas inferências só podem ser confirmadas caso haja estudos com uma maior quantidade de sequências disponíveis para a espécie e genes alvo.

A população da Índia apresentou três sítios polimórficos entre as duas sequências analisadas, com dois haplótipos, com uma média de diferenças nucleotídicas de $k=3$. De forma semelhante, a população da Austrália também apresentou alta diversidade genética, com dois sítios polimórficos e quatro haplótipos distintos entre as quatro sequências analisadas, resultando em uma média de diferenças nucleotídicas de $k=1$.

Esses dados podem indicar uma alta divergência genética entre os indivíduos das localidades estudadas dos oceanos Índico e Pacífico, indicando a possível presença de diferentes estoques genéticos. Essa ideia foi discutida por Dolfo

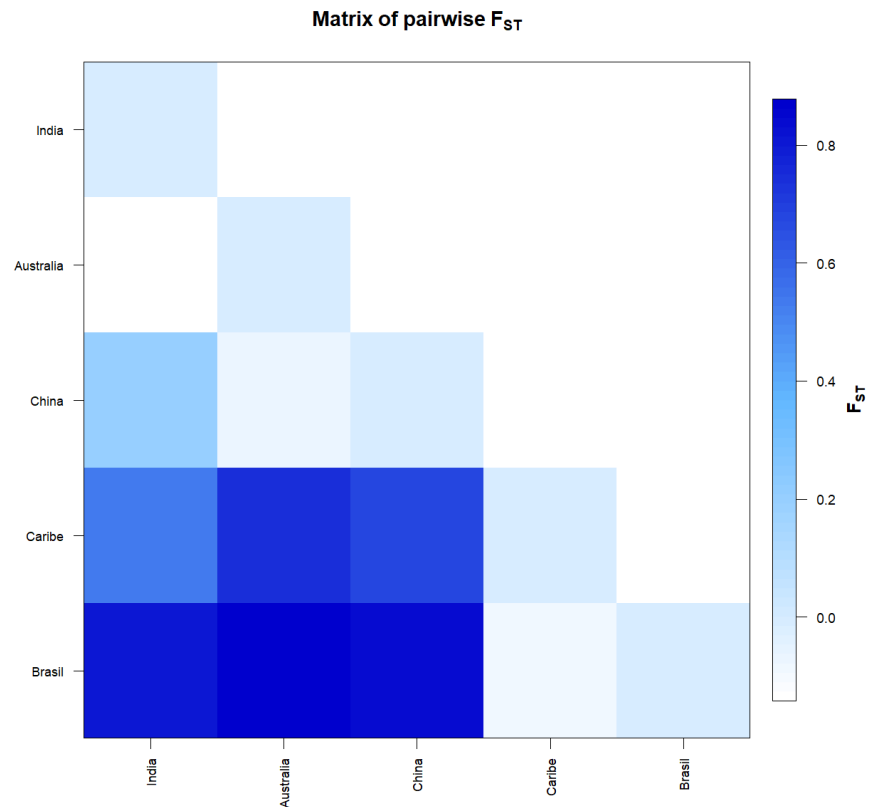
et al., 2023, que trazem que as populações de *C. mydas* da Polinésia Francesa, região banhada pelo oceano pacífico apresentam particularidades genéticas importantes, o que conferem um isolamento genético desta população das demais e sua consequente diferenciação.

Quando analisadas as comparações *pareadas* entre as populações, os valores comparativos do índice de fixação do Brasil ($F_{ST}=0,538$) e Caribe ($F_{ST}=0,811$) com as demais trouxeram resultados estatisticamente significativos ($p>0,05$). Assim, observa-se uma maior diferenciação genética entre as populações Caribe-Brasil e o restante dos locais analisados pertencentes ao Oceano Pacífico, o que também foi observado na rede de haplótipos, apresentada posteriormente, conferindo uma separação entre os estoques do Atlântico e do Indo-Pacífico.

Esses resultados destacam as implicações para a gestão e conservação da *C. mydas* em diferentes áreas de desova e alimentação ao redor do mundo. O manejo adequado deve levar em consideração o grau de conectividade entre as populações e a necessidade de proteger as populações com menor variabilidade genética, como as do Oceano Atlântico.

Na matriz de diferenciação genética (Figura 4), os valores de F_{ST} foram calculados entre as populações de tartarugas marinhas das cinco regiões avaliadas (Índia, Austrália, China, Caribe e Brasil), gerada no *software* Arlequin. Os maiores valores de F_{ST} são observados entre as populações do Brasil e Caribe, esse padrão sugere um isolamento genético prolongado ou barreiras ao fluxo gênico entre as populações dessas regiões, enquanto as populações da Índia, Austrália e China mostram menor diferenciação genética.

Figura 4 - Matriz de diferenciação Genética (FST) pareada entre Populações de *Chelonia mydas* analisadas para o gene COI gerado pelo software R

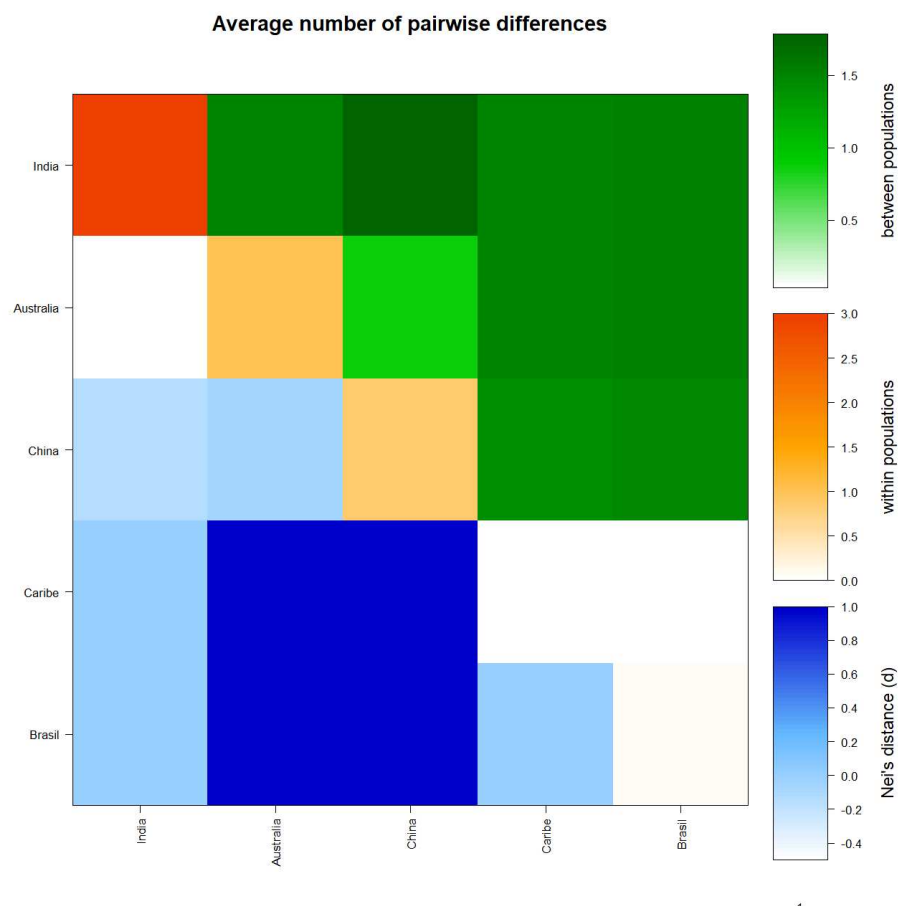


Em contraste, as populações da Índia, Austrália e China apresentaram valores de F_{ST} menores, indicando um fluxo gênico mais elevado ou uma divergência genética menos pronunciada entre essas populações. Pode-se inferir que o isolamento geográfico desempenha um papel central na estrutura genética dessas populações, influenciando a conservação e gestão das espécies de tartarugas marinhas nas diferentes regiões analisadas.

Em geral, os níveis esperados de heterozigosidade foram baixos para todas as populações. No Brasil, a heterozigosidade foi praticamente inexistente (0,066), refletindo a baixa variação genética. É provável que esta realidade esteja relacionada a redução populacional atrelada a poluição do ambiente marinho, a pesca incidental e ocorrência de parasitas, o que acaba por gerar possíveis gargalos populacionais e aumentando a ocorrências de eventos de introgressão e hibridismo nas tartarugas estudadas no Brasil (Tagliolatto *et al.*, 2021; Vilaça *et al.*, 2012, 2022; Almeida *et al.*, 2023; Reis *et al.*, 2009; Barata, Bodevan, Kirchpffenning, 2024; Vanucci *et al.*, 2024).

A matriz de diferenças pareadas entre populações de tartarugas marinhas das cinco regiões está representada na figura 5. O gradiente verde representa as diferenças entre populações, enquanto o laranja/vermelho ilustra as diferenças dentro das populações. O gradiente azul indica a distância de Nei (D) entre as populações.

Figura 5 - Matriz de diferenças pareadas médias entre populações de *Chelonia mydas* para o gene COI gerada pelo software R



As populações da Índia apresentaram maior diversidade genética interna, conforme demonstrado pelo elevado número de diferenças dentro da própria população (gradiente laranja/vermelho). Em contraste, as populações do Caribe e Brasil exibiram menor distância genética pareada, o que sugere maior homogeneidade genética entre essas regiões (gradiente azul escuro). Já as populações da Austrália e China apresentaram valores intermediários de diferenciação genética tanto entre como dentro das populações. Esses resultados indicam diferentes níveis de proximidade genética e isolamento entre as populações

de tartarugas marinhas, o que pode ser atribuído a barreiras geográficas, dispersão limitada ou eventos históricos de colonização.

A análise da distância genética pareada (Tabela 2) entre as populações de *C. mydas* com base no gene COI revelou que o conjunto amostral do Caribe e Brasil são as mais próximas geneticamente (distância de 0,000127), sugerindo uma forte conectividade genética entre essas regiões.

Tabela 2 - Matriz de distância genética pareada entre conjunto amostral de *Chelonia mydas* com base no gene COI gerada com base no método Kimura-2-Parameter (K2P)

	China	Caribe	Índia	Brasil	Austrália
China	0,00				
Caribe	0,00566	0,00			
Índia	0,007092	0,005945	0,00		
Brasil	0,005788	0,000127	0,006073	0,00	
Austrália	0,003394	0,005945	0,005953	0,006073	0,00

Esse resultado é esperado devido à proximidade entre as localidades estudadas, em que as tartarugas podem utilizar vários pontos do Oceano Atlântico incluindo áreas do Atlântico Norte e Atlântico Sul, podendo haver sobreposição de épocas de reprodução e de comportamento de forrageio. Como não existem barreiras geográficas físicas que impeçam os animais de nadarem livremente entre esses locais, é esperado que haja uma migração por entre essas localidades, conferindo um grau de compartilhamento genético.

Por outro lado, a maior divergência genética foi observada entre as populações da Índia e China (distância de 0,007092), indicando um isolamento genético mais acentuado entre essas duas regiões. As populações da Austrália apresentaram distâncias intermediárias em relação às demais, sugerindo uma conectividade genética moderada.

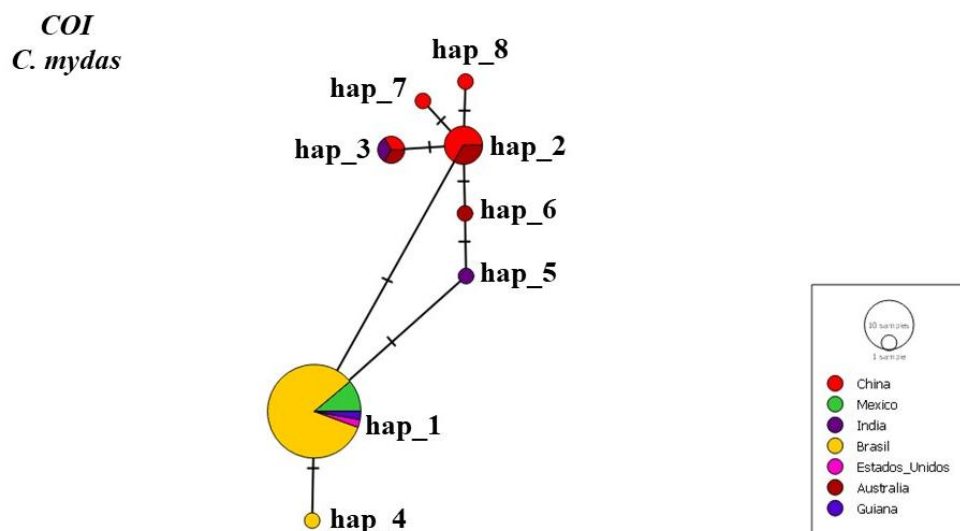
5.3.1.2 Rede de haplótipos de *Chelonia mydas* para o gene COI

A rede foi construída no software POPART, utilizando o método *median-joining*, que conecta os haplótipos por meio de mutações genéticas, oferecendo uma visão da filogeografia e da conectividade dessas populações. Essa mesma configuração foi utilizada para gerar as redes de haplótipos das demais espécies e genes.

Foram encontrados oito haplótipos, distribuídos entre as sete populações estudadas. Pode-se observar um haplótipo mais representativo, hap_1, que é compartilhado pelos grupos amostrais do Brasil, EUA, Guiana e México, indicando o compartilhamento de informações genéticas entre os exemplares da região do Atlântico. Existe ainda um haplótipo com um indivíduo (hap_4) do Brasil, em que hap_1 e hap_4 formam o haplogrupo Caribe-Brasil.

O segundo haplogrupo Indo-Pacífico, engloba seis haplótipos, distribuídos entre China, Índia e Austrália, em que o hap_2 é compartilhado entre China e Austrália, o hap_3 é compartilhado entre Índia, China e Austrália. Esses dois haplogrupos representam uma distinção entre os exemplares de tartaruga verde que foram registradas nessas diferentes regiões (figura 6).

Figura 6 – Rede de haplótipos para sequências parciais do gene COI de *Chelonia mydas* partir do método de *Minimum Spanning Network*



Assim, nota-se uma maior diversidade de haplótipos para o haplogrupo referente as localidades Indo-Pacífico, o que pode tanto estar relacionado ao quantitativo de amostras quanto à quantidade de locais diferentes em que elas foram coletadas. A tartaruga-verde parece ter tido sua origem no Indo-Pacífico, também houver eventos de colonização no Pacífico Central e Atlântico, indicando uma clara divergência genética entre as tartarugas do Atlântico e do Pacífico, mediada por barreiras geográficas (Jensen *et al.*, 2019; Dolfo *et al.*, 2023)

O conjunto amostral do Brasil apresentou dois haplótipos distintos, com uma predominância marcante de um deles (hap_1), representando 96,67% dos indivíduos indicando que há um haplótipo bem conservado dentro da população, que inclui também amostras de outras localidades do Caribe consideradas nesse estudo (México, EUA e Guiana). O segundo haplótipo foi encontrado em apenas 3,33% da amostra (hap_4), sugerindo uma baixa diversidade haplotípica. A dominância de um único haplótipo pode a longo prazo resultar em endogamia, devido ao fluxo gênico restrito, já que os indivíduos que compartilham esse haplótipo possuem materiais genéticos similares e uma consequente baixa diversidade genética.

Na China, foram identificados quatro haplótipos distintos (hap_2, hap_3, hap_7, hap_8), com frequências que variam entre 14,29% e 57,14%. Esse padrão indica uma maior diversidade haplotípica nessa população, sugerindo uma estrutura genética mais complexa. A maior variabilidade pode ser atribuída a um histórico de múltiplos eventos de dispersão e uma conectividade genética entre diferentes subpopulações.

O conjunto amostral da Austrália apresentou três haplótipos distintos, com frequências variando de 25% a 50%. Esse nível de diversidade é consistente com uma população geneticamente diversificada, provavelmente resultado de sua posição geográfica isolada. A Austrália é conhecida por possuir múltiplos estoques genéticos de tartarugas-verdes, resultado de populações mais distantes originadas no Índio-Pacífico (Day *et al.*, 2024).

Os resultados das amostras do México mostraram um único haplótipo em toda a amostra. A ausência de variação haplotípica pode indicar que essa população

é geneticamente homogênea, possivelmente devido a um fluxo gênico limitado ou a eventos de fundação.

Esses resultados indicam uma troca de informações genéticas entre essas populações, formando esse haplogrupo Caribe-Brasil, fortificando as hipóteses de que as tartarugas marinhas da espécie *C. mydas* nadam livremente entre os Oceanos Atlântico Norte e do Atlântico Sul (Patricio *et al.*, 2024).

As regiões em questão são consideradas áreas de reprodução e de forrageio (Patricio *et al.*, 2024; Oliveira *et al.*, 2024; Mettler *et al.*, 2020), indicando que os animais podem passar uma boa parcela da vida nadando por essas localidades, favorecendo o fluxo gênico entre regiões do Atlântico. Esse fato pode trazer benefícios para a espécie, uma vez que por se tratar de populações bem estabelecidas, pode haver a troca de informações genéticas, aumentando a variabilidade genética e consequentemente favorecendo as adaptações as alterações do meio.

5.3.1.3 Diversidade genética de *Caretta caretta* para o gene *COI*

Assim, como feito para *C. mydas*, para *C. caretta* obtivemos os resultados referentes as análises de diversidade genética das populações com o *software* Arlequin. Os dados foram analisados considerando três conjuntos amostrais: EUA, Mediterrâneo (Quênia e Turquia) e Brasil.

As sequências dos EUA apresentaram diversidade haplotípica significativa, em que cada sequência se diferenciou em um haplótipo. Já nas amostras do Mediterrâneo não foram observados sítios polimórficos, indicando que todos os indivíduos analisados apresentam sequências idênticas, sem variação genética e agrupadas no mesmo haplótipo. Em contraste com os resultados encontrados, há indícios de alta diversidade genética em populações de tartarugas-cabeçudas do Mediterrâneo, resultado que foi acima do esperado pelos autores, que analisaram sequências mitocondriais de 11 populações de nidificação do mediterrâneo (Garofalo *et al.*, 2009). Essa discrepância pode se dar ao fato de no presente estudo, não termos conseguido uma maior quantidade de sequências para serem analisadas, o que

interfere nas inferências acerca de diversidade genética e sobre as estruturas das populações alvo.

Por outro lado, a população do Brasil exibiu uma maior diversidade nucleotídica, em que das 4 sequências, 2 estão agrupadas no mesmo haplótipo e uma possui 10 sítios polimórficos e gerou um segundo haplótipo. Esses resultados sugerem uma variabilidade genética significativa dentro da população brasileira, possivelmente resultado de diferentes estoques genéticos ou históricos evolutivos distintos. As tartarugas cabeçudas possuem alto comportamento migratório, tendo um fluxo gênico assimétrico em populações do Atlântico. Historicamente, sabe-se que houve duas linhagens de colonização da espécie para o Atlântico, uma iniciando na bacia do Istmo Panamá, estabelecida no Brasil, Cabo Verde, EUA e México e outra que se originou pelo Cabo da Boa Esperança, o que confere uma maior diversidade para a espécie (Baltazar-Soares *et al.*, 2020).

