



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TESE DE MESTRADO

Estrutura da população nidificante de tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*) na Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro, sul de Moçambique



Raquel dos Santos Fernandes
Maputo/2015



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TESE DE MESTRADO

Estrutura da população nidificante de
tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*) na
Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro,
sul de Moçambique

Raquel dos Santos Fernandes

*Tese submetida à Universidade Eduardo Mondlane, como um dos
requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Biologia
Aquática e Ecossistemas Costeiros*

Tese orientada por:

Rita Campos, PhD

José Melo Ferreira, PhD

Marcos Pereira, MSc

Jurado:

José Paula, PhD

Maputo, 20 de Janeiro de 2015





DECLARAÇÃO DE HONRA

Declaro por minha honra que as amostras foram recolhidas por mim e pelos monitores do programa de conservação e protecção das tartarugas marinhas desde a Ponta do Ouro até Santa Maria, sul de Moçambique, nos meses de Outubro a Março nas épocas de desova de 2009-10, 2010-11 e 2011-12, com a devida autorização e apoio da Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro.

Toda informação consultada e adaptação de figuras, fotografias ou outro material proveniente de outros estudos ou autores, foi devidamente referenciada. As fotografias que não são da minha autoria foram devidamente reconhecidas ao longo do texto, excepto as fotografias do trabalho laboratorial (Capítulo 4) que foram feitas pela Rita Campos.

Raquel dos Santos Fernandes

Maputo, 20 de Janeiro de 2015



AGRADECIMENTOS

Aos meus supervisores do CIBIO, Rita Campos e José Melo Ferreira pela paciência em explicarem do básico ao complexo sempre com boa disposição. Por me terem recebido em Coimbra durante um período muito especial;

Ao meu supervisor diário, Marcos Pereira, pelas discussões técnicas, revisão e bons conselhos de vida;

Ao Miguel Gonçalves, Administrador da Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro, ao Pierre Lombard, Yvonne Lombard e filhos, aos fiscais Vincente, Felimone e Moisés e aos monitores das tartarugas marinhas. Sem o grande esforço e suor deles este trabalho não teria sido possível;

À Associação para Investigação Costeira e Marinha (AICM), que embora adormecida, contribuiu com os estudos avançados sobre as rotas de migração e temperatura dos ninhos e iniciou a recolha de amostras de tecido mole para futuras análises genéticas na RMPPO. Ao Pipocas (Eduardo Videira) por me ter fornecido a responsabilidade “das genéticas” e pela boa disposição...

Ao Centro Terra Viva (CTV), onde trabalho desde 2010, por me ter dado “tempo” para frequentar as aulas de mestrado, em especial à Cristina Louro, por me ter apresentado às tartarugas cabeçudas;

Às pessoas queridas que conheci através do CIBIO e CTM, em especial, à Helena Martins, Susana Lopes, Patrícia, Sara, Filipa, Paulo e Joana;

Ao Jerome Bourjea, pela fascinante conversa sobre tartarugas marinhas e por ter várias vezes dito “a tese é a tua grande prioridade!”

Ao Carlo Pacioni da Universidade de Murdoch por ter partilhado a metodologia laboratorial para a amplificação dos microssatélites.

Aos docentes do Mestrado em BAEC, em especial ao Dr Almeida Guissamulo e Dr Adriano Macia, que facultaram os contactos iniciais com o CIBIO;

Aos meus colegas de curso, Davide, Denise, Vanda, Vera e Simplício;



À *Focal Point* da CITES de Moçambique, dra Emília Polana, por ter explicado o procedimento para adquirir a autorização para a exportação de amostras de tartarugas marinhas para fins científicos;

Aos meus pais por andarem sempre curiosos em relação à tese e por terem organizado um escritório em casa para eu poder fazer o caos, desde os papéis expostos na parede às chávenas de café, água e bolachas;

Aos meus irmãos e aos meus sobrinhos pelas conversas e piadas, especialmente durante os almoços de domingo;

À Peta por me receber sempre muito bem na sua casa e incentivar a terminar a tese “chega uma altura que tens que parar de procurar mais informação e terminar de escrever”;

Ao Muri por todo o apoio, amor e partilha de sonhos;

Aos meus amigos, em especial à minha amiga de infância Leila Salvado, por terem compreendido o meu isolamento;

Ao CIBIO e ao CTM que criou as condições para as análises laboratoriais, desde a importação dos *primers* até a disponibilização de técnicos para apoiar no trabalho laboratorial;

Por último, às tartarugas cabeçudas por serem espécies tão enigmáticas e por simplesmente existirem.



*“How inappropriate to call this planet Earth
when it is quite clearly Ocean”.*
Arthur C. Clarke

RESUMO

As tartarugas marinhas existem há mais de 100 milhões de anos mas apresentam características biológicas e comportamentais que as tornam vulneráveis à pressão antropogénica e às alterações ambientais. Por esse motivo, as sete espécies existentes encontram-se na lista das espécies ameaçadas de extinção da IUCN. As tartarugas marinhas são modelos importantes para a compreensão de uma ampla variedade de fenómenos biológicos, tais como as migrações entre oceanos, as estratégias de acasalamento e a conservação de fundos genéticos. Estas espécies são ainda um modelo clássico para o estudo do comportamento filopátrico das fêmeas. Como forma de proteger as tartarugas marinhas e conhecer melhor a sua biologia pela análise da dinâmica populacional e conectividade entre populações, foram criados diversos programas de monitoria e conservação à escala global.

A Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro (RMPPPO), no extremo sul de Moçambique, é uma área importante de nidificação de tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*) e tartarugas gigantes (*Dermochelys coriacea*), além de ser uma área de alimentação de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) e tartarugas bico-de-falcão (*Eretmochelys imbricata*). Foi nesta região que se iniciaram os primeiros programas de monitoria da nidificação de tartarugas marinhas em Moçambique. A monitoria das emergências das tartarugas marinhas na secção de praia entre a Ponta Malongane e a Ponta Dobela iniciou na época de 1994/95 e a marcação na época de 1995/96, sendo depois da Ilha da Inhaca, a área com a série mais longa de dados de monitoria no sul de Moçambique. A qualidade e representatividade destes dados têm melhorado com o aumento do esforço de monitoria, associado ao desenvolvimento estrutural, financeiro e técnico da RMPPPO.