A análise de diferenciação genética entre os conjuntos amostrais de *C. caretta* para os índices FST, não mostraram diferenças significativas.

Quando feita a comparação par a par o conjunto amostral do Brasil apresentou as maiores diferenças dentro da própria população, sugerindo uma alta variação genética interna. Em contraste, a população do Mediterrâneo mostra as menores diferenças internas, indicando baixa variação genética entre os indivíduos. Entre as populações, as maiores diferenças são observadas entre o Brasil e o Mediterrâneo, sugerindo um alto nível de diferenciação genética entre essas duas regiões.

A análise das diferenças pareadas médias entre as populações de *C. caretta* revelou variações significativas na estrutura genética das populações. As populações do Mediterrâneo apresentaram as menores médias de diferenças genéticas tanto dentro quanto entre populações, com uma divergência genética mínima em relação às outras regiões. Estudos anteriores também corroboram a baixa variabilidade genética nas populações do Mediterrâneo, possivelmente devido a um histórico de isolamento reprodutivo e à limitação de áreas adequadas para nidificação, incluindo a escassez de dados (Casale *et al.*, 2018).

Por outro lado, a população do Brasil exibiu a maior média de diferenças genéticas dentro da população e uma alta divergência em relação às populações dos EUA e Mediterrâneo. Esses dados sugerem que as populações brasileiras podem ter passado por eventos de expansão populacional e colonização de novas áreas de nidificação, o que resultou em uma maior variabilidade genética. As populações dos EUA demonstraram uma divergência genética moderada, tanto dentro da população quanto em relação às outras, o que pode refletir uma conectividade moderada entre as áreas de desova e alimentação no Atlântico.

Esses resultados indicam que o Brasil apresenta as sequências mais diversas geneticamente, enquanto que o Mediterrâneo e os EUA têm menor variabilidade interna e se distinguem geneticamente em menor grau entre si do que em relação ao Brasil. Em populações nidificantes nos EUA, *C. caretta* apresenta uma estrutura genética complexa, com a ocorrência de múltiplas populações isoladas e sobreposição de populações durante as migrações quando estudadas por análises moleculares mitocondriais (Bowen, Soares, Toonen, 2005).

A matriz de distâncias genéticas apresentada abaixo mostra as diferenças genéticas entre amostras de *C. caretta* do Quênia, Turquia, EUA e Brasil, com base no gene COI (Tabela 3) e revela uma alta similaridade genética entre as populações do Quênia e da Turquia, sugerindo que esses conjuntos amostrais são geneticamente idênticas ou extremamente próximas em relação ao gene COI.

Tabela 3 - Matriz de distâncias genéticas pareadas entre populações de *Caretta caretta* para o gene COI gerada com base no método Kimura-2-Parameter (K2P)

	Quênia	Turquia	EUA	Brasil
Quênia	0,00			
Turquia	0,00	0,00		
EUA	0,009073	0,009073	0,00	
Brasil	0,031046	0,031046	0,027395	0,00

Em contraste, a população do Brasil mostra maior diferenciação genética em relação às demais populações, com valores de distância genética de 0,031 tanto em relação ao Quênia quanto à Turquia, e 0,027 em relação aos EUA. Isso sugere que o conjunto amostral do Brasil de *C. caretta* é geneticamente distinto, possivelmente devido à maior variação genética ou a um isolamento geográfico prolongado.

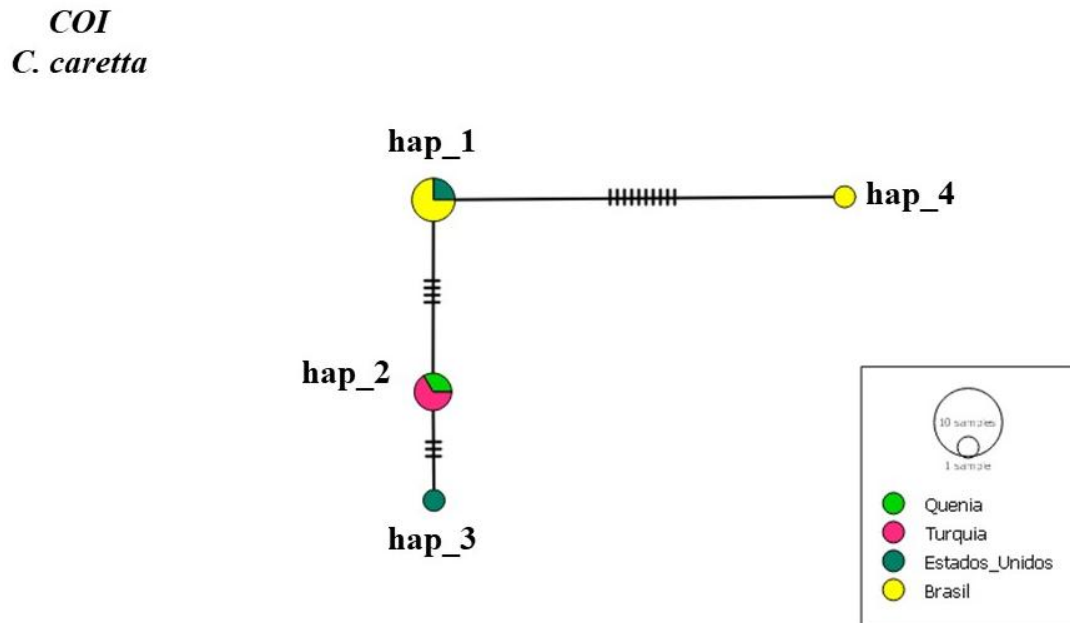
Esses resultados evidenciam que, enquanto algumas populações (como as do Quênia e da Turquia) estão altamente conectadas geneticamente, a população brasileira destaca-se por apresentar maior distância genética em relação às demais. Isso pode refletir diferenças nos padrões de migração, história evolutiva ou adaptações locais.

Análises com DNA mitocondrial e nuclear, revelam hibridização entre *C. caretta* com *L. olivacea* e *E. imbricata*, indicando a possibilidade de eventos de hibridização ao longo da costa brasileira (Almeida *et al.*, 2023), fatores estes que podem refletir no aumento da diversidade genética da espécie.

5.3.1.4 Rede de haplótipos de *Caretta caretta* para o gene *COI*

Os resultados da rede de haplótipos para *C. caretta* (Figura 7) amplificadas com o gene *COI*, indicou a presença de quatro haplótipos, em que dois deles são compartilhados e dois são específicos de uma amostra do Brasil (hap_4) e de uma dos EUA (hap_3). No Brasil, foram identificados dois haplótipos distintos, enquanto no grupo das amostras do Mediterrâneo apenas um haplótipo foi encontrado (hap_2), compartilhado com as amostras do Quênia e da Turquia.

Figura 7 – Rede de haplótipos para sequências parciais do gene COI de *Caretta caretta* a partir do método de *Minimum Spanning Network*



Para as amostras do Brasil, as sequências se agruparam em dois haplótipos (hap_1 e hap_4), em que o primeiro é compartilhado entre sequências do Brasil e uma sequência dos EUA, mostrando uma relação genética entre as populações dessas duas localidades, também trazendo o comportamento livre entre as regiões do Atlântico Norte e Atlântico Sul para a *C. caretta*. Uma das amostras, possui 10 sítios polimórficos em relação as demais amostras do local, indicando uma diferenciação importante para a espécie, aumentando a variabilidade genética para essa região.

A espécie *C. caretta* vem mostrando alto nível de diferenciação genética quando comparada com as demais. Isso pode se dever ao fato de a espécie ter comportamentos de migração bem intensos, além de ocorrências de hibridismo e fluxo gênico entre diferentes populações (Bowen, Soares, Toonen, *et al.*, 2005; Ludwig *et al.*, 2023; Almeida *et al.*, 2023). As migrações são importantes para que as tartarugas aumentem a possibilidade de variabilidade genética, fazendo com que haja uma maior capacidade adaptativa as alterações ambientais que podem vir a impactar no sucesso evolutivo das espécies.

Não foi possível realizar as análises de diferenciação genética utilizando o software Arlequin para as espécies *Eretmochelys imbricata* e *Lepidochelys olivacea* com o gene mitocondrial COI, bem como para os genes nucleares RAG1 e RAG2, devido à insuficiência de informações disponíveis nas bases de dados para esses marcadores genéticos. A ausência de sequências genéticas suficientes inviabilizou as análises filogeográficas e populacionais com o auxílio do Arlequin, que requer uma quantidade mínima de dados para a realização de comparações estatísticas robustas entre as populações. Foi então realizada uma análise genética básica com o software DNAsp.

Como alternativa, optou-se por utilizar apenas as informações das relações dos haplótipos no software POPART para a construção de redes de haplótipos, permitindo a visualização das relações evolutivas entre os haplótipos das populações analisadas. As redes de haplótipos, geradas pelo método de *median-joining*, foram consideradas como a principal abordagem filogeográfica para essas espécies para o COI.

5.3.1.5 Análises genéticas e rede de haplótipos de *Eretmochelys imbricata* para o gene COI

A análise genética dos grupos amostrais de *E. imbricata* para o gene COI foi feita pelo DNAsp. A diversidade haplotípica total para a espécie foi $H_d = 0,5$ com as 20 sequências distribuídas em 5 haplótipos diferentes e uma alta diversidade nucleotídica ($K = 0,96$). A população da Colômbia apresentou uma diversidade haplotípica moderada ($H_d = 0,517$) e uma média de diferenças nucleotídicas de 0,950, com quatro haplótipos distintos identificados.

Em contrapartida, a população da Austrália exibiu dois haplótipos distintos, e uma média de diferenças nucleotídicas de 2. Já a população do Brasil apresentou ausência de diversidade haplotípica e diferenças nucleotídicas nulas, o que indica uma homogeneidade genética nessa amostra, em que as duas sequências para a espécie se agruparam em um mesmo haplótipo. É importante destacar que devido ao baixo número de sequências disponíveis para a espécie e o gene alvo, não é possível tirar conclusões definitivas acerca de análises genéticas considerando os conjuntos

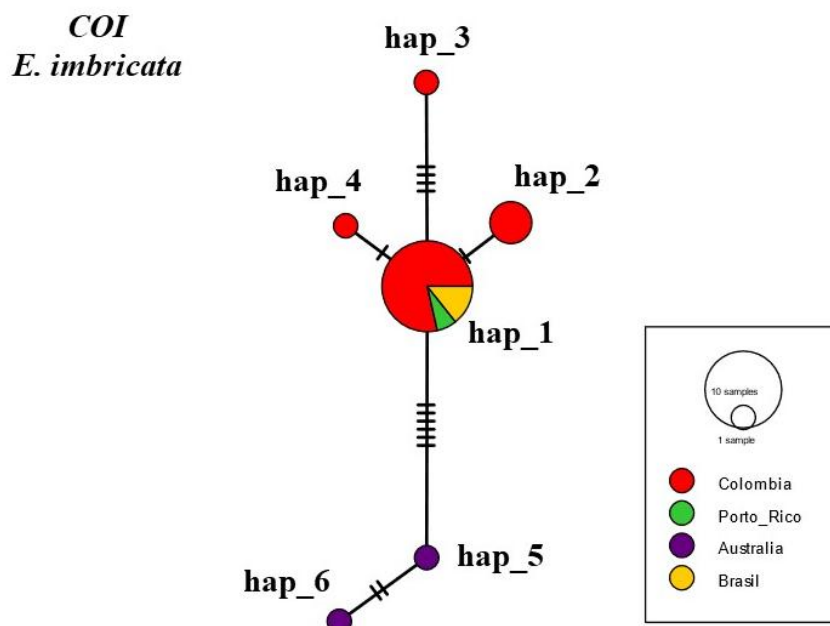
amostrais como populações. No entanto, podemos ter um direcionamento de possibilidades para análises futuras e realizar uma análise mais aprofundada com relação aos dados dos haplótipos para as espécies.

Esses resultados destacam a necessidade de estratégias de conservação adaptadas para *E. imbricata*, considerando as diferenças nos padrões de diversidade genética e conectividade entre populações, que influenciam diretamente a resiliência das tartarugas à pressões ambientais.

A rede de haplótipos a seguir (Figura 8) mostra as relações filogeográficas entre diferentes populações de *E. imbricata* (tartaruga-de-pente), incluindo amostras da Colômbia (vermelho), Porto Rico (verde), Austrália (roxo) e Brasil (amarelo). A rede foi construída com o método *median-joining*.

Observa-se uma clara predominância de haplótipos da Colômbia, indicando que essa população possui o maior número de amostras na rede. Em contraste, as populações do Brasil, Porto Rico e Austrália são representadas por fatias menores em algumas conexões, sugerindo que essas regiões compartilham haplótipos com a Colômbia, mas possuem uma menor frequência amostral. Esses resultados podem ser direcionados pela maior quantidade de sequências disponíveis para as amostras da Colômbia (n=16) do que dos demais locais estudados (n=4).

Figura 8 – Rede de haplótipos para sequências parciais do gene COI de *Eretmochelys imbricata* a partir do método de *Minimum Spanning Network*



É possível observar um haplogrupo que inclui os haplótipos hap_1, hap_2, hap_3 e hap_4, sendo o primeiro compartilhado por sequências da Colômbia, Porto Rico e Brasil, e os demais haplótipos do grupo, incluindo sequências apenas da Colômbia. Os resultados refletem uma relação importante entre as tartarugas do Atlântico Norte e Sul, assim como observado para *C. caretta*, fato este que traduz uma maior possibilidade de aumento de variabilidade genética entre os animais dessas diferentes localidades em que os animais podem transitar livremente entre as águas, em vista que não existem barreiras físicas separando os dois Atlânticos (Patricio *et al.*, 2024).

Além destes, existem ainda dois haplótipos com sequências únicas da Austrália (hap_5 e hap_6), indicando uma diferenciação genética importante entre os oceanos Atlântico e Pacífico. Populações de diferentes regiões compartilham os mesmos haplótipos, o que sugere um fluxo gênico significativo entre essas áreas, ou seja, as populações de *E. imbricata* podem estar conectadas geneticamente, provavelmente devido à dispersão durante a fase pelágica juvenil e às migrações entre áreas de alimentação e reprodução (Almeida *et al.*, 2023).

A presença de haplótipos compartilhados entre o Brasil, Colômbia e Porto Rico, reforça a hipótese de conectividade entre as populações do Atlântico. No entanto, a Austrália aparece mais isolada na rede, com haplótipos exclusivos, o que pode indicar uma diferenciação genética maior para essa região. Esses resultados corroboram estudos anteriores que sugerem uma conectividade populacional de *E. imbricata* no Atlântico, mas também levantam a possibilidade de barreiras à dispersão para as populações no Indo-Pacífico, como a Austrália.

A rede de haplótipos oferece uma visão detalhada da filogeografia da espécie, demonstrando tanto a conectividade quanto a diferenciação genética regional. Isso pode ter implicações importantes para a conservação da espécie, sugerindo a necessidade de abordagens de manejo coordenadas entre países que compartilham populações geneticamente conectadas.

Acerca da matriz de distâncias genéticas entre os conjuntos amostrais de *E. imbricata* (Tabela 4), as populações da Colômbia e Porto Rico apresentaram uma distância genética muito baixa (0,0016), indicando alta similaridade genética e possivelmente um fluxo gênico recente entre essas populações do Atlântico. Da

mesma forma, a população do Brasil compartilha uma proximidade genética com Porto Rico e Colômbia, com valores de distância genética também em torno de 0,0016. Os resultados da matriz de distância genética corroboram com os achados na análise da rede de haplótipos para as sequências de COI de *E. imbricata*, sendo indicativo de confirmação das relações genéticas entre os exemplares do Atlântico. Em contrapartida, a Austrália apresentou as maiores distâncias genéticas em relação às populações do Atlântico, com valores de 0,0239 em relação à Colômbia e 0,0223 em relação a Porto Rico, sugerindo um isolamento genético maior desse conjunto amostral.

Tabela 4 - Matriz de distâncias genéticas pareadas entre populações de *Eretmochelys imbricata* para o gene COI gerada com base no método Kimura-2-Parameter (K2P)

	Colômbia	Porto Rico	Austrália	Brasil
Colômbia	0,00			
Porto Rico	0,001566	0,00		
Austrália	0,023932	0,022307	0,00	
Brasil	0,001566	0,00	0,022307	0,00

Esses resultados indicam que as populações atlânticas de *E. imbricata* estão conectadas geneticamente, enquanto a população da Austrália parece estar mais isolada, refletindo padrões filogeográficos diferenciados entre o Atlântico e o Indo-Pacífico. Estudos anteriores corroboram esses achados, sugerindo que as populações atlânticas de tartarugas-de-pente possuem uma conectividade significativa devido à dispersão durante a fase juvenil e migrações para áreas de alimentação e reprodução (Bowen *et al.*, 2007; Vilaça *et al.*, 2013).

5.3.1.6 Análises genéticas para *Lepidochelys olivacea*

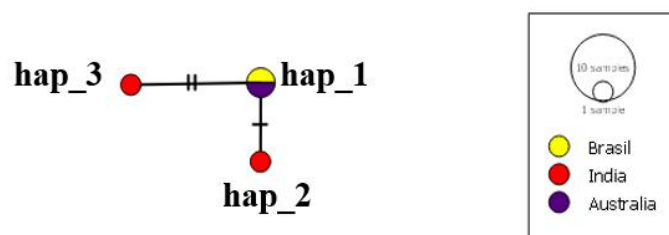
Para a espécie *L. olivacea*, devido ao número baixo de sequências disponíveis (4), das quais apenas uma era do Brasil, disponibilizada pelo presente

estudo, não foi possível realizar a caracterização genética, como foi feita para as demais espécies, sendo possível apenas o estudo relacionado a rede de haplótipos.

Para a tartaruga oliva, foram incluídas sequências do Brasil, Índia e Austrália, de acordo com o que havia disponível no banco de dados para a respectiva espécie e gene utilizados para gerar a rede de haplótipos (Figura 9). Os resultados mostram uma baixa diversidade haplotípica, com três haplótipos distribuídos entre as localidades, informação que pode se dever a baixa quantidade de amostras utilizada disponíveis para a espécie.

Figura 9 – Rede de haplótipos para sequências parciais do gene COI de *Lepidochelys olivacea* a partir do método de *Minimum Spanning Network*

COI
L. olivacea



Foram identificados três haplótipos, sendo um compartilhado por amostras do Brasil e da Austrália (hap_1) e os outros dois referentes a amostras da Índia, com duas sequências diferentes.

Por outro lado, a Índia aparece mais isolada na rede, com as duas sequências distribuídas em dois haplótipos distintos e exclusivos, o que sugere uma diferenciação genética mais acentuada para essa população, possivelmente causada por barreiras geográficas ou oceanográficas que limitam a possibilidade de fluxo gênico.

Esses resultados são consistentes com estudos anteriores que apontam para uma estruturação genética em populações de *L. olivacea*, especialmente no

Indo-Pacífico, onde as populações tendem a ser mais diferenciadas devido à extensão geográfica e barreiras de dispersão (Shanker *et al.*, 2004).

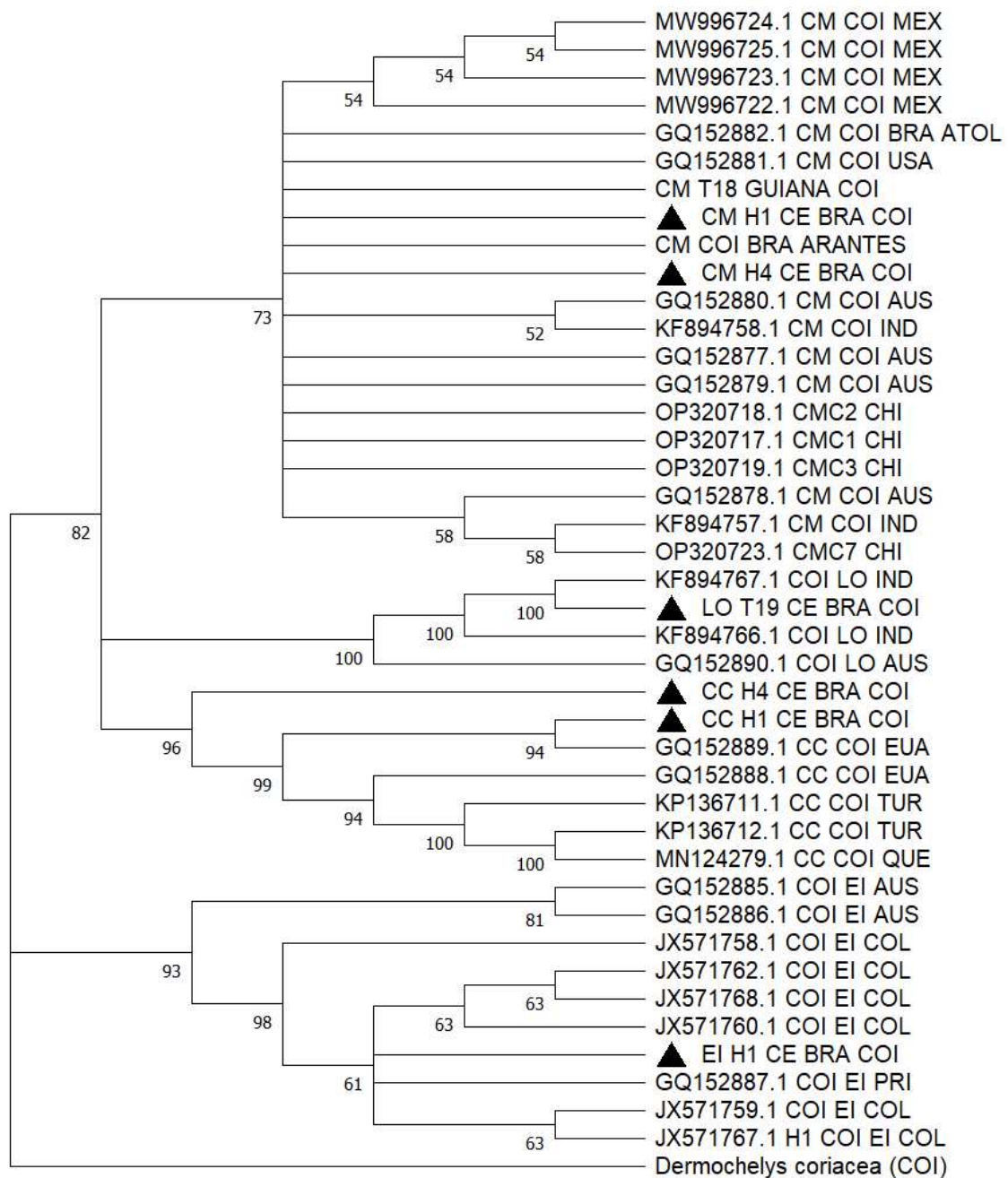
A conectividade genética entre o Brasil e a Austrália é surpreendente, mas pode ser explicada pelo comportamento migratório dessas tartarugas, que frequentemente percorrem longas distâncias para buscar áreas de alimentação e reprodução. As tartarugas oliva parecem ter diferentes padrões de migrações, não possuindo rotas específicas em seu comportamento, conferindo uma certa flexibilidade, apresentando comportamento nômade (Plotkin, 2010). O mesmo também ocorreu para *E. imbricata* de Alagoas, em que foi identificado um haplótipos típico do Índio-Pacífico, sugerindo migrações de longa distâncias para a espécie (Almeida *et al.*, 2023).

Outra hipótese é a discutida por Vilaça *et al.*, 2022, que trazem que as populações do Oceano Atlântico de *Lepidochelys olivacea* possuem uma menor diversidade genética quando comparadas as populações de outras localidades, e ainda encontraram uma proximidade entre as populações do Atlântico e do Indo Pacífico ocidental, região que engloba a Austrália. Os autores discutem que pode ter havido uma recolonização mais recente do Atlântico com estoques genéticos do Pacífico Ocidental, fato que pode explicar o compartilhamento do mesmo haplótipo entre indivíduos do Brasil e da Austrália.

5.3.1.7 Árvore filogenética para o gene COI

A análise incluiu as espécies *C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* e *L. olivacea*, e revelou uma clara separação filogenética entre os principais grupos e espécies analisadas (Figura 10). As relações entre as populações que foram observadas na árvore filogenética, refletem as informações observadas na rede de haplótipos para o gene. No entanto, observou-se um menor suporte em alguns clados envolvendo *Eretmochelys imbricata* e *Caretta caretta*, com valores de *bootstrap* inferiores a 70%, o que pode indicar a presença de variações genéticas intrapopulacionais.

Figura 10— Árvore filogenética para o Gene COI, construída pelo Método *Neighbor-Joining*, aplicando o Modelo de dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1980). Números próximos aos ramos correspondem à consistência após 10.000 replicações por *Bootstrap*.



* CM (*Chelonia mydas*); CC (*Caretta caretta*); EI (*Eretmochelys imbricata*); LO (*Lepidochelys olivacea*)

5.3.2 Gene *RAG1*

Para o gene *RAG1*, os dados referentes as análises de diversidade genética foram obtidos por meio do *software* DnaSP v6 devido à baixa quantidade de sequências para algumas populações e a incompatibilidade com a descrição de populações. Os resultados das análises genéticas para o gene *RAG1* estão apresentados na tabela 5 em que foram analisados dois conjuntos amostrais (Brasil e EUA) de quatro espécies de tartarugas marinhas (*C. mydas*, *C. caretta*, *E. imbricata* e *L. olivacea*).

Devido ao baixo número amostral do quantitativo de sequências para essas análises, não foi possível um resultado que reflita uma estruturação genética com relação as espécies. A maior quantidade de sequências utilizadas é referente a espécie *C. mydas*, que foram produzidas nesse estudo. No banco de dados, a maioria das sequências disponíveis são correspondentes a um único haplótipo e só foram encontradas sequências relacionadas ao Brasil e ao EUA.

Tabela 5 - Dados de diversidade genética para *Chelonia mydas*, *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata* e *Lepidochelys olivacea* gerados a partir de sequências do gene nuclear RAG1

Espécie	População	Número de Sequências	Sítios Polimórficos (S)	Número de Haplotipos (h)	Diversidade Haplotípica (Hd)	Média de Diferenças Nucleotídicas (K)	Fst
<i>Chelonia mydas</i>	EUA	5	0	1	-	0	0,092
<i>Chelonia mydas</i>	Brasil	27	2	3	0,325	0,336	0,092
<i>Caretta caretta</i>	EUA	2	-	1	-	0	-
<i>Caretta caretta</i>	Brasil	3	4	3	1	2,666	-
<i>Eretmochelys imbricata</i>	EUA	2	2	2	1	2	-0,67
<i>Eretmochelys imbricata</i>	Brasil	2	3	2	1	3	-0,67
<i>Lepidochelys olivacea</i>	EUA	2	0	1	-	0	0,240
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Brasil	7	12	6	0,952	3,904	0,240

Fst - (coeficiente de diferenciação genética)

Os resultados indicam que o conjunto amostral do Brasil possui uma maior diversidade tanto haplotípica quanto de diferenças nucleotídicas, de modo que pode ser menos impactada pelos fatores referentes ao gargalo populacional das espécies de tartarugas marinhas. Esses fatores podem conferir uma maior resistência e adaptabilidade as alterações ambientais, em vista da variabilidade genética.

Já sequências dos EUA apresentam uma menor diversidade genética para essas amostras, o que pode indicar um isolamento dessa população, em que não há indicativos de troca de informações genéticas com outras populações. Sobre os dados de diversidade haplotípica, pode-se observar uma diversidade alta $h_d=1$ ou próxima a 1 e coeficiente de diferenciação genética (FST) com alguns valores negativos. Isso pode se dever ao fato da pouca quantidade de sequências disponíveis para as análises, como as populações de *C. caretta* e *E. imbricata*, que eram compostas por apenas 2 sequências.

De modo geral, quando analisadas numa perspectiva mitocondrial, as tartarugas oliva apresentam uma menor diversidade genética se comparadas com as demais espécies, em que as populações do Oceano Índico parecem ser as mais divergentes dentro da espécie, sendo a linhagem mais antiga da espécie em que a baixa diversidade sugere modelos de extinção e recolonização (Vilaça *et al.*, 2022).

5.3.2.1 Análises genéticas de *Chelonia mydas* para o gene RAG1

Quanto aos resultados do RAG1 para a tartaruga verde, a diversidade haplotípica da população do Brasil foi maior em relação a diversidade dos EUA, que apresentou valores nulos, sem a presença de sítios polimórficos, possuindo apenas um haplótipo identificado para as cinco sequências avaliadas. Para a população do Brasil, foi encontrada uma diversidade haplotípica de 0,325, com dois sítios polimórficos e três haplótipos distintos entre as 27 sequências analisadas, sugerindo uma maior variabilidade genética interna.

Um ponto importante a ser levado em consideração sobre esses resultados é a divergência entre as quantidades de amostras encontradas para as populações. Os dados disponíveis no banco de dados para a espécie em relação ao gene RAG1 eram poucos, conferindo uma discrepância de 22 amostras a mais para a população brasileira, em que as amostras foram sequenciadas no presente trabalho.

A média de diferenças nucleotídicas (K) foi de 0,336 no grupo amostral brasileiro, indicando um nível moderado de divergência genética entre os indivíduos, enquanto para os EUA, o valor de K foi nulo, confirmando a homogeneidade genética.

O coeficiente de diferenciação genética F_{ST} foi de 0,092, indicando uma diferenciação genética moderada entre as amostras que apesar de estarem separadas, pode ocorrer uma conexão genética entre elas em algum grau. Esse nível de F_{ST} indica que, embora existam algumas diferenças genéticas, as populações são amplamente homogêneas e provavelmente possuem algum grau de fluxo gênico que mantém as populações geneticamente conectadas (Wright, 1978). As estimativas de diferenciação genética entre as populações não foram significativas ($\chi^2 = 1,097$, $p = 0,5777$), provavelmente devido ao baixo número amostral para algumas espécies.

Esses resultados são consistentes com a biologia de *C. mydas*, uma espécie altamente migratória, onde as populações podem manter níveis de conectividade mesmo entre localidades geograficamente distantes (Roberts, Schwartz e Karl, 2004; Dolfo *et al.*, 2023; Patricio *et al.*, 2024). A espécie possui comportamento de fidelidade às suas áreas de forrageamento e em regiões de soltura, permanecendo próximas ao serem monitoradas, possuindo áreas no Atlântico Norte como essenciais para a fase de vida juvenil (Metz *et al.*, 2020). Reconhece-se ainda que machos tendem a migrar menores distâncias do que as fêmeas, sendo essa hipótese ampliada para as demais espécies de tartarugas marinhas, revelando um padrão migratório sexo específico (Beal *et al.*, 2022).

Esses dados reforçam a importância de considerar a conectividade genética entre diferentes áreas para a formulação de estratégias de

conservação, uma vez que as populações de *Chelonia mydas* parecem estar geneticamente conectadas apesar das diferenças regionais observadas na diversidade haplotípica.

Esses resultados são consistentes com estudos anteriores que indicam uma conectividade genética entre populações de *Chelonia mydas* no Atlântico, porém com níveis variados de estruturação genética, dependendo das distâncias geográficas e das barreiras físicas e ambientais (Bowen *et al.*, 2007; Vilaça *et al.*, 2013). A baixa diversidade genética observada nos EUA pode ser um reflexo de gargalos populacionais históricos ou uma colonização recente, enquanto a maior variabilidade no Brasil pode estar associada à presença de várias áreas de alimentação e desova na costa brasileira, que suportam um fluxo gênico mais robusto. A hipótese da diferença nas quantidades de sequências analisadas não pode ser descartada.

5.3.2.2 Análises genéticas de *Caretta caretta* para o gene *RAG1*

Para a espécie *C. caretta*, foram utilizadas 5 sequências, duas pertencentes a população dos EUA e três pertencentes a população do Brasil. A análise genética das sequências de *C. caretta* com base no gene *RAG1* mostrou que a o conjunto amostral do Brasil apresentou uma alta diversidade haplotípica ($H_d = 1$), em que cada uma das três sequências analisadas se distribuiu em um haplótipo diferente, com a presença de 4 sítios polimórficos.

Por outro lado, a população dos EUA apresentou uma diversidade haplotípica nula, com apenas um haplótipo e nenhuma variação genética observada entre os dois indivíduos analisados. A ausência de sítios polimórficos e a média de diferenças nucleotídicas nula indicam uma homogeneidade genética dentro dessa população. É provável que este resultado seja reflexo do baixo número de amostras disponíveis para essa população.

Por se tratar de uma região de alimentação e reprodução da espécie, o oceano Atlântico pode ser considerado um ambiente que possibilite a interação entre diferentes populações, sendo incluída ainda como rota migratória. O

presente estudo traz amostras de animais encalhados, que por vezes eram juvenis ($n=2$). As jovens tartarugas ainda são pouco estudadas, mas parecem ser uma chave importante para a compreensão entre a interligação entre as espécies e as localidades de ocorrência a depender da fase de vida para o grupo que é migratório e com filopatria natal (Phillips *et al.*, 2022).

Esses resultados indicam que as sequências brasileiras de *C. caretta* mantêm uma maior diversidade genética em comparação com as sequências dos EUA, o que pode ser uma vantagem evolutiva em termos de adaptação e resiliência a pressões ambientais. Contudo, a possibilidade de fluxo gênico entre as populações sugere que a conectividade genética é mantida, o que pode auxiliar na preservação da espécie nessas diferentes regiões geográficas. Um estudo histórico com levantamento de dados de microssatélites e de DNA mitocondrial, revelou que a composição genética do Atlântico Sudoeste apresenta altos níveis de diferenciação genética, conferindo uma população diferenciada entre diferentes áreas de nidificação de *C. caretta* (Ludwig *et al.*, 2023). Apesar de uma diferenciação importante, há também a ocorrência de fluxo gênico assimétrico entre populações de nidificação, mantendo uma conexão entre os grupos de ilhas do Atlântico, reflexo do comportamento filopátrico das fêmeas (Baltazar-Soares *et al.*, 2020).

5.3.2.3 Análises genéticas de *Eretmochelys imbricata* para o gene RAG1

As análises genéticas realizadas para o gene RAG1 para *E. imbricata* revelaram uma variabilidade genética distinta nas populações do Brasil e dos EUA. O grupo amostral brasileiro, composto por duas sequências, apresentou 3 sítios polimórficos, resultando na identificação de dois haplótipos, refletindo em uma diversidade haplotípica alta ($H_d = 1$), em que cada sequência ficou em um haplótipo diferente, indicando que, apesar do pequeno tamanho amostral, os indivíduos são geneticamente distintos. A média de diferenças nucleotídicas ($K = 3$) reflete uma variação genética relativamente alta, sugerindo que essa

amostragem mantém um nível considerável de diversidade, possivelmente devido à migração ou a um possível fluxo gênico de diferentes áreas.

Da mesma forma, a população dos EUA, também composta por duas sequências, apresentou 2 sítios polimórficos, com dois haplótipos distintos ($h = 2$) e uma diversidade haplotípica igualmente alta ($H_d = 1$) já que cada sequência pertence a um haplótipo distinto. No entanto, a média de diferenças nucleotídicas foi menor ($K = 2$) indicando que, embora a diversidade haplotípica seja alta, a variação entre os haplótipos é menor em comparação com a população brasileira. Isso pode sugerir que a população dos EUA sofreu pressões seletivas ou eventos demográficos diferentes, resultando em uma diversidade genética mais moderada do que a população brasileira, que pode estar alterando sua estrutura genética. Essas hipóteses devem ser confirmadas com análises utilizando uma maior quantidade de sequências nucleares.

Os valores negativos de F_{ST} (-0,67) podem sugerir inconsistências nos dados devido ao pequeno tamanho amostral ou à proximidade genética entre os indivíduos das duas populações. Com uma amostra maior, seria possível obter estimativas mais precisas de diferenciação e possibilidade de se avaliar um possível fluxo gênico.

Os dados indicam que há um certo nível de conectividade genética entre as duas localidades, considerando o Atlântico Norte e Atlântico Sul, o suficiente para evitar uma total separação genética, mas possivelmente insuficiente para manter uma diferenciação genética muito baixa.

Os resultados refletem os hábitos de *Eretmochelys imbricata*, uma espécie altamente migratória, onde o fluxo gênico entre diferentes áreas pode resultar em uma baixa diferenciação genética, apesar de populações geograficamente distintas. Conforme discutido por Arantes e colaboradores, *E. imbricata* apresenta um padrão demográfico complexo, desde gerações passadas, sendo os fatores ambientais como marés, quantidade de recifes de corais devido seu hábito alimentar e períodos de desovas, importantes na distribuição da espécie. Em regiões de forrageio, é comum agregações com diferentes estoques genéticos, incluindo indivíduos do Atlântico Norte e Sul e do

Indo-Pacífico, que inicialmente era bem distintas, mas que devido aos eventos de grandes migrações e de alterações ambientais, ocorreu uma homogeneização entre esses diferentes estoques (Arantes, Vargas, Santos, 2020; Almeida *et al.*, 2023). Essas observações reforçam a importância de estratégias de conservação que levem em consideração a conectividade entre habitats, particularmente para uma espécie vulnerável e de distribuição global como *Eretmochelys imbricata*.

5.3.2.4 Análises genéticas de *Lepidochelys olivacea* para o gene *RAG1*

Para *L. olivacea*, foram utilizadas 9 sequências para análise, 2 dos EUA e 7 do Brasil. O grupo amostral do Brasil apresentou alta diversidade haplotípica ($H_d = 0,952$), com seis haplótipos distintos identificados entre as sete sequências analisadas e 12 sítios polimórficos, refletindo uma alta variabilidade genética nas amostras analisadas. A média de diferenças nucleotídicas (K) foi igualmente alta, $k=3,904$, indicando uma significativa divergência genética entre as sequências do Brasil. Essa alta diversidade genética sugere que as sequências de *Lepidochelys olivacea* são geneticamente diversas, possivelmente devido a um maior fluxo gênico e interação entre diferentes locais.