Neste estudo, procedeu-se à análise dos dados de monitoria e marcação de tartarugas cabeçudas e análise genética de 63 amostras de tecido mole, recolhidas durante as épocas de nidificação entre 2010 a 2013 no sul de Moçambique.

Os dados obtidos através do programa de monitoria e marcação de tartarugas permitiram estimar o número de fêmeas nidificantes por época na RMPPPO entre 290 e 648. Observou-se um número médio de 735 ninhos (± 136 DP), 1527 emergências (± 228 DP), 177 marcações (± 37 DP) e 130 recapturas (± 62 DP) por época. O intervalo de

reimigração de tartarugas cabeçudas variou entre 1 e 11 anos, sendo a média de 3.3 anos (± 1.8 DP) e o número médio de ninhos por época por tartaruga foi de 1.3 ninhos (± 0.6 DP) e variou entre 1 e 3 ninhos.

Neste trabalho analisou-se ainda a diversidade genética da população nidificante de tartarugas cabeçudas na RMPPO através do estudo da variabilidade da região controlo do ADN mitocondrial e de 21 *loci* nucleares.

A análise do ADN mitocondrial (ADNm) permitiu identificar dois haplótipos presentes nestas populações, o CC-A2.1 e o CC-I1. A diversidade nucleotídica (π) foi de 0.00005 e a diversidade haplotípica (h) de 0.033. O haplótipo CC-I1 é descrito pela primeira vez neste trabalho e parece ser um haplótipo privativo da população nidificante na RMPPO. O haplótipo CC-A2.1 está presente em diversas populações que nidificam nas praias do Mediterrâneo e, em menor percentagem, nas do Atlântico Noroeste (eg. Florida) e do Atlântico Nordeste (eg. Cabo Verde). Este estudo reforça a hipótese de colonização recente (durante o Pleistoceno) das praias do Índico a partir do Atlântico, favorecida pela amenização da corrente fria de Benguela e intensificação da corrente quente das Agulhas, que eliminou temporariamente a barreira térmica do Cabo da Esperança para as espécies temperadas.

A análise dos microssatélites não revelou diferenciação genética (F_{ST} não foi significativo) entre as partições artificiais da costa da RMPPO feitas com base na geografia, nem a existência de estruturação geográfica através da inferência bayesiana feita pelo programa Structure, considerando ou não *a priori* as partições geográficas artificiais. A análise factorial de correspondência (AFC) não evidenciou diferentes agrupamentos. Estes resultados indicam que as fêmeas nidificantes fazem parte da mesma população genética. No entanto, a ausência de estruturação não permitiu definir limites geográficos da população, suportando a possibilidade de partilha de genes de tartarugas cabeçudas entre o sul de Moçambique, a África do Sul e provavelmente, embora em menor dimensão, com Madagáscar e Omã.

A estimativa do efectivo populacional (N_e) de tartarugas cabeçudas pelo programa LDNE foi de 276 a 428 (dependendo da menor frequência alélica utilizada) e pelo ONeSAMP foi de 193. Foram utilizados vários modelos para detectar a ocorrência de redução demográfica utilizando o programa Bottleneck, mas apenas num dos casos foi observado um sinal fraco de redução demográfica, o que evidencia uma baixa

probabilidade de redução demográfica recente. No entanto, é de ressaltar que as estimativas do N_e e a não detecção de redução demográfica devem ser avaliadas com precaução uma vez que os modelos de mutação dos *loci* nucleares utilizados são de difícil determinação. Por outro lado, se de facto esta população sofreu uma redução demográfica recente, esta poderá não ser ainda detectável dado o longo período de geração das tartarugas cabeçudas e o curto período de tempo que terá decorrido após o início da redução demográfica. A aparente conectividade entre as populações do sul de Moçambique e da África do Sul poderá também explicar este resultado, uma vez que este último país tem um programa de conservação e gestão das populações de tartaruga cabeçuda activo há mais de 50 anos, que permitiu recuperar o seu efectivo populacional.

Os resultados obtidos mostram que a população de tartarugas cabeçudas nidificantes na RMPPO tem menor diversidade genética do que outras populações estudadas noutros trabalhos, sendo a média da heterozigotia esperada para a população da RMPPO ($H_e = 0.675 \pm 0.271$) menor do que a média da heterozigotia esperada estimada para as populações do Sudeste dos Estados Unidos ($H_e = 0.862 \pm 0.092$), para o mesmo conjunto de *loci*. A menor diversidade genética pode ser causada por uma amostragem não representativa ou por efectivamente esta constituir uma população menor.

Apesar dos dados obtidos neste trabalho não apontarem para uma redução demográfica recente, a baixa variabilidade genética detectada através dos marcadores usados e o reduzido tamanho efectivo populacional, tomando como referência o número teórico de 500 para se considerar uma população apta para se manter, sugerem que a população de tartaruga cabeçuda nidificante na RMPPO poderá estar susceptível a mudanças ambientais ou ameaças de origem antropogénica. Os resultados deste trabalho sugerem ainda que as medidas de conservação desta espécie no sul de Moçambique devem ter em consideração o facto de se tratar de uma única população, sem estruturação aparente entre diferentes praias.

Palavras-chave: Tartarugas cabeçudas, estrutura populacional, ADN mitocondrial, microssatélites, tamanho efectivo populacional, redução demográfica

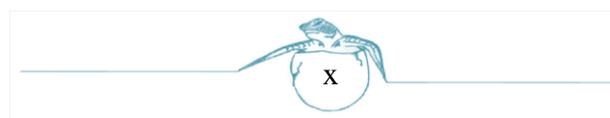
ABSTRACT

Marine turtles have existed for more than 100 million years, but they possess biological and behavioural features that make them vulnerable to anthropogenic pressures and environmental change. For that reason, the seven existing species are present in the IUCN list of threatened species. Marine turtles are important biological models for understanding a wide variety of biological phenomena, such as inter-ocean migration, mating strategies and the conservation of genetic pools. They are also a classic model for the study of philopatric behaviour in females. In order to protect marine turtles and to gain a better understanding of their biology, by analysing population dynamics and connectivity, several monitoring and conservation programs have been created at a global scale.