Quando comparada com as demais populações, os estoques genéticos do Atlântico apresentam as menores diversidades genéticas de tartarugas-oliva, tanto com sequências nucleares como com sequências mitocondriais mesmo quando analisados estoques genéticos em situações de arribada, como ocorre na Costa Rica (Vilaça *et al.*, 2022). Os resultados na literatura diferem dos achados para o Brasil no presente estudo, fato que pode estar relacionado com o baixo número amostral para o gene em questão.

Em contrapartida, a população dos EUA apresentou uma diversidade haplotípica nula e nenhuma variação genética, com apenas um haplótipo identificado entre as duas sequências analisadas, e sem sítios polimórficos ou diferenças nucleotídicas, indicando uma homogeneidade genética para estas sequências, corroborando com a discussão anterior.

O coeficiente de diferenciação genética F_{st} foi de 0,240, o que sugere uma baixa diferenciação genética entre as populações, indicando que há variações genéticas notáveis entre as populações, mas elas ainda compartilham parte de sua diversidade genética.

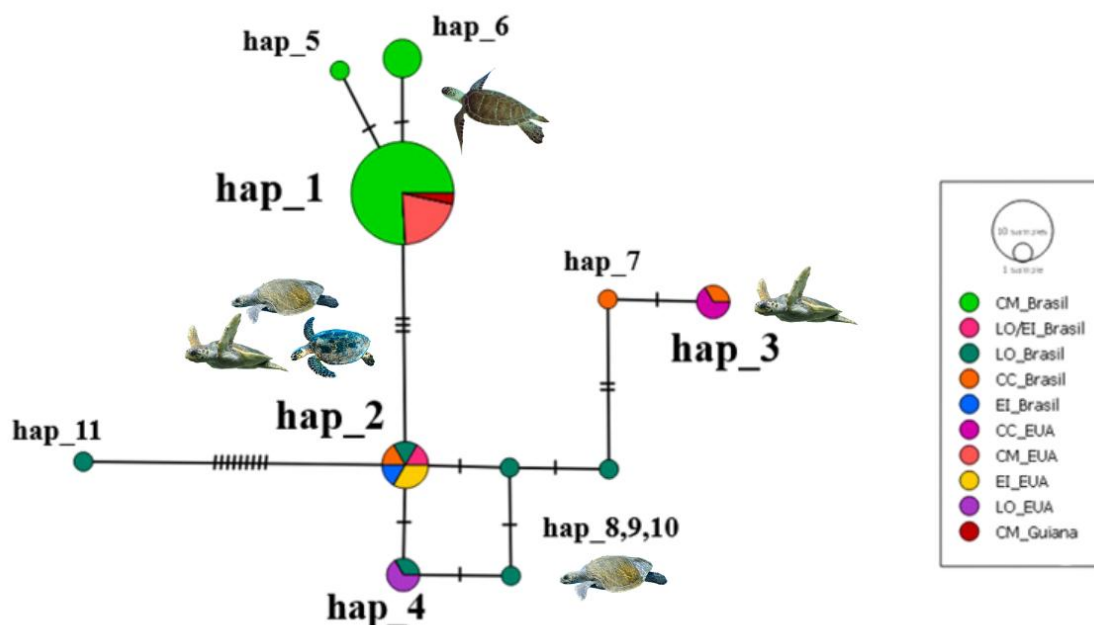
Esses resultados indicam que, enquanto as amostras analisadas dos EUA são geneticamente homogêneas, o conjunto amostral do Brasil mantém uma diversidade genética significativa, sugerindo que os dois grupos podem estar sujeitos a diferentes pressões demográficas e ecológicas.

Esses resultados podem indicar que o conjunto amostras de *L. olivacea* do Brasil e dos EUA utilizado pode estar em diferentes estágios demográficos, com as sequências brasileiras mantendo uma maior diversidade genética e potencial de adaptação, enquanto as amostras dos EUA podem estar em risco de perda de diversidade genética devido à sua alta homogeneidade. Tais informações são cruciais para o desenvolvimento de estratégias de conservação direcionadas, que devem considerar as particularidades genéticas de cada população ao longo da distribuição geográfica da espécie.

5.3.2.5 Rede de haplótipos para o gene *RAG1*

A rede de haplótipos (Figura 11) foi gerada englobando as quatro espécies estudadas devido ao número restrito de amostras e/ou de populações para que se pudesse ser feita a comparação entre diferentes localidades e as possíveis relações entre as espécies.

Figura 11 - Rede de haplótipos para o gene nuclear RAG1 com sequências de *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea* e *Caretta caretta* do Brasil, EUA e Guiana a partir do método de *Minimum Spanning Network*



Para o gene RAG1, foram obtidas sequências de *C. mydas* (CM; n=34), *E. imbricata* (EI; n= 4), *C. caretta* (CC; n= 5) e *L. olivacea* (LO; n= 9), do Brasil, EUA e Guiana, totalizando 11 haplótipos. É possível observar uma alta variabilidade haplotípica para essas amostras, embora elas sejam de regiões próximas, pertencentes ao oceano Atlântico Norte e Sul. Os resultados mostram que há uma conexão genética entre essas populações, incluindo espécies diferentes, aumentando a variabilidade nesses locais, fato decorrente do comportamento de migração das espécies, que possuem áreas de alimentação e reprodução que podem incluir diferentes locais.

Os haplótipos 1, 5 e 6 são referentes as amostras de *C. mydas*, sendo o hap_1 o mais comum entre as amostras, e é compartilhado entre amostras do Brasil, Guiana e EUA, indicando a possibilidade de um fluxo gênico entre o conjunto amostral do Atlântico. Os haplótipos 4, 7, 8, 9 e 10, pertencem a

sequências de *L. olivacea*, sendo o hap_4 compartilhado entre sequências dos EUA e Brasil e os demais, compostos apenas por amostras brasileiras.

As sequências da espécie *L. olivacea*, estão distribuídas em 6 haplótipos (2,4,8,9,10 e 11), demonstrando uma maior diversidade haplotípica entre essa espécie, com poucas sequências que se repetem dentro do conjunto amostral, em vista que destes, 4 haplótipos são exclusivos para a espécie e contemplam apenas uma sequência.

Os haplótipos 3 e 7, pertencem a espécie *C. caretta* em que o hap_3 é compartilhado entre amostras do Brasil e EUA. Neste haplótipos, estão incluídas o haplótipos hap2 de Vilaça *et al.*, 2012, e duas sequências dos EUA. O haplótipos hap_7 é identificado por Vilaça e colaboradores como hap6 e também é um haplótipos exclusivo de *C. caretta* no estudo. O hap_3 é composto por uma sequência do Brasil, correspondente ao hap2 (JF415120.1) de Vilaça *et al* 2012 e de 2 sequências dos EUA. No trabalho, os autores trazem que este haplótipo foi compartilhado por sequências de híbridos *C. caretta* x *E. imbricata* de populações de nidificação na Bahia, haplótipos que, de acordo com Reis *et al*, 2010 seria híbrido *C.caretta* x *L.olivacea*. Assim, é importante reafirmarmos a possibilidade de amostras de regiões diferentes pertencerem a diferentes conjuntos genéticos, indicando uma alta complexidade e diferenciação nas populações do Brasil (Vilaça *et al.*, 2012), reforçando a ocorrência de múltiplos estoques genéticos na região.

Já o haplótipo hap_2 é compartilhado entre diferentes localidades e entre diferentes espécies (Figura 12), incluindo amostras de *L.olivacea* e *C. caretta* do Brasil, e *E. imbricata* do Brasil e dos EUA. Os hap1 e hap4 apresentaram sequências compartilhadas entre *E.imbricata* e *L. olivacea* e foram haplótipos encontrados em baixa frequência entre híbridos, descrito pelos autores. No presente estudo, o hap1 apresenta sequência idêntica a duas amostras dos EUA e o hap4 está incluído no hap_2, juntamente com amostras de *C. caretta*, *L. olivaea* e *E. imbricata*, demonstrando uma ampla ocorrência entre as espécies de tartarugas marinhas para o locus.

Figura 12 - Detalhe da rede de haplótipos para o gene nuclear RAG1 mostrando o haplótipo hap_2 compartilhado por *E. imbricata*, *L. olivacea* e *C. caretta* a partir do método de *Minimum Spanning Network*



A amostra identificada pela cor rosa com a legenda *L. olivacea/E. imbricata* (Br) foi uma sequência obtida com uma amostra do presente trabalho, coletada em agosto de 2022 em Aracati e foi identificada na planilha de dados da coleta como uma amostra de *E. imbricata* e também para o locus mitocondrial. A espécie é uma das mais relatadas na literatura em ocorrência de hibridismos juntamente com *Caretta caretta* e *Lepidochelys olivacea* (Lara-Ruiz *et al.*, 2006; Vilaça *et al.*, 2012; Proietti *et al.*, 2014; Arantes *et al.*, 2020).

A amostra foi considerada como possível híbrida devido as análises comparativas com o banco de dados disponível no NCBI, em que apresentou 100% de similaridade genética tanto com sequências de tartaruga oliva quanto com sequências de tartarugas de pente. Ao ser analisada na rede de haplótipos, a amostra compartilha o mesmo haplótipo tanto com sequências de *E. imbricata* como com sequências de *L. olivacea*, o que pode ser um indicativo de um possível híbrido na região ou ser uma região bem conservada para ambas as espécies, não sendo um locus interessante para fazer estudos de identificação.

No hap_2 também há uma sequência de *C. caretta* coletada no litoral do Ceará. Esta amostra apresentou divergências quando analisados os dois alelos da região nuclear alvo. Um deles está apresentado neste haplótipo (sequência *forward*) e o outro alelo se aproximou aos agrupamentos de

haplótipos referentes a *C. caretta* exclusivamente, demonstrando uma diferença nas informações genéticas entre os dois alelos para este locus. Vilaça *et al.*, 2012 trazem uma amostra de *C. caretta* que era morfológicamente identificada como *C. caretta* e também pelo locus mitocondrial, no entanto, apresentou alelos para *C. caretta* e o outro para *L. olivacea* para os loci nucleares, havendo a indicação de um híbrido de primeira geração (F1).

A costa do Ceará é uma importante área de forrageio para as tartarugas marinhas e foi descrita como uma das áreas preferenciais de forrageio para híbridos de tartaruga oliva sendo também descrita como área de desovas para tartaruga de pente e tartaruga oliva (Bomfim *et al.*, 2021; Soares *et al.*, 2021).

O compartilhamento de um mesmo haplótipo entre espécies distintas e localizações diferentes pode indicar diversos processos evolutivos. Uma explicação possível é a retenção de polimorfismo ancestral, particularmente em espécies que divergiram recentemente e que ainda compartilham variabilidade genética. Ao analisar genomas completos das espécies de tartarugas marinhas, Vilaça *et al.*, 2021 inferiram que eventos de hibridização ancestrais podem ser duradouros dentro do grupo Chelonioidea e que o fluxo gênico entre as espécies perdura até os dias atuais. As descobertas trazem discussões sobre a possibilidade de esse processo ser algo natural que ocorreria evolutivamente com essas espécies, ou se há de fato a interferência antrópica nesse sentido embora não se saiba ainda qual o real papel dessas alterações para o grupo.

Além disso, o fenômeno pode ser resultado de introgressão genética decorrente de hibridização em zonas de sobreposição geográfica, o que possibilita a troca de genes e preservação de haplótipos comuns entre espécies (Brito *et al.*, 2020). Em alguns casos, a convergência evolutiva pode explicar a presença de haplótipos similares em espécies distintas, especialmente quando pressões seletivas semelhantes atuam em ambientes análogos, reforçando a proximidade genética entre as tartarugas da família Cheloniidae (Naro-Maciel *et al.*, 2008). Esses cenários reforçam a importância de interpretar o compartilhamento de haplótipos em um contexto biogeográfico e evolutivo mais amplo, com o suporte de dados adicionais para uma compreensão mais

aprofundada da conectividade genética entre as espécies. Em estudo utilizando alelo nuclear, uma amostra de *C. caretta* encalhada em Alagoas, apresentou um haplótipo tipicamente encontrado no Indo-Pacífico em que os autores discutem sobre a possibilidade de migrações de longa distância para a espécie, conferindo uma maior probabilidade de fluxo gênico (Almeida *et al.*, 2023).

Esses resultados ressaltam a complexidade da hibridização entre as tartarugas marinhas no Brasil, onde a diversidade genética e a introgressão podem estar contribuindo para a introdução de novos alelos em populações de tartarugas marinhas, refletindo o histórico evolutivo e a dinâmica populacional dessas espécies (Bowen *et al.*, 2007; Naro-Maciel *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2010b).

5.3.2.6 Árvore filogenética para o gene *RAG1*

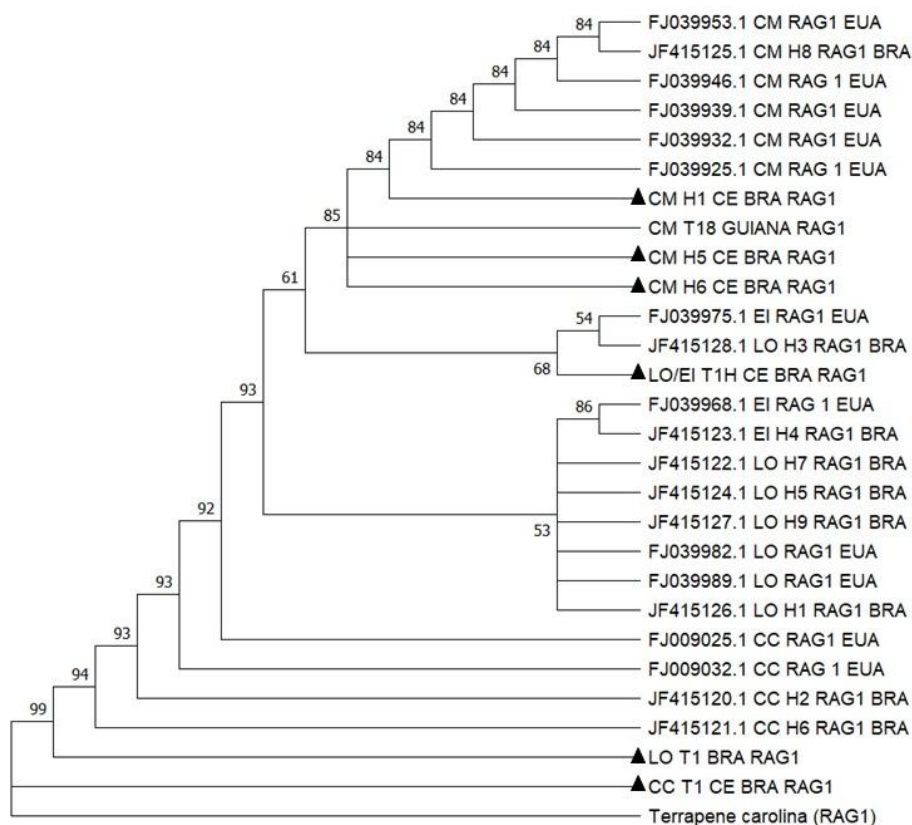
Foram incluídas nas análises as mesmas amostras utilizadas nos procedimentos anteriores, incluindo as espécies *Chelonia mydas* (CM), *Caretta caretta* (CC), *Eretmochelys imbricata* (EI) e *Lepidochelys olivacea* (LO). Os valores de *bootstrap* indicaram uma diferenciação moderada entre as populações de *C. mydas*, com vários clados mostrando suporte entre 60% e 91% (Figura 13), sugerindo a presença de variações genéticas dentro das populações dessa espécie, que podem refletir processos de isolamento geográfico ou histórico.

Com o arranjo pela árvore filogenética, podemos observar que as sequências de *C. mydas* do Brasil e EUA aparecem bem estruturadas, em um clado com valor de *bootstrap* elevado (BT=91), em que existe 3 amostras do Brasil que aparecem em outras ramificações.

Podem ser observadas também proximidades entre amostras de *E. imbricata* dos EUA e *L. olivacea* do Brasil, bem como das outras duas amostras de *L. olivacea* brasileiras, em que uma delas corresponde a valores altos de similaridade tanto com a tartaruga oliva como com a tartaruga de pente. Quando a sequência de nucleotídeos dessa amostra foi levada para consulta ao banco

de dados através do BLAST, obteve-se 100% de similaridade com o haplótipos 3 de *L. olivacea* (GenBank: JF415128.1) depositado por Vilaça *et al*, 2012 e com uma sequência depositada de *E. imbricata* (GenBank: FJ039975.1) também coletada no Atlântico (Naro-Maciel *et al.*, 2008).

Figura 13 – Árvore filogenética para o gene RAG1, construída pelo Método Neighbor-Joining, aplicando o modelo de dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1980). Números próximos aos ramos correspondem à consistência após 10.000 replicações por *Bootstrap*.



* CM (*Chelonia mydas*); CC (*Caretta caretta*); EI (*Eretmochelys imbricata*); LO (*Lepidochelys olivacea*)

As espécies *L. olivacea*, *C. caretta* e *E. imbricata*, foram observados agrupadas em alguns clados, sugerindo possíveis eventos de hibridização ou mistura genética não completamente resolvidos, consistentes com achados anteriores de introgressão genética (Vilaça *et al*, 2012; Brito *et al.*, 2020). Estes resultados reforçam a importância da análise de múltiplos marcadores genéticos

para elucidar as relações filogeográficas e a dinâmica evolutiva dessas populações de tartarugas marinhas.

O gene RAG1 pode ser utilizado para se verificar as diferenças genéticas dos dois alelos pertencentes ao animal, um disponibilizado pela fêmea e o outro pelo macho. Essa estratégia pode ser extremamente eficaz se comparada a análises de regiões mitocondriais, para se compreender o material genético de forma mais completa. Essas informações são relevantes para se conseguir compreender questões ecológicas sobre comportamento e ecologia do grupo.

5.3.3 Gene *RAG2*

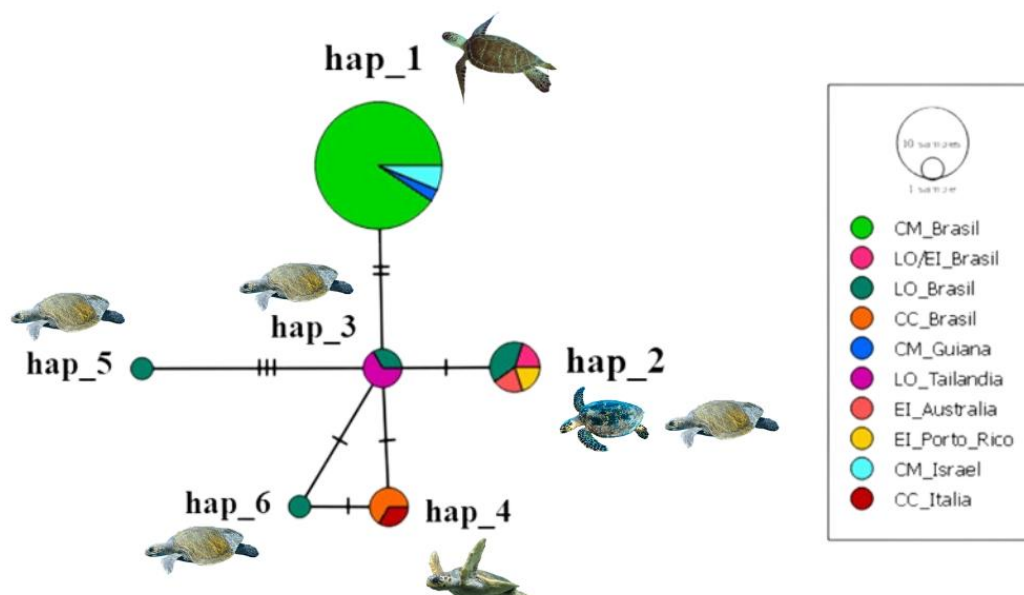
Para os resultados utilizando amostras amplificadas com o gene nuclear RAG 2 só foi possível realizar as análises referentes a rede de haplótipos através do POPart, utilizando os alinhamentos do software MEGA e a árvore filogenética devido à baixa quantidade de amostras.

5.3.3.1 Rede de haplótipos para o gene *RAG2*

Para o gene RAG2, foram identificados seis haplótipos (Figura 14), formados pelas amostras das quatro espécies de tartarugas marinhas estudadas: *C. mydas* (CM; n=32), *E. imbricata* (EI; n= 3), *C. caretta* (CC; n= 3) e *L. olivacea* (LO; n= 7), distribuídas em populações do Brasil, Guiana, Tailândia, Austrália, Porto Rico, Israel e Itália.

Apesar de uma maior quantidade de locais diferentes incluídos nas análises, a baixa quantidade de espécies por local não permitiu que fossem feitas as análises genéticas comparativas entre as populações, sendo possível apenas as abordagens pela rede de haplótipos e as relações filogenéticas.

Figura 14 - Rede de haplótipos para o gene nuclear RAG2 com as sequências de *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea* e *Caretta caretta* do Brasil, EUA e Guiana a partir do método de *Minimum Spanning Network*



O hap_1 é o haplótipo mais comum, compartilhado por amostras de *C. mydas* do Brasil, Israel e Guiana, incluindo todas as amostras da espécie neste haplótipo, indicando uma baixa diversidade genética para essas localidades. Tartarugas verdes quando analisadas sob a perspectiva de microssatélites e de mtDNA, apresentaram conectividade genética entre regiões do Atlântico, Pacífico e Índico (Roberts; Schwartz; Karl, 2004).

Os haplótipos 3, 5 e 6 pertencem a espécie *L. olivacea*, em que o hap_3 é compartilhado por amostras da Tailândia e do Brasil e os demais são de amostras únicas do Brasil em que o hap_6 foi descrito como o Hap4 por Vilaça *et al* (2012) e o hap_5 é uma amostra do presente estudo, que possui 3 sítios polimórficos de diferenciação das amostras do hap_3.

Na literatura, testes com loci de microssatélites indicam uma divergência genética entre as populações de *C. mydas* do Oceano Atlântico e Pacífico (Roberts; Schwartz; Karl, 2004). O mesmo estudo sugere ainda uma relação entre as populações do oceano Índico e atlântico, indicando misturas genéticas interoceânicas de baixo nível, que podem ser observadas devido as altas taxas mutacionais das regiões estudadas, destacando a conectividade

intraoceânica e apontando a possível migração entre bacias oceânicas como um fenômeno biológico significativo.

Para *L. olivacea*, o resultado indica que pode haver uma proximidade genética de populações de diferentes oceanos, como da Tailândia (Pacífico) e Brasil (Atlântico), corroborando com a hipótese de conectividades intraoceânicas de tartarugas marinhas (Roberts; Schwartz; Karl, 2004). Tartarugas-oliva de estoques da Costa Rica, América central e México, apresentam rasa estrutura populacional, com uma ampla conectividade destas regiões (Silver-Gorges *et al.*, 2019), enquanto as amostras do presente estudo apresentaram algumas divergências genéticas importantes, mesmo para o grupo amostral do apenas do Oceano Atlântico.

O hap_4 engloba amostras de *C. caretta* do Brasil e da Itália, indicando novamente uma proximidade genética para a espécie entre localidades geograficamente distantes.

A hipótese do corredor de águas quentes, pode ser uma explicação para essa ocorrência. Modelos baseados em coalescência, indicam que em período interglaciais quentes as águas entre o Atlântico e o sudoeste do oceano Índico formavam um corredor, em que as tartarugas poderiam migrar entre os dois oceanos (van der Zee *et al.*, 2021). Desse modo, há a possibilidade de troca entre os estoques genéticos das populações desses diferentes oceanos, corroborando com o presente estudo.

Existe também a hipótese de que essa região do DNA amplificado específica para *L. olivacea* seja bem conservada entre ambas as espécies, parecendo ser uma região que não é interessante para identificação de espécie, mas que pode trazer informações importantes acerca da ocorrência de indivíduos híbridos quando estudada em concomitância a outras regiões nucleares, incluindo os dois alelos e regiões mitocondriais.

É interessante observar também que entre as espécies, há a diferença de apenas um ou dois nucleotídeos, indicando que embora sejam de espécies diferentes, as tartarugas marinhas possuem sequências de material genético muito similares. Este fato pode ter relação com a facilidade de cruzamento entre as espécies, havendo o nascimento de filhotes híbridos.

Já o hap_2 (Figura 15), é um haplótipo compartilhado por duas espécies diferentes, *L. olivacea* e *E. imbricata*, do Brasil, Porto Rico e Austrália. Assim como ocorreu com o gene RAG1, a mesma amostra identificada pelo gene mitocondrial COI como *E. imbricata*, apresentando 100% de similaridade com sequências de tartaruga oliva e de tartarugas de pente e agrupou-se neste haplótipo, juntamente com amostras de *L. olivacea*, indicando uma similaridade de amostras de diferentes espécies e de diferentes locais geográficos. Já que o locus mitocondrial indicou a espécie como *E. imbricata*, significa inferir que a fêmea geradora desse genótipo era uma tartaruga de pente. No entanto, com relação ao macho, há a possibilidade de ele ser tartaruga cabeçuda ou tartaruga de pente, em vista dos haplótipos pertencentes aos loci nucleares serem compatíveis com mais de uma espécie de tartaruga marinha.

Figura 15 - Detalhe da rede de haplótipos para o gene nuclear RAG2 mostrando o haplótipo hap_2 compartilhado por *E. imbricata*, *L. olivacea* e *C. caretta* a partir do método de *Minimum Spanning Network*



Haplótipos compartilhados por diferentes espécies de tartarugas marinhas foram relatados, confirmando a ocorrência de hibridismo principalmente de *L. olivacea* x *E. imbricata* e de *L. olivacea* x *Caretta caretta* e de *C. caretta* x *E. imbricata*, mas com evidências também de estoques multiespécies de *C. caretta* x *E. imbricata* x *C. mydas* (Brito *et al.*, 2020; Vilaça *et al.*, 2012). Discute-se que esse fato pode ocorrer por exemplo por fatores de

introgressão, em que as espécies coexistem em determinadas épocas do ano nos mesmos locais, o que permite o endocruzamento entre os indivíduos de espécies diferentes. Outra hipótese é de que alguma pressão evolutiva pode ter interferido ao tornar essa região do DNA muito conservada nas diferentes espécies, conservando algumas informações genéticas.

Em seu estudo de 2012, Vilaça e seus colaboradores, trazem a ocorrência de uma ninhada que apresentou 3 genótipos diferentes (EI, LO e CM), apresentados quando estudados em loci nucleares. Uma fêmea híbrida aparenta ter mais probabilidade de se reproduzir com machos de espécies diferentes, o que pode aumentar as possibilidades de variações genéticas na segunda geração, reforçando a complexidade da estrutura genética do grupo.

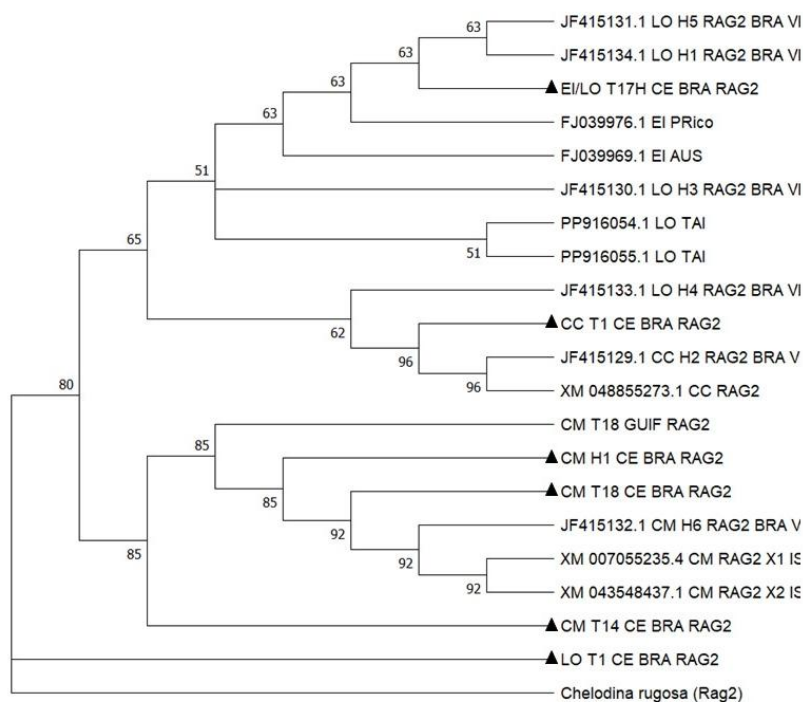
5.3.3.2 Árvore filogenética para o gene RAG2

As espécies *Chelonia mydas* (CM), *Caretta caretta* (CC), *Eretmochelys imbricata* (EI) e *Lepidochelys olivacea* (LO) foram analisadas com base em sequências obtidas de diferentes regiões geográficas (Figura 16). Os valores de *bootstrap* indicam valores moderados para a maioria dos agrupamentos de *C. mydas*, com destaque para algumas populações brasileiras que formaram clados bem definidos, com suporte de até 63%.

Observou-se valores consideráveis para as populações de *C. caretta*, com valores de *bootstrap* de 83%, sugerindo a possibilidade de estruturas populacionais distintas mesmo entre as amostras brasileiras.

No entanto, alguns agrupamentos envolvendo *L. olivacea* e *E. imbricata*, mostraram suporte mais baixo, com valores de *bootstrap* abaixo de 50%, o que pode refletir possibilidades de hibridização ou complexidade genética não totalmente resolvida. A amostra sugestiva de possibilidade de hibridismo nas análises anteriores identificada como EI/LO_T17H_CE_BRA_RAG2, ficou posicionada entre clados de *E. imbricata* e *L. olivacea*, indicando novamente uma relação entre essas duas espécies.

Figura 16 – Árvore filogenética para o gene RAG2, construída pelo Método Neighbor-Joining, aplicando o modelo de dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1980). Números próximos aos ramos correspondem à consistência após 10.000 replicações por Bootstrap



* CM (*Chelonia mydas*); CC (*Caretta caretta*); EI (*Eretmochelys imbricata*); LO (*Lepidochelys olivacea*)

Esses resultados sugerem que estudos complementares com maior número de marcadores genéticos podem ser necessários para esclarecer as relações filogeográficas e a presença de híbridos entre essas espécies de tartarugas marinhas.

Quanto às análises dos genes, o gene RAG1 parece ser o que mais trouxe informações relevantes para compreender as relações filogeográficas entre as populações. Por ter obtido resultados diferentes para algumas sequências mitocondriais e nucleares, é importante que sejam feitas mais análises, com mais amostras e utilizando outras regiões mitocondriais e nucleares.

6 CONCLUSÕES

As análises realizadas destacam o litoral do Ceará como uma região de alta diversidade genética e de significativo compartilhamento de haplótipos com outras regiões do mundo, reforçando sua importância para a conservação das tartarugas marinhas.

Houve divergências de dados entre os resultados obtidos pelas sequências de DNA mitocondrial e nucleares, reforçando a ideia de que é imprescindível o uso de loci nucleares nas análises genéticas para a espécie. Algumas sequências apresentaram divergências quando analisadas sob os diferentes alelos, juntamente com a porção mitocondrial, o que pode ser um indicativo de hibridização entre espécies que utilizam o Ceará como rota migratória.

Para as sequências nucleares, houve haplótipos compartilhados entre *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea* e *Caretta caretta*. Essas regiões podem ser comuns a diferentes espécies ou estes resultados podem indicar que um dos alelos nucleares seja referente a uma espécie diferente da identificada na progênie. Esses resultados indicam uma proximidade genética entre diferentes populações de tartarugas marinhas, o que pode facilitar o cruzamento efetivo entre diferentes espécies e a disseminação desses haplótipos comuns em diferentes populações através do fluxo gênico, permeado pelo comportamento migratório do grupo.

Adicionalmente, foi possível identificar regiões altamente conservadas entre diferentes espécies, destacando elementos genéticos fundamentais para sua conservação e evolução. Contudo, a ausência de dados disponíveis na literatura representa uma limitação significativa, dificultando estudos mais aprofundados e diversificados sobre a genética populacional das espécies na região.

Como contribuição relevante, foram incluídas 102 sequências, abrangendo genes mitocondriais e nucleares, no banco público de dados de sequências de nucleotídeos, aumentando as possibilidades de futuros estudos genéticos que utilizem amostras do litoral do Ceará. Por fim, os resultados ressaltam a necessidade de esforços contínuos para a conservação dessa área, que se

configura como um habitat crítico para quatro espécies de tartarugas marinhas, reforçando sua relevância ecológica e genética no cenário global.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante destacar a relevância dos trabalhos de monitoramento de praias, que realizam o patrulhamento de áreas de relevante importância para a conservação de espécies marinhas, incluindo quelônios, mamíferos e aves. Essas atividades são essenciais para se compreender quais áreas precisam de atenção quanto a conservação das diferentes espécies, incluindo espécies em risco de extinção, como é o caso das tartarugas marinhas.

É importante que mais estudos sejam realizados utilizando marcadores moleculares de regiões mitocondriais e nucleares, incluindo amostras adicionais e de diferentes locais, realizando a análise para cada alelo nuclear separadamente. Acrescentar também informações de outras regiões do DNA pode trazer inferências significativas acerca das alterações genéticas que podem estar ocorrendo entre as populações.

Por se tratar de espécies que hibridizam entre si, é de extrema importância a análise das sequências com mais loci nucleares juntamente com outras regiões mitocondriais, afim de analisar as cargas genéticas vindas da fêmea e do macho, para se compreender as formações dos estoques genéticos das populações.

Para os estudos de genética de populações as dificuldades estavam relacionadas a quantidade de amostras tanto obtidas no estudo quanto disponíveis no banco de dados GenBank. Assim, é importante que sejam depositadas mais sequências incluindo possibilitando uma maior diversidade de genes e locais de amostragem, para que possam ser realizadas inferências acerca das relações filogeográficas de forma mais robusta. As informações genéticas são essenciais para se compreender o direcionamento evolutivo das populações atuais de tartarugas marinhas, em que este tipo de informação pode dar suporte para esforços de conservação das espécies.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. P.; MARQUES, O. K.; MOTT, T.; SANTOS, R. G. Hybridization and genetic characterization of sea turtles in Alagoas, northeastern Brazil. **Marine Biology**, v. 170, n. 2, p. 14, 2023.
- ARANTES, L. S.; VILAÇA, S. T.; MAZZONI, C. J.; SANTOS, F. R. New genetic insights about hybridization and population structure of hawksbill and loggerhead turtles from Brazil. **Journal of Heredity**, [s. l.], v. 111, n. 5, p. 444–456. 2020. DOI: 10.1093/jhered/esaa024.
- ARTHUR, K. E.; BOYLE, M. C.; LIMPUS, C. J. Ontogenetic changes in diet and habitat use in green sea turtle (*Chelonia mydas*) life history. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 362, p. 303–311, 2008. DOI: 10.3354/MEPS07440. Disponível em: <https://www.int-res.com/abstracts/meps/v362/p303-311/>.
- BALTAZAR-SOARES, M.; KLEIN, J. D.; CORREIA, S. M.; REISCHIG, T.; TAXONERA, A.; ROQUE, S. M.; EIZAGUIRRE, C. Distribution of genetic diversity reveals colonization patterns and philopatry of the loggerhead sea turtles across geographic scales. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 2020.
- BANDELT, H. J., FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 16, n. 1, 37-48, 1999.
- BAPTISTOTTE C.; THOMÉ J. C. A.; BJORNDAL K. A., Reproductive biology and conservation status of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in Espírito Santo State, Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 4, n. 3-2003, 2003.
- BAPTISTOTTE, C.; SCALFONI, J. T.; MROSOVSKY, N. Male-producing thermal ecology of a southern loggerhead turtle nesting beach in Brazil: implications for conservation. **Animal Conservation forum**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 9–13, 1999. DOI: 10.1111/J.1469-1795.1999.TB00043.X.
- BARATA, R. A.; BODEVAN, E. C.; DE SOUZA KIRCHPFENNIG, F. Survey of parasites in sea turtles rescued off the coast of Santa Catarina and Paraná, Brazil (2020-2022) and their relationship with marine pollution. **Marine Pollution Bulletin**, n. 201, 2024.
- BARLEY, A. J.; SPINKS, P. Q.; THOMSON, R. C.; SHAFFER, H. B. Fourteen nuclear genes provide phylogenetic resolution for difficult nodes in the turtle tree of life. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 1189–1194, 2010. b. DOI: 10.1016/j.ympev.2009.11.005.
- BARLEY, A. J.; SPINKS, P. Q.; THOMSON, R. C.; SHAFFER, H. B.. Molecular Phylogenetics and Evolution Fourteen nuclear genes provide phylogenetic resolution for difficult nodes in the turtle tree of life. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 1189–1194, 2010. a. DOI:

10.1016/j.ympev.2009.11.005. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2009.11.005>.

BAUDOUIN, M.; DE THOISY, B.; CHAMBAULT, P.; BERZINS, R.; ENTRAYGUES, M.; KELLE, L.; TURNY, A.; LE MAHO, Y.; CHEVALLIER, D. Identification of key marine areas for conservation based on satellite tracking of post-nesting migrating green turtles (*Chelonia mydas*). **Biological Conservation**, [s. l.], v. 184, p. 36–41, 2015. a. DOI: 10.1016/J.BIOCON.2014.12.021. Acesso em: 14 jul. 2023.

BELLINI, C.; SANTOS, A. J. B.; GROSSMAN, A.; MARCOVALDI, M. A.; BARATA, P. C. R. Green turtle (*Chelonia mydas*) nesting on Atol das Rocas, north-eastern Brazil, 1990–2008. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 1117–1132, 2013. DOI: 10.1017/S002531541200046X. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-the-marine-biological-association-of-the-united-kingdom/article/abs/green-turtle-chelonia-mydas-nesting-on-atol-das-rocas-northeastern-brazil-19902008/0988E58DAC4CC2FB1802FAE803715901>. Acesso em: 15 jul. 2023.