Ponta do Ouro Partial Marine Reserve (*Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro – RMPPO*), in the southernmost tip of Mozambique, is an important nesting area for loggerhead turtles (*Caretta caretta*) and leatherback (*Dermochelys coriacea*), as well as being a feeding area for green turtles (*Chelonia mydas*) and hawksbill (*Eretmochelys imbricata*). The first nesting monitoring programs for marine turtles in Mozambique were conducted in this region. The marine turtles track monitoring in the area between Ponta Malongane and Ponta Dobela started in the 1994/95 season and tagging in 1995/96 season. This region has the second longest monitoring data series in Mozambique, after Inhaca Island. The quality and scope of these data have improved with the increase in monitoring effort, associated with the structural, financial and technical development of the RMPPO.

In this study, we analysed the monitoring and tagging data of loggerhead turtles as well as conducted a genetic analysis of 63 tissue samples, collected during the nesting seasons between 2010 and 2013, in the south of Mozambique.

The data collected in the monitoring and tagging program, allowed for the estimation of the number of nesting females per season in the RMPPO, which was found to be between 290 and 648. We observed an average number of 735 nests (± 136 SD), 1527 tracks (± 228 SD), 177 tags (± 37 SD) and 130 recaptures (± 62 SD) per season. The remigration interval in loggerhead turtles was between 1 and 11 years, with an average



of 3.3 years (± 1.8 SD) and the average number of nests per turtle per season was 1.3 (± 0.6 SD) and ranged from 1 to 3 nests.

We also analysed the genetic diversity of the nesting population of loggerhead turtles in RMPPPO, through the study of variability in the control region of mitochondrial DNA (ADNm) and in 21 nuclear *loci*.

The ADNm analysis showed that there are two haplotypes in these population, CC-A2.1 and CC-I1. Nucleotide diversity (π) was 0.00005 and haplotipic diversity (h) was 0.033. This is the first study to describe the CC-I1 haplotype, which seems to be a private haplotype of the RMPPPO nesting population. The CC-A2.1 haplotype is present in several populations that nest in the Mediterranean beaches, and less commonly, in the Northwest Atlantic (e.g. Florida) and Northeast Atlantic (e.g. Cape Verde) beaches. This study reinforced the hypothesis of recent (during the Pleistocene) colonization of the Indian Ocean beaches from the Atlantic Ocean, enabled by the weakening of the cold Benguela current and strengthening of the warm Agulhas current, which temporarily removed the Cape of Good Hope thermal barrier for temperate turtle species.

Microsatellite analysis did not show genetic differentiation (F_{ST} was not significant) between the artificial geographic partitions of the RMPPPO coast. A Bayesian inference test conducted with the Structure software also did not show geographic structuring, whether the artificial geographic partitions were considered *a priori* or not. Factorial Correspondence Analysis (AFC) did not show different groupings. These results indicate that the nesting females are part of the same genetic population. However, the absence of structuring did not allow the setting of geographic population limits, indicating the possible sharing of genes between loggerhead turtles in the south of Mozambique, South Africa, and probably, although to a lesser degree, Madagascar and Oman.

The effective population (N_e) estimate for loggerhead turtles given by the LDNE software was 276 to 428 (depending on the lowest allelic frequency used), whereas with the ONeSAMP software was 193. Several models were used to detect the occurrence of a bottleneck, using the software Bottleneck, but only one case of a possible recent demographic bottleneck was found, which shows the low likelihood of a recent demographic bottleneck.

However, it is important to highlight that the N_e estimates and the non-detection of a bottleneck, should be evaluated with caution, since the mutations models of nuclear *loci* are difficult to determine. On the other hand, if this population did in fact suffer a recent demographic bottleneck, it may not yet be detectable, given the long generational period of loggerhead turtles and the short amount of time to have elapsed since the start of the demographic bottleneck. The apparent connectivity between south Mozambique and South Africa populations could also help explain this result, since the latter has a conservation and population management program for loggerhead turtles active for more than 50 years, which may allowed the recovery of their effective population.

The results show that the nesting population of loggerhead turtles in the RMPPO has lower genetic diversity than other populations. The expected heterozygosity average for the RMPPO population ($H_e = 0.675 \pm 0.271$) is lower than what was estimated for southeast United States populations ($H_e = 0.862 \pm 0.092$), for the same set of *loci*. The smaller genetic diversity could be explained by non-representative sampling or because the population is effectively smaller.

Even though the data obtained in this study do not indicate a recent demographic bottleneck, the low genetic variability and the reduced effective population size suggest that the nesting loggerhead turtle population in the RMPPO may be susceptible to environmental changes or anthropogenic threats. The results of this study also suggest that the conservation efforts for this species in the south of Mozambique should take into consideration the fact that we are dealing with a single population, without a clear structuring between the different beaches.

Keywords: Loggerhead turtles, population structure, mitochondrial DNA, microsatellites, effective population size, demographic bottleneck.

ACRÓNIMOS

ADN - Ácido desoxirribonucléico

ADNmt – ADN mitocondrial

ADNn – ADN nuclear

CIBIO/InBIO-UP) - Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos da Universidade do Porto

CITES – Convenção Internacional sobre o comércio de espécies da Fauna e Flora Ameaçada de Extinção

CMS – Convenção e espécies migratórias

IAM - *Infinite allele model*; modelo do alelo infinito

IUCN – União Internacional para conservação da Natureza

N – Tamanho populacional

N_e – Tamanho efectivo populacional

PCR - *Polymerase chain reaction*; reacção em cadeia da polimerase

RMPPPO – Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro

SMM – *Stepwise mutation model*; modelo de mutação por passos

TPM - *Two-phase mutation model*; modelo de mutação de duas fases

UG - Unidades de Gestão

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 História evolutiva das tartarugas marinhas	1
1.2 Conservação de tartarugas marinhas.....	2
1.3 Programa de conservação e monitoria de tartarugas marinhas em Moçambique... 4	
1.4 Tartarugas cabeçudas	5
1.4.1 Distribuição global das tartarugas cabeçudas.....	5
1.4.2 Ciclo de vida da tartaruga cabeçuda.....	7
1.5 Justificação do estudo	13
1.6 Objectivos	14
1.7 Hipóteses.....	14
CAPÍTULO 2. DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	16
2.1 Localização geográfica da área de estudo.....	16
2.2 Características físicas e biológicas gerais da região	17
2.2.1 Oceanografia	17
2.2.2 Clima	20
2.2.3 Biodiversidade costeira e marinha na RMPPO.....	21
2.3 Estatuto de protecção da área de estudo	23
CAPÍTULO 3. MONITORIA E MARCAÇÃO DE TARTARUGAS CABEÇUDAS. 24	
3.1 INTRODUÇÃO	24
3.2 METODOLOGIA.....	25
3.2.1 Esforço de amostragem	25
3.2.2 Recolha de dados durante a patrulha.....	26
3.2.3 Marcação de tartarugas cabeçudas	26
3.2.4 Análise dos dados de monitoria e estimativa do tamanho populacional de fêmeas nidificantes.....	27
3.2.5 Análise dos dados de biometria.....	27
3.3 RESULTADOS	28
3.3.1 Esforço de monitoria	28
3.3.2 Dados de monitoria recolhidos entre as épocas 2010/11 a 2013/14	29
3.3.3 Estimativa do número de emergências e ninhos por fêmea	30

3.3.4 Tamanho populacional das fêmeas nidificantes com base nos censos de monitoria	32
3.3.5 Biometria.....	33
3.4 DISCUSSÃO	35
3.4.1 Inferências sobre a população nidificante de tartarugas cabeçudas com base nos dados de monitoria.....	35
3.4.2 Relação entre as emergências, ninhos e marcação.....	37
3.4.3 Biometria.....	39
CAPÍTULO 4. ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DE TARTARUGA CABEÇUDA NA RESERVA MARINHA PARCIAL DA PONTA DO OURO.....	40
4.1 INTRODUÇÃO	40
4.1.1 Aplicação de ferramentas de biologia molecular	40
4.1.2 Genética populacional	40
4.1.3 Características do ADN mitocondrial e diversidade haplotípica	42
4.1.4 Unidades de gestão (UG) com base no ADN mitocondrial das tartarugas cabeçudas	43
4.1.5 Expansão das tartarugas cabeçudas estimada através das linhagens maternas (ADN mitocondrial)	44
4.1.6 Características do ADN nuclear	52
4.1.7 Estruturação e fluxo genético mediado pelos machos	54
4.1.8 Tamanho efectivo da população.....	55
4.1.9 Eventos demográficos	56
4.2 METODOLOGIA.....	57
4.2.1 Recolha de amostras de tecido mole	57
4.2.2 Transporte das amostras e trabalho laboratorial.....	59
4.2.3 Extracção do ADN	59
4.2.4 Visualização do produto de extracção de ADN	62
4.2.5 Amplificação do ADN mitocondrial por PCR	65
4.2.6 Análise das sequências do ADN mitocondrial.....	67
4.2.7 Marcadores utilizados, pcr e genotipagem de adn nuclear (microsatélites) .	68

4.2.8 Genotipagem	71
4.2.9 Controlo da qualidade dos dados recolhidos	71
4.2.10 Estimativas de diversidade genética.....	74
4.2.11 Estruturação populacional	76
4.2.12 Estimativa do efectivo populacional	78
4.2.13 Eventos demográficos: Bottleneck.....	79
4.3 RESULTADOS	81
4.3.1 Tamanhos das sequências, diversidade haplotípica e nucleotídica.....	81
4.3.2 Relação entre os haplótipos mais próximos do haplótipo dominante do sul de Moçambique (haplótipo CC-A2.1)	84
4.3.3 Relação dos haplótipos de populações nidificantes no Oceano Índico, Atlântico e Pacífico	85
4.3.4 Características dos <i>loci</i> de ADN nuclear.....	87
4.3.5 Controlo da qualidade dos dados recolhidos.....	89
4.3.6 Estimativas de diversidade genética: Riqueza alélica, Heterozigotia esperada e Heterozigotia observada.....	91
4.3.7 Análise da estruturação genética	96
4.3.8 Estimativa do efectivo Populacional	100
4.3.9 Eventos demográficos: <i>Bottleneck</i>	101
4.4 DISCUSSÃO	103
4.4.1 Diversidade haplotípica do ADN mitocondrial na RMPPO	103
4.4.2 Dispersão do haplótipo e possível expansão das tartarugas cabeçudas num contexto evolutivo.....	104
4.4.3 Variabilidade alélica e diversidade genética do ADN nuclear	106
4.4.4 Ausência de estruturação na RMPPO	106
4.4.5 Estimativa do efectivo populacional.....	109
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES	111
CAPÍTULO 6. RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS ESTUDOS	112
CAPÍTULO 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
ANEXOS	135

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 HISTÓRIA EVOLUTIVA DAS TARTARUGAS MARINHAS

Os primeiros registos fósseis de tartarugas terrestres e marinhas (ordem Testudines) possuem cerca de 200 e 150 milhões de anos, respectivamente (Zangerl, 1980; Weems, 1988). Assim, as tartarugas marinhas habitam a Terra desde o período Cretáceo (Hirayama, 1998). Durante este período existiram quatro famílias de tartarugas marinhas: Toxochelyidae, Protostegidae, Cheloniidae e Dermochelyidae (Pritchard, 1996). Destas, apenas as duas últimas famílias sobreviveram até à actualidade.

A família Dermochelyidae é representada apenas pela espécie *Dermochelys coriacea*, designada por tartaruga gigante, coriácea ou, localmente, no sul de Moçambique, por tractor. A família Cheloniidae é representada por cinco géneros e seis espécies: tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), tartaruga australiana ou tartaruga de carapaça achatada (*Natator depressus*), tartaruga bico-de-falcão (*Eretmochelys imbricata*), tartaruga olivácea (*Lepidochelys olivacea*), tartaruga de kempe (*Lepidochelys kempii*) e tartaruga-comum ou cabeçuda (*Caretta caretta*; Figura 1.1).