BELLINI, Claudio. Reproduction and Feeding of Marine Turtles in the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. **Marine Turtle Newsletter**, [s. l.], v. 74, p. 12–13, 1996. Acesso em: 15 jul. 2023.

BEZERRA, M. F.; LACERDA, L. D.; COSTA, B. G. B.; LIMA, E. H. S. M. Mercury in the sea turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1958) from Ceará coast, NE Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 123–128, 2012. DOI: 10.1590/S0001-37652012000100012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/pVwfyTfrsSwBsGYKHwhPdRk/?lang=en>. Acesso em: 15 jul. 2023.

BJORNDAL, K. A.; BOLTEN, A. B.; MOREIRA, L.; BELLINI, C.; MARIA, Â. Population Structure and Diversity of Brazilian Green Turtle Rookeries Based on Mitochondrial DNA Sequences. **Chelonian Conservation and Biology**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 262–268, 2006.

BOMFIM, A. da C.; DE FARIAS, D. S.; SILVA, F. J. de L.; ROSSI, S.; GAVILAN, S. A.; DA SILVA, Vinícius G. S.; PONTES, C. S. Long-term monitoring of marine turtle nests in northeastern Brazil. **Biota Neotropica**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. e20201159, 2021. DOI: 10.1590/1676-0611-BN-2020-1159. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bn/a/TnyrH7zmRRgTkCSFBXBZFct/?lang=en>. Acesso em: 13 jul. 2023.

BONFIM, W. A.; OLIVEIRA, B. S. S. P.; SANTOS, C. R. M.; MEDEIROS, L. S.; LA FUENTE, M. F. First live stranding of a leatherback sea turtle *Dermochelys coriacea* in Alagoas, north-east Brazil. **Herpetological Bulletin**, [s. l.], v. 160, p. 35–37, 2022. DOI: 10.33256/hb160.3537.
BOWEN, B. W.; ABREU-GROBOIS, F. A.; BALAZS, G. H.; KAMEZAKI, N.; LIMPUS, C. J.; FERL, R. J. Trans-Pacific migrations of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) demonstrated with mitochondrial DNA markers. **Proceedings**

of the National Academy of Sciences of the United States of America, [s. l.], v. 92, n. 9, 1995. DOI: 10.1073/pnas.92.9.3731.

BOWEN, B. W.; BASS, A. L.; SOARES, L.; TOONEN, R. J. Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). **Molecular ecology**, v. 4, n. 8, p. 2389-2402, 2005.

BOWEN, B. W.; KAMEZAKI, N.; LIMPUS, C. J.; HUGHES, G. R.; MEYLAN, A. B.; AVISE, J. C. Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. **Evolution**, v. 48, n. 6, p. 1820-1828, 1994.

BOWEN, B. W.; KARL, S. A. Population genetics and phylogeography of sea turtles. **Molecular ecology**, [s. l.], v. 16, n. 23, p. 4886–4907, 2007. DOI: 10.1111/J.1365-294X.2007.03542.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17944856/>. Acesso em: 7 jul. 2023.

BOYLE, M. C.; FITZSIMMONS, N. N.; LIMPUS, C. J.; KELEZ, S.; VELEZ-ZUAZO, X.; WAYCOTT, M. Evidence for transoceanic migrations by loggerhead sea turtles in the southern Pacific Ocean. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 276, n. 1664, p. 1993–1999, 2009. DOI: 10.1098/RSPB.2008.1931. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2008.1931>. Acesso em: 8 jul. 2023.

BRADSHAW, P. J.; BRODERICK, A. C.; CARRERAS, C.; FULLER, W.; SNAPE, R. T. E.; WRIGHT, L. I.; GODLEY, B. J. Defining conservation units with enhanced molecular tools to reveal fine scale structuring among Mediterranean green turtle rookeries. **Biological Conservation**, [s. l.], v. 222, p. 253–260, 2018. DOI: 10.1016/j.biocon.2017.12.014.

BRISCOE, D. K.; PARKER, D. M.; BALAZS, G. H.; KURITA, M.; SAITO, T.; OKAMOTO, H.; RICE, M.; POLOVINA, J. J.; CROWDER, L. B. Active dispersal in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) during the 'lost years'. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 283, n. 1832, 2016. DOI: 10.1098/RSPB.2016.0690. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2016.0690>. Acesso em: 15 jul. 2023.

BRITO, C.; VILAÇA, S. T.; LACERDA, A.; MAGGIONI, R.; MARCOVALDI, M. Â.; VÉLEZ-RUBIO, G.; PROIETTI, M. C. Combined use of mitochondrial and nuclear genetic markers further reveal immature marine turtle hybrids along the south western Atlantic. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2019-0098.

BROTHERS, J. R. LOHMANN, K. J. Evidence for geomagnetic imprinting and magnetic navigation in the natal homing of sea turtles. **Current Biology**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 392–396, 2015. DOI: 10.1016/j.cub.2014.12.035. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0960982214016388/fulltext>. Acesso em: 14 jul. 2023.

BUGONI, L.; KRAUSE, L.; PETRY, M. V. Marine debris and human impacts on sea turtles in Southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 42, n. 12, 2001. DOI: 10.1016/S0025-326X(01)00147-3.

CÁCERES-FARIAS, L.; RESÉNDIZ, E.; ESPINOZA, J.; FERNÁNDEZ-SANZ, H.; ALFARO-NÚÑEZ, A. Threats and Vulnerabilities for the Globally Distributed Olive Ridley (*Lepidochelys olivacea*) Sea Turtle: A Historical and Current Status Evaluation. **Animals** **2022**, Vol. **12**, Page **1837**, [s. l.], v. 12, n. 14, p. 1837, 2022. DOI: 10.3390/ANI12141837. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/12/14/1837/htm>. Acesso em: 15 jul. 2023.

CAMACHO-SÁNCHEZ, F. Y.; AGUIRRE, A. A.; NARVÁEZ-ZAPATA, J. A.; ZAVALA-NORZAGARAY, A. A.; LEY-QUIÑÓNEZ, C. P.; ACOSTA-SÁNCHEZ, H. H.; RODRIGUEZ-GONZÁLEZ, H.; DELGADO-TREJO, C.; REYES-LÓPEZ, M. A. (2021). Dna barcode analysis of the endangered green turtle (*Chelonia mydas*) in mexico. **Genome**, v. 64, n. 9, p. 879-891, 2021. <https://doi.org/10.1139/gen-2019-0213>

CAMACHO-SÁNCHEZ, F. Y.; NARVÁEZ-ZAPATA, J. A.; ACOSTA-SÁNCHEZ, H. H.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, M.; LUZARIAGA-NEIRA, A.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, H.; AGUIRRE A. A.; REYES-LÓPEZ, M. A. Molecular Identification and Novel Mitochondrial COI Gene (*Lepidochelys kempii*) in Rancho Nuevo Sanctuary, Mexico. **Diversity**, v. 14, n. 5, p. 390, 2022.

CAMEDDA, A.; MARRA, S.; MATIDDI, M.; MASSARO, G.; COPPA, S.; PERILLI, A.; RUIU, A.; BRIGUGLIO, P.; DE LUCIA, G. A. Interaction between loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) and marine litter in Sardinia (Western Mediterranean Sea). **Marine environmental research**, v. 100, p. 25-32, 2014. DOI: 10.1016/j.marenvres.2013.12.004.

CANTOR, M; BARRETO, A. S; TAUFER, R. M; GIFFONI, B; CASTILHO, P. V; MARANHO, A; BEATRIZ C.; KOLESNIKOVAS C.; GODOY D.; ROGÉRIO D. W.; DICK J. L.; GROCH K. R.; ROSA L.; CREMER M. J.; CATTANI P.; VALLE R. R.; DOMIT C. High incidence of sea turtle stranding in the southwestern Atlantic Ocean. **ICES Journal of Marine Science**, [s. l.], v. 77, n. 5, p. 1864–1878, 2020. DOI: 10.1093/icesjms/fsaa073.

CARR, ARCHIE. New Perspectives on the Pelagic Stage of Sea Turtle Development. **Conservation Biology**, [s. l.], v. 1, n. 2, 1987. DOI: 10.1111/j.1523-1739.1987.tb00020.x.

CARRERAS, C; PASCUAL, M; CARDONA, L; MARCO, A; BELLIDO, J. J; CASTILLO, J. J.; TOMÁS, J.; RAGA, J. A.; SANFÉLIX, M.; FERNÁNDEZ, G; AGUILAR, A. Living together but remaining apart: Atlantic and mediterranean loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in shared feeding grounds. **Journal of Heredity**, v. 102, n. 6, p. 666-677, 2011. DOI: 10.1093/jhered/esr089.

CHOW, J. C.; ANDERSON, P. E.; SHEDLOCK, A. M. Sea Turtle Population Genomic Discovery: Global and Locus-Specific Signatures of Polymorphism,

Selection, and Adaptive Potential. **Genome Biology and Evolution**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 2797–2806, 2019. DOI: 10.1093/GBE/EVZ190. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/gbe/evz190>. Acesso em: 8 jul. 2023.

COLMAN, L. P.; LARA, P.; BENNIE, J.; BRODERICK, A. C.; DE FREITAS, J. R.; MARCONDES, A.; WITT, M. J.; GODLEY, B. J. Assessing coastal artificial light and potential exposure of wildlife at a national scale: the case of marine turtles in Brazil. **Biodiversity and Conservation**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 1135–1152, 2020. DOI: 10.1007/S10531-019-01928-Z/FIGURES/3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10531-019-01928-z>. Acesso em: 15 jul. 2023.

COLMAN, L. P.; SAMPAIO, C. L. S.; WEBER, M. I.; DE CASTILHOS, J. C. Diet of Olive ridley sea turtles, *Lepidochelys olivacea*, in the waters of Sergipe, Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, [s. l.], v. 13, n. 2, 2014. DOI: 10.2744/CCB-1061.1.

COLMAN, L. P.; THOMÉ, J. C. A.; ALMEIDA, A.; BAPTISTOTTE, C.; PAULO, P. C.; BRODERICK, A. C.; RIBEIRO, F. A.; VILA-VERDE, L.; GODLEY, B. J. Thirty years of leatherback turtle *Dermochelys coriacea* nesting in Espírito Santo, Brazil, 1988-2017: Reproductive biology and conservation. **Endangered Species Research**, v. 39, p. 147-158, 2019. DOI: 10.3354/esr00961.

DA SILVA, A. C. C. D.; DE CASTILHOS, J. C.; LOPEZ, G. G.; BARATA, P. C. R. Nesting biology and conservation of the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) in Brazil, 1991/1992 to 2002/2003. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, [s. l.], v. 87, n. 4, p. 1047–1056, 2007. DOI: 10.1017/S0025315407056378. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-the-marine-biological-association-of-the-united-kingdom/article/abs/nesting-biology-and-conservation-of-the-olive-ridley-sea-turtle-lepidochelys-olivacea-in-brazil-19911992-to-20022003/277E91F4C87AA10941AA2D9745F74265>. Acesso em: 15 jul. 2023.

DAY, J.; HALL, J.; ROSE, K.; VINETTE HERRIN, K.; MARCH, D.; PITT, O.; FITZSIMMONS, N. N.; HALL, L.; MARSHALL, K.; IREDELL, S.; MEAGHER, P. Mixed stock analysis identifies natal origins of green turtles at foraging grounds in southeastern Australia. **Frontiers in Marine Science**, n. 11, 2024.

DE OLIVEIRA, Y. C. B. B.; RIVERA, D. N.; DE ALAGÃO QUERIDO, L. C.; DA SILVA MOURÃO, J. Critical areas for sea turtles in Northeast Brazil: a participatory approach for a data-poor context. **PeerJ**, v. 12, 2024.

DOLFO, V.; GASPAR, C.; BOURJEA, J.; TATARATA, M.; PLANES, S.; BOISSIN, E. Population genetic structure and mixed stock analysis of the green sea turtle, *Chelonia mydas*, reveal reproductive isolation in French Polynesia. **Frontiers in Marine Science**, n. 10, 2023.

DOS SANTOS OLIVEIRA, G. C.; CORSO, G.; MEDEIROS, D. M.; DE MENDONÇA SILVA, I.; SANTOS, A. J. B.; NAKAMURA, M. F.; LIMA, G. D. S.

Later Nesting by Hawksbill Turtle following Sea Surface Warming. **Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 371–377, 2020. DOI: 10.1670/19-062.

EVANS, D. R.; VALVERDE, R. A.; ORDOÑEZ, C.; CARTHY, R. R. Identification of the Gulf of Mexico as an important high-use habitat for leatherback turtles from Central America. **Ecosphere**, [s. l.], v. 12, n. 8, 2021. DOI: 10.1002/ecs2.3722.

FERNANDES, A.; BONDIOLI, A. C. V.; SOLÉ, M.; SCHIAVETTI, A. Seasonal Variation in the Behavior of Sea Turtles at a Brazilian Foraging Area. **Chelonian Conservation and Biology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 93–102, 2017. DOI: 10.2744/CCB-1200.1. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2744/CCB-1200.1>. Acesso em: 13 jul. 2023.

FITZSIMMONS, N. N.; PITTARD, S. D.; MCINTYRE, N.; JENSEN, M. P., GUINEA, M., HAMANN, M.; KENNETT R.; LEIS B.; LIMPUS, J. C.; LIMPUS, D. J.; MCCANN, M. J.; MACDONALD, A. J.; MCFARLANE, G.; PARMENTER, C. J.; PENDOLEY, K.; PRINCE, R.; SCHELTINGA, L.; THEISSINGER, K; TUCKER, A. D.; WAAYERS, D.; WHITING, A.; WHITING, S. Phylogeography, genetic stocks, and conservation implications for an Australian endemic marine turtle. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 440–460, 2020. DOI: 10.1002/AQC.3270. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/aqc.3270>. Acesso em: 15 jul. 2023.

FONSECA, L. G.; VILLACHICA, W. N.; RANGEL, E.; PALOLA, E.; GILBERT, M.; VALVERDE, R. A. Reassessment of the olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* nesting population at Nancite Beach, Costa Rica. **Marine Ecology**, [s. l.], p. e12761, 2023. DOI: 10.1111/MAEC.12761. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/maec.12761>. Acesso em: 15 jul. 2023.

FRANDSEN, H. R.; FIGUEROA, D. F.; GEORGE, J. A. Mitochondrial genomes and genetic structure of the Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*). **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 249-262, 2020. <https://doi.org/10.1002/ece3.5891>

FRAZIER, J. Marine Turtles : The Role of Flagship Species in Interactions Between People and the Sea. **Montana The Magazine Of Western History**, [s. l.], v. 3, n. 2, 2005.

FUKUOKA, T.; YAMANE, M.; KINOSHITA, C.; NARAZAKI, T.; MARSHALL, G. J.; ABERNATHY, K. J.; MIYAZAKI, N.; SATO, K.. The feeding habit of sea turtles influences their reaction to artificial marine debris. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, 2016. DOI: 10.1038/srep28015.

GALLO, B. M., MACEDO, S., GIFFONI, B. D. B., BECKER, J. H., & BARATA, P. C. Sea turtle conservation in Ubatuba, southeastern Brazil, a feeding area with incidental capture in coastal fisheries. **Chelonian conservation and biology**, v. 5, n. 1, p. 93-101, 2006.

GAOS, Alexander R. *et al.* Hawksbill Nesting in Hawai'i: 30-Year Dataset Reveals Recent Positive Trend for a Small, Yet Vital Population. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 8, p. 770424, 2021. DOI: 10.3389/FMARS.2021.770424/BIBTEX. Acesso em: 15 jul. 2023.

GAROFALO, L.; MASTROGIACOMO, A.; CASALE, P.; CARLINI, R.; ELEN, C.; FREGGI, D.; GELLI, D.; KNITTWEIS, L.; MIFSUD, C.; MINGOZZI, T.; NOVARINI, N.; SCARAVELLI, D.; SCILLITANI, G.; OLIVERIO, M.; NOVELLETTO, A. Genetic characterization of central Mediterranean stocks of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) using mitochondrial and nuclear markers, and conservation implications. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 868–884, 2013. DOI: 10.1002/aqc.2338.

GAROFALO, L.; MINGOZZI, T.; MICÒ, A.; NOVELLETTO, A. Loggerhead turtle (*Caretta caretta*) matriline in the Mediterranean: further evidence of genetic diversity and connectivity. **Marine Biology**, v. 156, p. 2085-2095, 2009.

GARZON, F.; BARRIENTOS, C.; ANVENE, R. E.; MBA, F. E., FALLABRINO, A.; FORMIA, A.; GODLEY, B. J.; GONDER, M. K.; PRIETO, C. M.; AYETEBE, J. MBA; METCALFE, K.; MONTGOMERY, D.; NSOGO, J.; NZE, J. O.; POSSARDT, E.; SALAZAR, E. R.; TIWARI, M.; WITT, M. J. Spatial ecology and conservation of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) nesting in Bioko, Equatorial Guinea. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. e0286545, 2023. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0286545. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0286545>. Acesso em: 15 jul. 2023.

GODLEY, B. J.; LIMA, E. H. S. M.; ÅKESSON, S.; BRODERICK, A. C.; GLEN, F.; GODFREY, M. H.; LUSCHI, P.; HAYS, G. C. Movement patterns of green turtles in Brazilian coastal waters described by satellite tracking and flipper tagging. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 253, p. 279–288, 2003. DOI: 10.3354/MEPS253279. Disponível em: <https://www.int-res.com/abstracts/meps/v253/p279-288/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

HART, K. M.; GUZY, J. C.; SMITH, B. J. Drivers of realized satellite tracking duration in marine turtles. **Movement Ecology**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2021. DOI: 10.1186/s40462-020-00237-3.

HAYS, G. C.; HAWKES, L. A. Satellite tracking sea turtles: Opportunities and challenges to address key questions. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, p. 432, 2018. DOI: 10.3389/fmars.2018.00432.

HAYS, G. C.; SCOTT, R. Global patterns for upper ceilings on migration distance in sea turtles and comparisons with fish, birds and mammals. **Functional Ecology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 748–756, 2013. DOI: 10.1111/1365-2435.12073. Acesso em: 14 jul. 2023.

IVAR DO SUL, J. A.; SANTOS, I. R.; FRIEDRICH, A. C.; MATTHIENSEN, A.; FILLMANN, G. Plastic Pollution at a Sea Turtle Conservation Area in NE Brazil: Contrasting Developed and Undeveloped Beaches. **Estuaries and Coasts**, [s. l.], v. 34, n. 4, 2011. DOI: 10.1007/s12237-011-9392-8.

JEFFERS, V. F.; GODLEY, B. J. Satellite tracking in sea turtles: How do we find our way to the conservation dividends? **Biological Conservation**, [s. l.], v. 199, 2016. DOI: 10.1016/j.biocon.2016.04.032.

JENSEN, M. P.; FITZSIMMONS, N. N.; BOURJEA, J.; HAMABATA, T.; REECE, J.; DUTTON, P. H. The evolutionary history and global phylogeography of the green turtle (*Chelonia mydas*). **Journal of Biogeography**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 860–870, 2019. DOI: 10.1111/JBI.13483. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jbi.13483>. Acesso em: 15 jul. 2023.

JOSEPH, J.; SHAW, P. W. Multiple paternity in egg clutches of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*). **Conservation Genetics**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 601–605, 2011. DOI: 10.1007/S10592-010-0168-7. Acesso em: 15 jul. 2023.

LEE, P. L. M.; LUSCHI, P.; HAYS, G. C. Detecting female precise natal philopatry in green turtles using assignment methods. **Molecular Ecology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 61–74, 2007. DOI: 10.1111/J.1365-294X.2006.03115.X. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-294X.2006.03115.x>. Acesso em: 15 jul. 2023.

LEE, P. L.; SCHOFIELD, G.; HAUGHEY, R. I.; MAZARIS, A. D.; HAYS, G. C. A Review of Patterns of Multiple Paternity Across Sea Turtle Rookeries. **Advances in Marine Biology**, v. 79, p. 1-31, 2018. DOI: 10.1016/bs.amb.2017.09.004.

LEIGH, J. W., BRYANT D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in ecology and evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110-1116, 2015.

LIMA E. H. S. M.; MELO M. T. D.; GODFREY M. H. Incidental Capture of a Leatherback Along the Coast of Ceara, Brazil seaturtle. **Marine Turtle Newsletter**, v. 117, n. 11, 2007. Acesso em: 15 jul. 2023.

LIMA, E. H. S. M., MELO, M. T. D., GODFREY, M. H., & BARATA, P. C. Sea Turtle in the Waters of Almofala, Ceará, in Northeastern Brazil, 2001-2010. **Marine Turtle Newsletter**, [s. l.], v. 137, n. 137, 2013.

LIMA, E. H., MELO, M. T. D.; FERREIRA, F. D. A. First Record of Green Turtle (*Chelonia mydas*) Nesting in Almofala, Western Coast of Ceará, Brazil. **Marine Turtle Newsletter**, n. 156, p. 3-4, 2019.

LIMA, E. P. E.; WANDERLINDE, J.; DE ALMEIDA, D. T.; LOPEZ, G.; GOLDBERG, D. W. Nesting Ecology and Conservation of the Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*) in Rio de Janeiro, Brazil. **Chelonian Conservation and**

Biology, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 249–254, 2012. DOI: 10.2744/CCB-0996.1. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2744/CCB-0996.1>. Acesso em: 15 jul. 2023.

LOHMANN, K. J., LOHMANN, C. M., BROTHERS, J. R., & PUTMAN, N. F. Natal Homing and Imprinting in Sea Turtles. **The biology of sea turtles**, v. 3, p. 59-78, 2013. DOI: 10.1201/b13895-4.

LOHMANN, K. J.; LOHMANN, C. M. F. There and back again: Natal homing by magnetic navigation in sea turtles and salmon. **Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 222, n. Suppl_1, 2019. DOI: 10.1242/JEB.184077/2790. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1242/jeb.184077>. Acesso em: 15 jul. 2023.

LUCCHETTI, A.; SALA, A. An overview of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) bycatch and technical mitigation measures in the Mediterranean Sea. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 20, p. 141-161, 2010. DOI: 10.1007/s11160-009-9126-1.

LUDWIG, S.; AMORIM, L.; BARCELOS, A. C.; GUIMARÃES, P.; MEDEIROS, L.; ERICKSON, J.; VARGAS, S. M. Going deeper into the molecular ecology of the Southwest Atlantic *Caretta caretta* (Testudinata: Cheloniidae), what do microsatellites reveal to us?. **Marine Biology**, v. 170, n. 7, p. 78, 2023.

LUSCHI, P.; HAYS, G. C.; DEL SEPPIA, C.; MARSH, R.; PAPI, F. The navigational feats of green sea turtles migrating from Ascension Island investigated by satellite telemetry. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 265, n. 1412, 1998. DOI: 10.1098/rspb.1998.0571.

LUSCHI, P.; HAYS, G. C.; PAPI, F. A review of long-distance movements by marine turtles, and the possible role of ocean currents. **Oikos**, v. 103, n. 2, p. 293-302, 2003. DOI: 10.1034/j.1600-0706.2003.12123.x.

MANCINO, C.; CANESTRELLI, D.; MAIORANO, L. Going west: Range expansion for loggerhead sea turtles in the Mediterranean Sea under climate change. **Global Ecology and Conservation**, [s. l.], v. 38, p. e02264, 2022. DOI: 10.1016/J.GECCO.2022.E02264. Acesso em: 8 jul. 2023.

MANSFIELD, K. L.; WYNEKEN, J.; LUO, J. First Atlantic satellite tracks of 'lost years' green turtles support the importance of the Sargasso Sea as a sea turtle nursery. **Proceedings of the Royal Society B**, [s. l.], v. 288, n. 1950, 2021. DOI: 10.1098/RSPB.2021.0057. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2021.0057>. Acesso em: 15 jul. 2023.

MARCOVALDI, M. Â.; LOPEZ, G. G.; SOARES, L.; BELINI, C.; DOS SANTOS, A. S.; LOPEZ, M. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 1, n. 1, 2011. Disponível em:

<https://revistaelectronica.icmbio.gov.br/BioBR/article/view/88/74>. Acesso em: 14 jul. 2023.

MARCOVALDI, MA.; LOPEZ, G. G.; SOARES, L. S.; SANTOS, A. J. B.; BELLINI, C.; BARATA, P. C. R. Fifteen years of Hawksbill Sea Turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Northern Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, [s. l.], v. 6, n. 2, 2007. DOI: 10.2744/1071-8443(2007)6[223:FYOHST]2.0.CO;2.

MARCOVALDI, MÂ; DEI MARCOVALDI, G. G. Marine turtles of Brazil: the history and structure of Projeto TAMAR-IBAMA. **Biological Conservation**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 35–41, 1999. DOI: 10.1016/S0006-3207(99)00043-9. Acesso em: 13 jul. 2023.

MARCOVALDI, MÂ; LOPEZ, GG; SOARES, LS; LÓPEZ-MENDILAHARSU, M. Satellite tracking of hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata* nesting in northern Bahia, Brazil: turtle movements and foraging destinations. **Endangered Species Research**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 123–132, 2012. DOI: 10.3354/ESR00421. Acesso em: 13 jul. 2023.

MARCOVALDI, Ma; VIEITAS, C. F.; GODFREY, M. H. Nesting and conservation management of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in northern Bahia, Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, [s. l.], v. 3, n. 2, 1999.

MARTINS, N. T.; MACAGNAN, L. B.; CASSANO, V.; GURGEL, C. F. D. Brazilian marine phylogeography: A literature synthesis and analysis of barriers. **Molecular Ecology**, v. 31, n. 21, p. 5423–5439, 2022. DOI: 10.1111/MEC.16684. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mec.16684>. Acesso em: 25 set. 2022.

MASCARENHAS, R.; SANTOS, R. D.; SANTOS, A. D.; ZEPPELINI, D. Nesting of Hawksbill Turtles in Paraíba-Brazil: Avoiding Light Pollution Effects. **Marine turtle newsletter**, v. 104, n. 1, p. 1-3, 2004. Disponível em: <http://www.seaturtle.org/mtn/archives/mtn104/mtn104p1.shtml>. Acesso em: 15 jul. 2023.

MAURER, A. S.; DAWSON, C.; BJORKLAND, R.; DONALDSON, A.; STAPLETON, S. P.; RICHARDSON, J. I.; PARKER, D. M.; BALAZS, G. H.; SCHROEDER, B. A. Satellite Telemetry Elucidates Migratory Pathways and Foraging Areas for Hawksbill Sea Turtles, *Eretmochelys imbricata*, in the Caribbean. **Caribbean Journal of Science**, v. 52, n. 1, p. 126-141, 2022. DOI: 10.18475/cjos.v52i1.a10.

MCCLELLAN, C. M.; READ, A. J. Complexity and variation in loggerhead sea turtle life history. **Biology Letters**, v. 3, n. 6, p. 592–594, 2007. DOI: 10.1098/RSBL.2007.0355. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsbl.2007.0355>. Acesso em: 8 jul. 2023.

METTLER, E. K., CLYDE-BROCKWAY, C. E., SINCLAIR, E. M., PALADINO, F. V., & HONARVAR, S. Determining critical inter-nesting, migratory, and foraging habitats for the conservation of East Atlantic green turtles (*Chelonia mydas*). **Marine Biology**, v. 167, n. 8, p. 106, 2020.

MEYLAN, A. B.; MEYLAN, P. A. Introduction to the evolution, life history, and biology of sea turtles. **Research and management techniques for the conservation of sea turtles**, v. 4, p. 3-5, 1999.

MINGOZZI, T., MASCIARI, G., PAOLILLO, G., PISANI, B., RUSSO, M., & MASSOLO, A.; Discovery of a regular nesting area of loggerhead turtle *Caretta caretta* in southern Italy: a new perspective for national conservation. **Biodiversity and Conservation in Europe**, [s. l.], v. 16, p. 277–299, 2006. DOI: 10.1007/978-1-4020-6865-2_20. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-6865-2_20. Acesso em: 15 jul. 2023.

MONTEIRO, C. C.; VIANA, J. T.; DA SILVA, K. K. A.; ROCHA R. S.; FARIA, V. V., MAGGIONI, R. Methods used in sea turtle genetic and molecular studies. **The Herpetological Journal**, v. 34, n. 4, p. 228-236, 2024. ISSN 0268-0130. DOI: <https://doi.org/10.33256/34.4.228236>.

MONZÓN-ARGÜELLO, C.; MUÑOZ, J.; MARCO, A.; LÓPEZ-JURADO, FL.; RICO, C. Twelve new polymorphic microsatellite markers from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) and cross-species amplification on other marine turtle species. **Conservation Genetics**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 1045–1049, 2008. DOI: 10.1007/S10592-007-9446-4. Acesso em: 8 jul. 2023.

MOREIRA, L.; BAPTISTOTTI, C.; SCALFONE, J.; THOMÉ, J. C.; DE, A. P. L. S. Occurrence Of *Chelonia mydas* On The Island Of Trindade. **Brazil. Marine Turtle Newsletter**, [s. l.], v. 70, n. 2, 1995. Acesso em: 15 jul. 2023.

NAGUIB, N. M.; YOUSEF, S. S.; EL-SHARKAWY, A.; MOGHAIEB, R. E.; TEMRAZ, T. A.; KHASHABA, E. H. K. Genetic polymorphism between and within Mediterranean and Red Sea populations of the green turtle (*Chelonia mydas*) as revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP). **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 1–16, 2022. DOI: 10.21608/EJABF.2022.222757. Disponível em: https://ejabf.journals.ekb.eg/article_222757.html. Acesso em: 8 jul. 2023.

NARO-MACIEL, E.; LE, M.; FITZSIMMONS, N. N.; AMATO, G. Evolutionary relationships of marine turtles: a molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 2, p. 659-662, 2008. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.08.004.

NARO-MACIEL, E.; REID, B.; FITZSIMMONS, N. N.; LE, M.; DESALLE, R. O. B.; AMATO, G. DNA barcodes for globally threatened marine turtles: a registry approach to documenting biodiversity. **Molecular ecology resources**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 252–263, 2010. DOI: 10.1111/J.1755-0998.2009.02747.X.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21565020/>. Acesso em: 7 jul. 2023.

NISHIZAWA, H.; ABE, O.; OKUYAMA, J.; KOBAYASHI, M.; ARAI, N. Population genetic structure and implications for natal philopatry of nesting green turtles *Chelonia mydas* in the Yaeyama Islands, Japan. **Endangered Species Research**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 141–148, 2011. DOI: 10.3354/ESR00355. Disponível em: <https://www.int-res.com/abstracts/esr/v14/n2/p141-148/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

PARKER, D. M.; COOKE, W. J.; BALAZS, G. H. Diet of oceanic loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the central North Pacific. **Fishery Bulletin**, [s. l.], v. 103, n. 1, 2005.

PATRÍCIO, A. R.; COVENEY, S. A.; BARBANTI, A.; BARBOSA, C.; BRODERICK, A. C.; EL BAR, N.; CATRY, P. Atlantic connectivity of a major green sea turtle *Chelonia mydas* foraging aggregation at the Banc d'Arguin, Mauritania. **Endangered Species Research**, n. 54, p. 365-382, 2024.

PERAZO, Z. M.; MONTEIRO, C. C.; AGOSTINHO, K. F. F.; CARVALHO, V. L.; PEREIRA, L. G.; DE OLIVEIRA, C. L.; FARIA, V. V. Sea turtle strandings along a semiarid coast in the western equatorial Atlantic. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, [s. l.], v. 101, n. 8, p. 1197–1201, 2021. DOI: 10.1017/S0025315422000121. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-the-marine-biological-association-of-the-united-kingdom/article/abs/sea-turtle-strandings-along-a-semiarid-coast-in-the-western-equatorial-atlantic/0A3833C7EE4F28199C51A604CD678E94>. Acesso em: 13 jul. 2023.

PHILLIPS, K. F.; MARTIN, K. R.; STAHELIN, G. D.; SAVAGE, A. E.; MANSFIELD, K. L. Genetic variation among sea turtle life stages and species suggests connectivity among ocean basins. **Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. e9426, 2022. DOI: 10.1002/ECE3.9426. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ece3.9426>. Acesso em: 14 jul. 2023.

PIKE, D. A.; PIKE, D. Climate influences the global distribution of sea turtle nesting. **Global Ecology and Biogeography**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 555–566, 2013. DOI: 10.1111/GEB.12025. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/geb.12025>. Acesso em: 14 jul. 2023.

PLOTKIN, P. T.; ROSTAL, D. C.; BYLES, R. A.; OWENS, D. W. Reproductive and developmental synchrony in female *Lepidochelys olivacea*. **Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 17–22, 1997. DOI: 10.2307/1565323. Acesso em: 15 jul. 2023.

PLOTKIN, P. T.; WICKSTEN, M. K.; AMOS, A. F. Feeding ecology of the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* in the Northwestern Gulf of Mexico. **Marine Biology**, [s. l.], v. 115, n. 1, 1993. DOI: 10.1007/BF00349379.

POLI, C.; LOPEZ, L. C. S.; MESQUITA, D. O.; SASKA, C.; MASCARENHAS, R. Patterns and inferred processes associated with sea turtle strandings in Paraíba State, Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 283–289, 2014. DOI: 10.1590/1519-6984.13112. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/fhYqF7BXtp96qqwJnNGX4G/?lang=en>. Acesso em: 15 jul. 2023.

POLOCZANSKA, E. S.; LIMPUS, C. J.; HAYS, G. C. Chapter 2 Vulnerability of Marine Turtles to Climate Change. **Advances in Marine Biology**, [s. l.], v. 56, p. 151–211, 2009. DOI: 10.1016/S0065-2881(09)56002-6. Acesso em: 14 jul. 2023.

PROIETTI, M. C.; REISSER, J.; MARINS, LF.; MARCOVALDI, MA.; SOARES, L. S.; MONTEIRO, D. S.; WIJERATNE, S.; PATTIARATCHI, C.; SECCHI, E. R. Hawksbill × loggerhead sea turtle hybrids at Bahia, Brazil: Where do their offspring go? **PeerJ**, v. 2, p. e255, 2014. DOI: 10.7717/peerj.255.

REICH, K. J.; BJORN DAL, K. A.; BOLTON, A. B. The lost years of green turtles: using stable isotopes to study cryptic life stages. **Biology Letters**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 712–714, 2007. DOI: 10.1098/RSBL.2007.0394. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsbl.2007.0394>. Acesso em: 15 jul. 2023.

REIS, E. C.; GOLDBERG, D. W. Biologia, ecologia e conservação de tartarugas marinhas. **Mamíferos, Quelônios e Aves, Vol 7**, [s. l.], p. 63–89, 2017. DOI: 10.1016/B978-85-352-7661-9.50004-X. Acesso em: 14 jul. 2023.

REIS, E. C.; SOARES, L. S.; LÔBO-HAJDU, G. Evidence of olive ridley mitochondrial genome introgression into loggerhead turtle rookeries of Sergipe, Brazil. **Conservation Genetics**, n. 11, v. 4, p. 1587–1591, 2010.

RIVAS, M. L.; RODRÍGUEZ-CABALLERO, E.; ESTEBAN, N.; CARPIO, A. J.; BARRERA-VILARMAU, B.; FUENTES, M. M.; ROBERTSON, K.; AZANZA, J.; LEÓN Y.; ORTEGA, Z. Uncertain future for global sea turtle populations in face of sea level rise. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–8, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-31467-1. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-31467-1>. Acesso em: 8 jul. 2023.

RIZZI, M.; RODRIGUES, F. L.; MEDEIROS, L.; ORTEGA, I.; RODRIGUES, L.; MONTEIRO, D. S.; KESSLER, Felipe; PROIETTI, M. C. Ingestion of plastic marine litter by sea turtles in southern Brazil: abundance, characteristics and potential selectivity. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 140, n. January, p. 536–548, 2019. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.01.054. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.01.054>.

ROBERTS, M. A.; SCHWARTZ, T. S.; KARL, S. A. Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green sea turtle (*Chelonia mydas*): analysis of microsatellite loci. **Genetics**, v. 166, n. 4, 1857–1870, 2004.

RODEN, S. E.; DUTTON, P. H. Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci in the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) and cross-species amplification. **Conservation Genetics Resources**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 49–52, 2011. DOI: 10.1007/s12686-010-9284-4.

ROSENBLUM, B. B.; LEE, L. G.; SPURGEON, S. L.; KHAN, S. H.; MENCHEN, S. M.; HEINER, C. R.; CHEN, S. M. New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 22, p. 4500-4504, 1997.

ROZAS, J., FERRER-MATA, A., SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C., GUIRAO-RICO, S., LIBRADO, P., RAMOS-ONSINS, S. E.; SÁNCHEZ-GRACIA, A. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. **Molecular biology and evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299-3302, 2017.

RUTHIG, G. R.; GRAMERA, A. E. Aggregations of olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea* Eschholtz, 1829) nests is associated with increased human predation during an arribada event. **Herpetology Notes**, [s. l.], v. 12, 2019.

SALES, G.; GIFFONI, B. B.; BARATA, P. C. R. Incidental catch of sea turtles by the Brazilian pelagic longline fishery. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 853–864, 2008. DOI: 10.1017/S0025315408000441. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-the-marine-biological-association-of-the-united-kingdom/article/abs/incidental-catch-of-sea-turtles-by-the-brazilian-pelagic-longline-fishery/6680048867CC4AC32879641F6AB5974C>. Acesso em: 15 jul. 2023.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., & MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual** (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SANTIDRIÁN TOMILLO, P.; SPOTILA, J. R. Temperature-Dependent Sex Determination in Sea Turtles in the Context of Climate Change: Uncovering the Adaptive Significance. **BioEssays**, [s. l.], v. 42, n. 11, p. 2000146, 2020. DOI: 10.1002/BIES.202000146. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.202000146>. Acesso em: 14 jul. 2023.