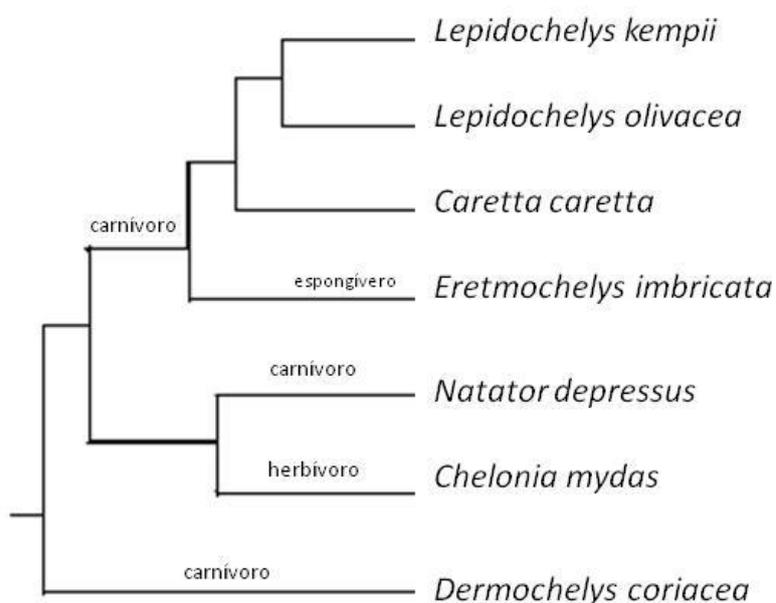


Figura 1.1 - Relação evolutiva das sete espécies de tartarugas marinhas, obtida através da sequenciação de regiões de ADN mitocondrial e ADN nuclear. Adaptado de Naro-Maciel *et al.* (2008)



1.2 CONSERVAÇÃO DE TARTARUGAS MARINHAS

As tartarugas marinhas são sensíveis a diversas ameaças, quer naturais quer antropogénicas. A captura de fêmeas durante a nidificação, a recolha de ovos e a pesca accidental ou intencional provocaram um declínio em diversas populações de tartarugas marinhas (Lutcavage *et al.*, 1997). De acordo com Frazier (2003), a exploração de tartarugas marinhas ocorre desde as civilizações mais antigas, há cerca de sete mil anos, sendo usadas como alimento, adorno, afrodisíacos e até talismãs místicos. Dada a vulnerabilidade actual, estas espécies são uma prioridade de conservação global (Wallace *et al.*, 2011).

Apesar de ser proibido a nível internacional, ainda são reportados em vários países, inclusive Moçambique, casos de consumo da carne e de ovos de tartarugas, extração de óleo de fígado para fins medicinais e produção de combustível, uso da carapaça para artesanato, aproveitamento de partes para isca, ração animal e fertilizante (Thorbjarnarson *et al.*, 2000). Outras ameaças que as tartarugas marinhas enfrentam resultam da degradação dos habitats devido à poluição, remoção da vegetação dunar, condução de veículos nas praias, construção de infraestruturas e mineração de areias na zona dunar, que podem afectar a escolha do local de desova e danificar ninhos, reduzindo o recrutamento (Witherington, 1999; Katselidis & Dimopoulos, 2000).

Alguns estudos sugerem que a bioacumulação de metais e outros poluentes estão associados ao surgimento de doenças em tartarugas marinhas (Eckert *et al.*, 1999; Conant *et al.*, 2009). Os resíduos sólidos, especialmente plásticos transparentes, constituem também uma ameaça para as tartarugas marinhas, que os podem confundir com o seu alimento (ig. cnidários, esponjas), causando problemas de obstrução do trato digestivo e/ou necrose e ulceração em algumas partes do corpo (Bugoni *et al.*, 2001).

Algumas actividades humanas podem beneficiar espécies predatórias de ovos e crias de tartarugas marinhas, como por exemplo, a criação de porcos ou o sustento de cães (Van Buskirk & Crowder, 1994). Estudos demonstram que os caranguejos fantasma, *Ocypode ryderi* e *Ocypode ceratophalmus*, abundantes na Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro (RMPPPO: Robertson *et al.*, 1996), são grandes predadores de crias, preferencialmente das que apresentam deficiências físicas ou falta de orientação,



contribuindo para a selecção natural (Hughes, 1974; Barton & Roth, 2008). Na África do Sul, há também registos de avistamento de mabecos (*Lycaon pictus*), genetas (*Genetta rubiginosa*), mangustos-dos-pântanos (*Atilax paludinosus*) e ocasionalmente milhafres-de-bico-amarelo (*Milvus aegyptius*) a capturar crias de tartarugas no Kwazulu-Natal (Hughes, 1974). Nesta região, também tem sido reportado a destruição de ninhos por ratel (*Mellivora capensis*; Bourjea, 2008). Os predadores de tartarugas marinhas adultas nas áreas de alimentação e rotas migratórias mais comuns são os tubarões (Witzell, 1987; Cliff & Dudley, 1991; Fergusson *et al.*, 2000). Os tubarões Zambeze (*Carcharhinus leucas*) são predadores menos frequentes de tartarugas marinhas, sendo primariamente uma ameaça para as espécies de menores dimensões e para indivíduos que se encontram nas águas tropicais costeiras (Cliff & Dudley, 1991). Os tubarões brancos (*Carcharodon carcharias*) habitam as áreas temperadas e consomem presas de grande tamanho, incluindo as tartarugas gigante adultas, mas estas constituem uma pequena porção da dieta (Fergusson *et al.*, 2000) e o tubarão tigre (*Galeocerdo cuvier*) também captura tartarugas marinhas (Witzell, 1987; Heithaus *et al.*, 2002; Heithaus, 2005). As orcas (*Orcinus orca*) também já foram avistadas a capturar tartarugas gigantes e podem também alimentar-se de tartarugas oliváceas e verdes (Pitman & Dutton, 2004; Fertl & Fulling, 2007).

Existe ainda uma crescente preocupação em relação às mudanças climáticas, nomeadamente a frequência de cheias e subida de marés, que podem inundar os ninhos, e alterações da temperatura atmosférica, que podem afectar o processo de embriogénese (Hawkes *et al.*, 2009).

A importância relativa destas ameaças depende da espécie, localização, fase do ciclo-de-vida ou do tamanho da população (Wallace *et al.*, 2010; 2011). Durante a fase de nidificação, embriogénese e após a eclosão, as tartarugas apresentam mobilidade reduzida e ocorrem em densidades mais elevadas, tornando-as particularmente vulneráveis aos predadores. Consequentemente, o esforço de conservação das tartarugas tem priorizado as áreas costeiras, ou de nidificação, dado que as combinações de ameaças podem ser mais facilmente minimizadas e o esforço de conservação optimizado (Donlan *et al.*, 2010). A proclamação formal de áreas costeiras e marinhas protegidas suporta os programas de monitoria e conservação da nidificação e das áreas

de alimentação das tartarugas marinhas e permite restringir algumas actividades humanas (Mortimer, 2000). No entanto, a conservação de tartarugas marinhas tem expandido para integrar as áreas de alimentação e potenciais rotas migratórias, o que por vezes envolve acordos internacionais, dada elevada capacidade migratória.

1.3 PROGRAMA DE CONSERVAÇÃO E MONITORIA DE TARTARUGAS MARINHAS EM MOÇAMBIQUE

Em Moçambique, as primeiras iniciativas de conservação de tartarugas marinhas surgiram na década de 90 do século XX, após a guerra civil, na região sul do país (Louro *et al.*, 2006; Videira *et al.*, 2008). Em 2008 foram reportados no país, programas de conservação de tartarugas marinhas em 13 áreas, focados na educação, sensibilização e protecção de ninhos (Videira *et al.*, 2008). Actualmente, os programas de monitoria cobrem cerca 8% das praias de nidificação de Moçambique (Fernandes *et al.*, 2014).

Ao longo da costa foram observadas 5 espécies de tartarugas marinhas, nomeadamente, a tartaruga-de-couro, tartaruga-cabeçuda, tartaruga-verde, tartaruga-bico-de-falcão e a tartaruga-olivácea (Hughes, 1974; Videira *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Videira *et al.*, 2011). No sul do país, na Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro (RMPPPO), Bilene, Zavala e Závora, Parque Nacional do Arquipélago do Bazaruto, ocorre a nidificação das tartarugas cabeçuda e de couro (Gove & Magane, 1996; Louro *et al.*, 2006). No norte do país, as tartarugas verde e bico-de-falcão são as espécies predominantes e têm sido observadas a nidificar no Parque Nacional das Quirimbas, assim como nas Ilhas Primeiras e Segundas (Hughes, 1971; Costa, 2007; Videira *et al.*, 2008). Existe pouca informação sobre as ocorrências de nidificação e captura da tartaruga-olivácea.

1.4 TARTARUGAS CABEÇUDAS

Carolus Linnaeus deu o primeiro nome binomial às tartarugas cabeçudas, *Testudo caretta*, em 1758. No entanto, o nome genérico *Caretta* foi introduzido por Rafinesque em 1814 (Dodd, 1988). Este nome é uma versão latinizada da palavra francesa "caret", que significa tartaruga, ou tartaruga marinha. A combinação *Caretta caretta* foi introduzida em 1902 por Leonhard Stejneger.

As características morfológicas gerais de identificação das tartarugas cabeçudas são a presença de uma cabeça grande e triangular com dois pares de escudos pré-frontais, carapaça com cinco pares de escudos laterais (Figura 1.2) e duas garras em cada barbatana (Dodd, 1988). Os adultos e sub-adultos apresentam uma carapaça com coloração castanha avermelhada e o plastron é amarelo a laranja. As tartarugas adultas apresentam dimorfismo sexual externo, sendo a cauda preênsil grande e muscular nos machos adultos, uma característica facilmente identificável (Casale *et al.*, 2005).



Figura 1.2 - a) Vista lateral de uma tartaruga cabeçuda adulta fêmea b) Vista frontal de uma tartaruga cabeçuda e c) Crias de tartaruga cabeçuda a deslocarem-se para o mar.

1.4.1 DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DAS TARTARUGAS CABEÇUDAS

As tartarugas cabeçudas estão amplamente distribuídas pelas regiões de clima temperado, tropical e subtropical (Dodd, 1988; Sénegas *et al.*, 2009). A equipa de avaliação biológica das tartarugas cabeçudas (*Loggerhead Biological Review Team*; BRT) do *National Marine Fisheries Service* (NMFS) determinou que existem pelo menos nove segmentos populacionais discretos (DPS) de tartarugas cabeçudas no mundo (Figura 1.3). Estas agregações estão separadas por barreiras físicas, ecológicas, oceanográficas e/ou comportamentais (USFWS-NOAA, 2011).