SANTOS, A. J. B.; BELLINI, C.; VIEIRA, D. H. G.; NETO, L. D.; CORSO, G. Northeast Brazil shows highest hawksbill turtle nesting density in the South Atlantic. **Endangered Species Research**, [s. l.], v. 21, n. 1, 2013. DOI: 10.3354/esr00505.

SANTOS, E. A.; SILVA, A. C.; SFORZA, R.; OLIVEIRA, F. L.; WEBER, M. I.; CASTILHOS, J. C.; LÓPEZ-MENDILAHARSU, M.; MARCOVALDI, M. A. A. G.; RAMOS, R. M. A.; DIMATTEO, A. Olive ridley inter-nesting and post-nesting movements along the Brazilian coast and Atlantic Ocean. **Endangered Species Research**, [s. l.], v. 40, 2019. DOI: 10.3354/ESR00985.

SCOTT, R.; MARSH, R.; HAYS, G. C. Ontogeny of long distance migration. **Ecology**, [s. l.], v. 95, n. 10, p. 2851–5859, 2014. DOI: 10.1890/13-2164.1. Acesso em: 14 jul. 2023.

SEMINOFF, J. A.; RESENDIZ, A.; RESENDIZ, B.; NICHOLS, W. J. Occurrence of Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*) in the Gulf of California, México: Evidence of Life-History Variation in the Pacific Ocean. **Herpetological Review**, [s. l.], v. 35, n. 1, 2004.

SHAMBLIN, B. M.; BJORNDAL, K. A.; BOLTEN, A. B. Mitogenomic sequences better resolve stock structure of southern Greater Caribbean green turtle rookeries. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 10, p. 2330-2340, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05530.x.

SHAMBLIN, B. M.; BJORNDAL, K. A.; BOLTEN, A. B.; NAIRN, C. J. Natal homing by an adult male green turtle at Tortuguero, Costa Rica. **Marine Turtle Newsletter**, n. 134, p. 21, 2012. Acesso em: 14 jul. 2023.

SILVER-GORGES, I.; KOVAL, J.; RODRIGUEZ-ZARATE, C. J.; PALADINO, F. V.; JORDAN, M. Large-scale connectivity, cryptic population structure, and relatedness in Eastern Pacific Olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*). **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 16, p. 8688-8704, 2020.

SIMÕES, T. N.; SILVA, A. C. D.; MOURA, C. C. D. M. Influence of artificial lights on the orientation of hatchlings of *Eretmochelys imbricata* in Pernambuco, Brazil. **Zoologia**, [s. l.], v. 34, 2017. DOI: 10.3897/zoologia.34.e13727.

SOARES, L. S.; BJORNDAL, K. A.; BOLTEN, A. B.; WAYNE, M. L.; CASTILHOS, J. C.; WEBER, M. I.; NARO-MACIEL, E. Reproductive output, foraging destinations, and isotopic niche of olive ridley and loggerhead sea turtles, and their hybrids, in Brazil. **Endangered Species Research**, v. 44, p. 237-251, 2021.

SOARES, L. S.; BOLTEN, A. B.; WAYNE, M. L.; VILAÇA, S. T.; SANTOS, F. R., DEI MARCOVALDI, M. A.; BJORNDAL, K. A. Comparison of reproductive output of hybrid sea turtles and parental species. **Marine Biology**, [s. l.], v. 164, n. 1, 2017. DOI: 10.1007/s00227-016-3035-3.

STANDORA, E. A.; SPOTILA, J. R. Temperature dependent sex determination in sea turtles. **Copeia**, 711-722, 1985.

SIMBA. **Sistema Integrado de Monitoramento de Biodiversidade Aquática**. 2020. Disponível em: <http://www.simba.org.br>. Acesso em: 07 de dez. 2024.

TAGLIOLATTO, A. B.; GOLDBERG, D. W.; GODFREY, M. H.; MONTEIRO-NETO, C. Spatio-temporal distribution of sea turtle strandings and factors contributing to their mortality in south-eastern Brazil. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 30, n. 2, p. 331-350, 2020.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular biology and evolution**, [s. l.], v. 38,

n. 7, p. 3022–3027, 2021. DOI: 10.1093/MOLBEV/MSAB120. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33892491/>. Acesso em: 13 jul. 2023.

ULLER, T.; OLSSON, M. Multiple paternity in reptiles: Patterns and processes. **Molecular ecology**, v. 17, n. 11, p. 2566-2580, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.03772.x.

VAN DER ZEE, J. P.; CHRISTIANEN, M. J.; BÉRUBÉ, M.; NAVA, M.; SCHUT, K.; HUMBER, F.; PALSBOU, P. J. The population genomic structure of green turtles (*Chelonia mydas*) suggests a warm-water corridor for tropical marine fauna between the Atlantic and Indian oceans during the last interglacial. **Heredity**, v. 127, n. 6, p. 510-521, 2021.

VANUCCI, R. M.; GOLDBERG, D. W.; MARANHO, A.; GIFFONI, B. D. B.; BOAVENTURA, I. C. D. R.; DIAS, R. B.; LEONARDI, S.B., NETO, H.G., SILVA, B.M., ROGÉRIO, D.W., DOMIT, C., BARRETO, A.S., CASTILHO, P.V., KOLENISKOVAS, C., CHUPIL, H.; BECKER, J. H. Impacts of pelagic longline fisheries on sea turtles in the Santos Basin, Brazil. **Frontiers in Amphibian and Reptile Science**, n. 2, 2024.

VARGAS, S. M.; ARAÚJO, F. C. F.; SANTOS, F. R. DNA barcoding of Brazilian sea turtles (Testudines). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 608-612, 2009.

VARO-CRUZ, N.; HAWKES, L.; CEJUDO, D.; LÓPEZ, P.; COYNE, M. S.; GODLEY, B. J.; LÓPEZ-JURADO, LF. Satellite tracking derived insights into migration and foraging strategies of male loggerhead turtles in the eastern Atlantic. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [s. l.], v. 443, 2013. DOI: 10.1016/j.jembe.2013.02.046.

VÉLEZ-RUBIO, G. M.; PROSDOCIMI, L.; LÓPEZ-MENDILAHARSU, M.; CARACCIO, MN.; FALLABRINO, A.; LACASELLA, E. L.; DUTTON, P. H. Natal Origin and Spatiotemporal Distribution of Leatherback Turtle (*Dermochelys coriacea*) Strandings at a Foraging Hotspot in Temperate Waters of the Southwest Atlantic Ocean. **Animals**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1285, 2023. DOI: 10.3390/ANI13081285/S1. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/13/8/1285/htm>. Acesso em: 15 jul. 2023.

VILAÇA, S. T.; HAHN, A. T.; NARO-MACIEL, E.; ABREU-GROBOIS, F. A.; BOWEN, B. W.; CASTILHOS, J. C.; CIOFI, C.; FITZSIMMONS, N. N.; JENSEN, M. P.; FORMIA, A.; LIMPUS, J.; NATALI, C.; SOARES, L. S.; THOISY, B.; WHITING, S. D.; BONATTO, S. L. Global phylogeography of ridley sea turtles (*Lepidochelys* spp.): evolution, demography, connectivity, and conservation. **Conservation Genetics**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 995–1010, 2022. DOI: 10.1007/S10592-022-01465-3/TABLES/2. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10592-022-01465-3>. Acesso em: 15 jul. 2023.

VILAÇA, S. T.; MAROSO, F.; LARA, P.; DE THOISY, B.; CHEVALLIER, D.; ARANTES, L. S.; SANTOS, F. R.; BERTORELLE, G.; MAZZONI, C. J.

Evidence of backcross inviability and mitochondrial DNA paternal leakage in sea turtle hybrids. **Molecular Ecology**, v. 32, n. 3, p. 628-643, 2023.

VILAÇA, S. T.; PICCINNO, R.; ROTA-STABELLI, O.; GABRIELLI, M.; BENAZZO, A.; MATSCHINER, M.; SOARES, L. S.; BOLTEN, A. B.; BJORNDAAL, K. A.; BERTORELLE, G. Divergence and hybridization in sea turtles: Inferences from genome data show evidence of ancient gene flow between species. **Molecular Ecology**, v. 30, p. 6178–6192, 2021. DOI: 10.1111/mec.16113.

VILAÇA, S. T.; VARGAS, S. M.; LARA-RUIZ, P.; MOLFETTI, É.; REIS, E. C.; LÔBO-HAJDU, G.; SOARES, L. S.; SANTOS, F. R. Nuclear markers reveal a complex introgression pattern among marine turtle species on the Brazilian coast. **Molecular Ecology**, [s. l.], v. 21, n. 17, p. 4300–4312, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05685.x.

WRIGHT, S. (1984). Evolution and the genetics of populations, volume 4: variability within and among natural populations (Vol. 4). University of Chicago press.

ZHANG, T.; LIN, L.; GAILLARD, D.; CHEN, F.; CHEN, H.; LI, M.; WU, S.; WANG, Z.; SHI, H. Rapid authenticity testing of artificially bred green turtles (*Chelonia mydas*) using microsatellite and mitochondrial DNA markers. **PeerJ**, [s. l.], v. 9, 2021. DOI: 10.7717/peerj.12410.

**APÊNDICE A – INFORMAÇÕES DAS AMOSTRAS QUE FORAM
UTILIZADAS NO ESTUDO**

	IDENTIFICAÇÃO	MUNICÍPIO	LOCALIDADE	ESPÉCIE	FAIXA ETÁRIA	ESTADO DO ANIMAL
1	N1704	Beberibe	Uruaú	CM	ADU	Morto
2	N1711	Fortim	Agulhas	CM	IMA	Morto
3	N1712	Aquiraz	Barro Preto	CM	IMA	Morto
4	N1713	Beberibe	Sucatinga	CM	IMA	Morto
5	N1715	Aracati	Canoa Quebrada	CM	IMA	Morto
6	N1731	Beberibe	Sucatinga	CC	IMA	Morto
7	N1741	Aracati	Canoa Quebrada	CM	IMA	Morto
8	D1713	Aquiraz	Beach Park	CM	IMA	Morto
9	D1714	Beberibe	Uruaú	CM	IMA	Morto
10	D1722	Aracati	Canoa Quebrada	CM	IMA	Morto
11	D1735	Aracati	Canoa Quebrada	CM	IMA	Morto
12	D1750	Beberibe	Uruaú	CM	ADU	Morto
13	J1851	Aracati	Uruaú	CM	ADU	Morto
14	J1861	Aracati	Canoa Quebrada	CM	IMA	Morto
15	J1867	Aracati	Retirinho	CM	IMA	Morto
16	F1801	Aracati	Murici	CM	IMA	Morto
17	F1803	Aquiraz	Barro Preto	CM	ADU	Morto
18	F1835	Aracati	Canoa Quebrada	CM	IMA	Vivo
19	F1836	Fortim	Agulhas	CM	IMA	Morto
20	MAR1831	Aquiraz	Barro Preto	CM	IMA	Vivo
			Barra da			
21	MAR1844	Beberibe	Sucatinga	CM	IMA	Morto
22	MAR1856	Aracati	Canoa Quebrada	CM	IMA	Morto
23	MAR1858	Beberibe	Sucatinga	CM	ADU	Morto
24	MAR1859	Aquiraz	Beach Park	CM	ADU	Morto
25	AB1801	Beberibe	Morro Branco	CM	IMA	Morto
26	AB1805	Aracati	Canoa Quebrada	CM	IMA	Morto
27	MAI1801	Beberibe	Canto Verde	CM	IMA	Morto
28	MAI1808	Beberibe	Praia do Paraíso	CM	IMA	Morto
29	MAI1832	Aracati	Canoa Quebrada	CM	IMA	Morto
30	out/17	Aracati	Quixaba	LO	ADU	Morto
31	AB1911	Aracati	Canoa Quebrada	CM	IMA	Morto
32	1	Aracati	Lagoa do Mato	CM	IMA	Morto
33	5	Beberibe	Canto Verde	CC	ADU	Morto
34	6	Beberibe	Uruaú	CC	ADU	Morto

35	14	Aquiraz	Presidio	LO	IMA	Morto
36	15	Cascavel	Batoque	EI	ADU	Morto
37	16	Aracati	Majorlândia	EI	IMA	Morto
38	17	Beberibe	Canto Verde	EI	IMA	Morto

Legendas apêndice A:

CM – *Chelonia mydas*

CC – *Caretta caretta*

LO – *Lepidochelys olivacea*

EI – *Eretmochelys olivacea*

IMA – Imaturo

ADU – Adulto

* As informações foram cedidas pela ONG AQUASIS, responsável pelos monitoramentos de praia nas áreas de estudo.

APÊNDICE B – NÚMEROS DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS UTILIZADAS

ESPÉCIE	GENE-ALVO		
	COI	RAG1	RAG2
<i>Caretta caretta</i>	KP136711.1 MN124279.1 KX241539.1 GQ152889.1 GQ152888.1 KP136712.1	FJ009032.1 FJ009025.1 JF415120.1 JF415121.1	JF415129.1 XM_048855273.1
<i>Lepidochelys olivacea</i>	GQ152890.1 KF894767.1 KF894766.1	FJ039989.1 FJ039982.1 JF415122.1 JF415124.1 JF415126.1 JF415127.1	JF415130.1 JF415131.1 JF415133.1 JF415134.1

		JF415128.1	
<i>Chelonia mydas</i>	OP320723.1 OP320722.1 OP320721.1 OP320720.1 OP320719.1 OP320718.1 OP320717.1 MW996725.1 MW996724.1 MW996723.1 MW996722.1 MW996721.1 MW996720.1 MW996719.1 MW996718.1 MW996717.1 MW996716.1 MW996715.1 MW996714.1 MW996713.1	FJ039953.1 FJ039946.1 FJ039939.1 FJ039932.1 FJ039925.1 JF415125.1	JF415132.1 XM_007055235.4 XM_043548437.1

	MW996712.1 MW996711.1 MW996710.1 MW996709.1 MW996708.1 MW996707.1 MW996706.1 MW996705.1 MW996704.1 MW996703.1 MW996702.1 MW996701.1 MN124278.1		
<i>Eretmochelys imbricata</i>	JX571768.1 JX571767.1 JX571766.1 JX571765.1 JX571764.1 JX571763.1 JX571762.1 JX571761.1 JX571760.1 JX571759.1 JX571758.1 JX571757.1 JX571756.1 JX571755.1 JX571754.1 JX571753.1 JX571752.1	FJ039975.1 FJ039968.1 JF415123.1	

	JN991344.1 JN991343.1 JN991342.1 JN991341.1 JN991340.1 JN991339.1 JN991338.1 JN991337.1 JN991336.1 JN991335.1 JN991334.1 JN991333.1 JN991332.1 JN991331.1 JN991330.1 JN991329.1 JN991328.1 GQ152887.1 GQ152886.1 GQ152885.1		
--	--	--	--

**APÊNDICE C – DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES E LOCAIS OBSERVADOS
NOS HAPLÓTIPOS PARA A REGIÃO MITOCONDRIAL**

COI							
<i>Chelonia mydas</i>		<i>Eretmochelys imbricata</i>		<i>Caretta caretta</i>		<i>Lepidochelys olivacea</i>	
hap_1	México	hap_1	Colômbia	hap_1	Brasil	hap_1	Brasil
	Brasil		Porto Rico		EUA		Austrália
	EUA		Braisl	hap_2	Quênia	hap_2	India
hap_2	China	hap_2	Colômbia		Turquia	hap_3	India
	Austrália	hap_3	Colômbia	hap_3	EUA		
hap_3	China	hap_4	Colômbia	hap_4	Brasil		
	India	hap_5	Austrália				
	Austrália	hap_6	Austrália				
hap_4	Brasil						
hap_5	India						
hap_6	Austrália						
hap_7	China						
hap_8	China						

**APÊNDICE D – DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES E LOCAIS OBSERVADOS
NOS HAPLÓTIPOS PARA O LOCUS NUCLEAR RAG1**

RAG1		
hap_1	<i>Chelonia mydas</i>	Brasil
		EUA
hap_2	<i>Lepidochelys olivacea</i>	Brasil
	<i>Eretmochelys imbricata</i>	EUA
	<i>Caretta caretta</i>	Brasil
	<i>Eretmochelys imbricata</i>	Brasil
hap_3	<i>Caretta caretta</i>	EUA
		Brasil
hap_4	<i>Lepidochelys olivacea</i>	EUA
		Brasil
hap_5	<i>Chelonia mydas</i>	Brasil
hap_6	<i>Chelonia mydas</i>	Brasil
hap_7	<i>Caretta caretta</i>	Brasil
hap_8	<i>Lepidochelys olivacea</i>	Brasil
hap_9	<i>Lepidochelys olivacea</i>	Brasil
hap_10	<i>Lepidochelys olivacea</i>	Brasil
hap_11	<i>Lepidochelys olivacea</i>	Brasil

**APÊNDICE E – DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES E LOCAIS OBSERVADOS
NOS HAPLÓTIPOS PARA O LOCUS NUCLEAR RAG2**

RAG2		
hap_1	<i>Chelonia mydas</i>	Brasil Israel
hap_2	<i>Lepidochelys olivacea</i>	Brasil
	<i>Eretmochelys imbricata</i>	Porto Rico
	<i>Eretmochelys imbricata</i>	Brasil
	<i>Eretmochelys imbricata</i>	Austrália
hap_3	<i>Lepidochelys olivacea</i>	Brasil Tailândia
hap_4	<i>Caretta caretta</i>	Brasil Itália
hap_5	<i>Lepidochelys olivacea</i>	Brasil
hap_6	<i>Lepidochelys olivacea</i>	Brasil

**APÊNDICE F – NÚMEROS DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS DEPOSITADAS
NO NCBI PARA O GENE COI**

GENE COI	
Identificação da amostra	Número de acesso NCBI
COI1_CM21_CE	PP766910
COI5_CC20_CE	PP766911
COI6_CC20_CE	PP766912
COI14_CM*22_AQU	PP766913
COI15_EI22_CAS	PP766914
COI16_CC*22_ARA	PP766915
COI17_EI22_ARA	PP766916
COI18_CM22_GUIF	PP766917
CM17_COI_CE1	PP766918
CM17_COI_CE2	PP766919
CM17_COI_CE3	PP766920
CM17_COI_CE4	PP766921
CM17_COI_CE5	PP766922
CC17_COI_AQU6	PP766923
CM17_COI_BEB7	PP766924
CM17_COI_ARA8	PP766925
CM17_COI_ARA9	PP766926
CM17_COI_CE10	PP766927
CM18_COI_ARA11	PP766928
CM18_COI_ARA12	PP766929
CM18_COI_ARA13	PP766930
CM18_COI_ARA14	PP766931
CM18_COI_AQU15	PP766932
CM18_COI_ARA16	PP766933
CM18_COI_FOR17	PP766934
CM18_COI_AQU18	PP766935
CM18_COI_BEB19	PP766936
CM18_COI_ARA20	PP766937
CM18_COI_CE21	PP766938
CM18_COI_CE22	PP766939
CM18_COI_BEB23	PP766940
CM18_COI_ARA24	PP766941

CM18_COI_BEB25	PP766942
CM18_COI_BEB26	PP766943
CM18_COI_ARA27	PP766944
CM19_COI_ARA28	PP766945