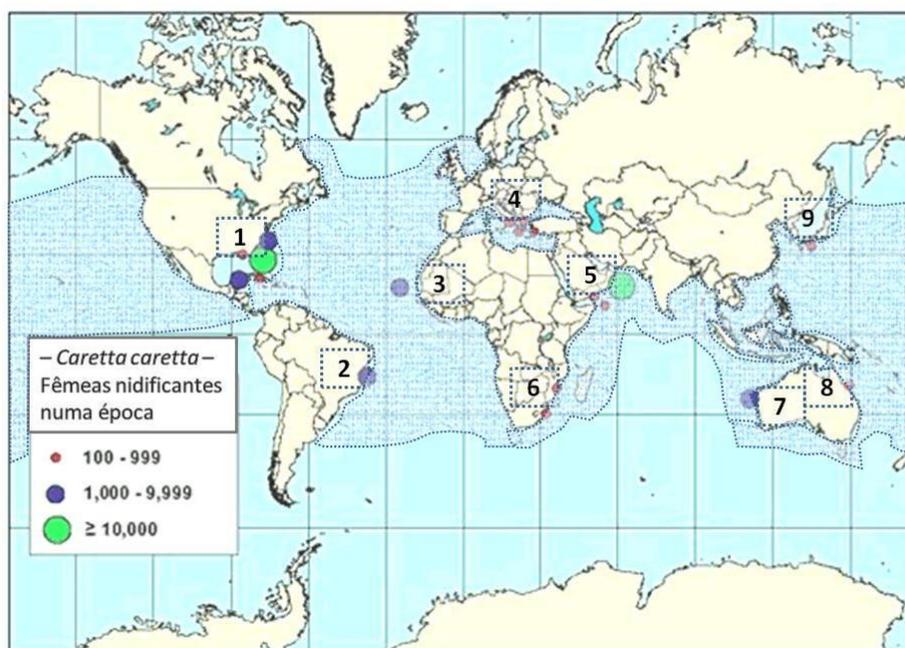


Figura 1.3 - Representação da distribuição das tartarugas cabeçadas (sombreado azul) e das populações nidificantes (círculos). Os números indicam os segmentos populacionais discretos (DPS) identificados pela equipa de avaliação biológica das tartarugas cabeçadas: 1) DPS do Oceano Atlântico Noroeste (EUA - Florida, Geórgia e Carolina do Sul; México - Península do Iucatão; Colômbia e Cuba); 2) DPS do Oceano Atlântico Sul (Brasil); 3) DPS do Oceano Atlântico Nordeste (Cabo verde); 4) DPS Mar Mediterrâneo (Grécia, Turquia, Síria, Líbia e Tunísia); 5) DPS do Oceano Índico Norte (Omã); 6) DPS do Oceano Índico Sudoeste (África do Sul e sul de Moçambique); 7) DPS do Oceano Indo-Pacífico - Austrália Ocidental (Baía dos Tubarões e Ilha de Barrow); 8) DPS do Oceano Pacífico Sul - Austrália Oriental (Queensland, Crab e Ilhas Swain Reef, Ilhas Mon Repos-Bundaberg, Ilhas Capricorn e Wreck); e 9) DPS do Oceano Pacífico Norte (Ryukyu e Arquipélago do Japão). Adaptado de NMFS & NOAA (2009) e COSEWIC (2010).

No Oceano Índico, as agregações de nidificação ocorrem nas praias do Norte de Kwazulu-Natal na África do Sul, no sul de Moçambique (Baldwin *et al.*, 2003), em Madagáscar (Rakotonirina, 2001), na costa do Mar da Arábia e nas ilhas de Halaniyat em Omã (Ross & Barwani, 1982), na Ilha Socotra no Iêmen (Pilcher & Saad, 2000), no Sri Lanka (Kapurusinghe, 2006) e na Austrália Ocidental (Dodd, 1988). A maior população de nidificação de tartarugas cabeçadas no mundo ocorre na Ilha de Masirah (Omã), com cerca de 20 a 40 mil ninhos por ano (Baldwin *et al.*, 2003).

A agregação de Kwazulu-Natal apresenta o programa de monitoria mais longo da região do DPS do Oceano Índico Sudeste, com mais estudos de investigação, incluindo sobre os habitats de alimentação das fêmeas pós-nidificação (USFWS-NOAA, 2011). Vários



estudos evidenciam que as fêmeas de tartarugas cabeçudas migram entre África do Sul, Moçambique, Seychelles Madagáscar, Tanzânia e Quênia (Bowen *et al.*, 1994; Baldwin *et al.*, 2003; Luschii *et al.*, 2006). Apesar de ter sido reportada a possibilidade das tartarugas nidificantes migrarem para sudoeste, passando pelo Cabo das Agulhas, não existem estudos de conectividade entre a população do DPS do Oceano Índico Sudoeste e os outros DPS (Bowen & Avise, 1994; Luschii *et al.*, 2006; Shamblin *et al.*, 2014).

1.4.2 CICLO DE VIDA DA TARTARUGA CABEÇUDA

O modelo do ciclo de vida das tartarugas cabeçudas foi criado através de estudos das populações que nidificam no Noroeste Atlântico e assumindo similaridade para outras populações, mas sem excluir a possibilidade de variações inter-populacionais. Assim, para simplificação dos padrões comportamentais das tartarugas-cabeçudas designaram-se três etapas principais: crias, juvenis e adultos (Casale *et al.*, 2006).

Existem vários estudos que visaram determinar a potencial contribuição de determinadas áreas de nidificação para a população regional de tartarugas, nomeadamente o sucesso de eclosão e o sexo das crias (Standora & Spotila, 1985; Mrosovsky & Pieau, 1991; Rees & Margaritoulis, 2004; Casale *et al.*, 2006; Zbinden *et al.*, 2007; Mrosovsky *et al.*, 2009; Valenzuela & Adams, 2011; Jribi *et al.*, 2013).

As tartarugas marinhas possuem 56 cromossomas mas nenhum está associado à determinação do sexo. Assim, ao contrário das aves (Bantock *et al.*, 2008) e mamíferos (Curtis *et al.*, 2007), a determinação do sexo depende da temperatura a que o ninho é sujeito no segundo estágio da incubação (Mrosovsky & Pieau, 1991).

Estudos indicam que as populações de tartarugas cabeçudas possuem características relativamente conservadoras em relação à temperatura *pivot*, que varia entre 28.8 – 29.2°C (Davenport, 1997; Rees & Margaritoulis, 2004; Mrosovsky *et al.*, 2009). A esta temperatura a proporção de machos e fêmeas é igual (Maxwell *et al.*, 1988; Boonzaaier, 2011). Quando a temperatura é superior à temperatura *pivot* há maior produção de fêmeas e para temperaturas mais baixas há uma maior proporção de machos. Para os intervalos de temperaturas entre aproximadamente 25°C e 34°C (McGehee, 1979; Yntema & Mrosovsky, 1980; Yntema & Mrosovsky, 1982; Limpus, 1985) os modelos matemáticos sugerem uma correlação negativa entre a temperatura e a duração da

incubação (Mrosofsky *et al.*, 1999; Zbinden *et al.*, 2006), correspondendo aproximadamente a uma variação de 6.5 a 13 semanas (Miller *et al.*, 2003). Assim, com base no intervalo de incubação e temperaturas do ninho é possível estimar o sexo das crias (Standora & Spotila, 1985; Mrosofsky *et al.*, 1999).

A monitoria da temperatura da areia na RMPPO em 2011/12, feita com termómetros *Tinytag Underwater Aquatic 2*, permitiu verificar que actualmente existe maior produção de fêmeas mas, quando comparado com estudos feitos na África do Sul por Maxwell e colaboradores (1988) evidenciaram um potencial maior de produção de machos na RMPPO (Pereira *et al.*, 2013), que pode estar associado à presença de elevadas dunas vegetadas que fazem sombra para os ninhos, ou a um arrefecimento da temperatura atmosférica.

Os ovos que se encontram mais próximos da superfície estão sujeitos a uma temperatura mais alta e por isso têm duração de incubação menor, o que resulta na emergência assíncrona das crias (Hays *et al.*, 1992; Houghton & Hays, 2001). Geralmente, as crias de tartarugas cabeçudas emergem à noite, uma estratégia que ajuda a evitar a predação e a prevenir o sobreaquecimento (Moran *et al.*, 1999). No entanto, já foram reportados casos de emergências durante o dia (Balazs & Ross, 1974). Nesses casos, as crias ficam a uns centímetros do topo antes de iniciar a deslocação (Caldwell, 1959; Bustard, 1967). As pistas para iniciarem a marcha para o mar provavelmente estão relacionadas com a temperatura (Bustard, 1967; Mrosofsky, 1968; Witherington *et al.*, 1990; Hays *et al.*, 1992; Gyuris, 1993) e a visão (Moran *et al.*, 1999).

O período de natação activa das crias é conhecido por *frenesim natatório*, cujo objectivo é alcançar as principais correntes oceânicas (Wyneken & Salmon, 1992). Portanto, durante esta fase, as crias orientam-se em relação à direcção das ondas e do campo magnético (Lohmann, 1991; Lohmann & Lohmann, 1994; Lohmann *et al.*, 1995; Lohmann, 1996) e alimentam-se de material flutuante (Hughes, 1974). Findo este período de pré-desenvolvimento, que pode ter uma duração de dias ou meses, as crias entram na zona oceânica. No entanto, Bolten (2003) menciona a possibilidade de alguns indivíduos não abandonarem a zona nerítica.



O biólogo Archie Carr designou o período da fase oceânica das crias de "os anos perdidos" (Carr, 1986), pois os investigadores reportaram que as crias com cerca de 40 cm de comprimento da carapaça ao entrar no mar não voltavam a ser avistadas na mesma área (Bolten & Balazs, 1995, citados por Miller *et al.*, 2003). Actualmente estima-se que esta fase tenha uma duração de seis a doze anos, sendo variável em função da localização, das correntes oceânicas, e da disponibilidade de alimento (Bjorndal *et al.*, 2000).

Os juvenis desenvolvem uma camada de gordura de aproximadamente 2 cm à volta da camada interior da carapaça que as protege do frio. As tartarugas cabeçudas são carnívoras e alimentam-se de epibentónicos, embora ocasionalmente também possam capturar presas na coluna de água (Bjorndal, 2003), especialmente moluscos (Dodd, 1988). Hughes (1974) analisou o conteúdo estomacal de 26 tartarugas cabeçudas e verificou que as tartarugas com 60 a 70 cm continham material flutuante semelhante ao das crias, as tartarugas de 70 a 80 cm possuíam material flutuante e organismos bentónicos do filo *Molusca*, sendo frequente a presença de crinóides (ex. *Bufo naria crimenoides*), gastrópodes (ex. *Ficus subintermedius*) e bivalves (ex. *Perna perna*), evidenciado o período de transição para a típica dieta das tartarugas adultas, com mais de 80 cm. Outros estudos também evidenciaram o canibalismo e a captura de peixes pelas tartarugas adultas (Mileham, 1965, citado por Hughes, 1974).

As tartarugas imaturas não possuem características sexuais secundárias (Valenzuela *et al.*, 2004). Assim, a identificação morfológica do sexo em juvenis geralmente requer um exame invasivo ou letal das gónadas internas e ductos acessórios (Wyneken *et al.*, 2007). Alternativamente podem ser feitos exames de sangue por radioimunoensaio para medir a quantidade da hormona testosterona (Gregory & Schmid, 2001; Geis *et al.*, 2005).

Nesta fase, as tartarugas têm movimentos activos (Bjorndal, 2003). As primeiras hipóteses sugeriam que a mudança dos juvenis da zona oceânica para a nerítica era ontogenética e unidirecional (Carr, 1986), mas gradualmente observou-se que este pressuposto estava incorrecto e que elas podem retornar para as áreas oceânicas, e em alguns casos só deixam os habitats oceânicos durante a época de reprodução (Eckert & Martins, 1989; McClellan & Read, 2007; Reich *et al.*, 2010). Dalleau e colaboradores



(2014) por exemplo, evidenciaram duas rotas de migração de juvenis marcados por satélite na proximidade das Ilhas Reunião, uma para a região de Omã e outra para a região da África do Sul.

Com base nos dados de marcação por mutilação (incisões nas carapaças) de crias e recaptura de fêmeas durante a época de nidificação, estima-se que estas atingem a maturidade sexual entre os 28 e os 45 anos (Scott *et al.*, 2012; Tucek *et al.*, 2014).

As tartarugas adultas maturadas, fêmeas e machos, migram das áreas de alimentação para áreas próximas da praia de nidificação, mediante corredores migratórios específicos (Bolten, 2003). A copulação pode ocorrer ao longo da migração e próximo das praias de nidificação (Limpus, 1992). Durante a cópula o macho morde a fêmea, maioritariamente no pescoço e ombros, e prende as garras entre os ombros e margem da carapaça provocando ferimentos (Miller *et al.*, 2003).

O período de acasalamento pode demorar mais de 6 semanas (Miller *et al.*, 2003). Geralmente, as fêmeas não se reproduzem todos os anos (Hirth, 1980; Dodd, 1988) mas os machos podem fazê-lo (Wibbels *et al.*, 1990).

As tartarugas cabeçudas fêmeas podem acasalar com mais de um macho, tal como foi observado através de análises de aloenzimas (Harry & Briscoe, 1988) e microssatélites (Bollmer *et al.*, 1999; Moore & Ball, 2002) de amostras de crias dos mesmos ninhos. Não se encontrou nenhuma associação significativa entre a poliandria e indicadores de sucesso reprodutivo (o número de ovos, a proporção de ovos fertilizados, o sucesso de eclosão e a sobrevivência das crias até ao mar) em tartarugas verdes nas Ilhas Ascensão, dando suporte à hipótese de que a fêmea acasala com alguns machos apenas para escapar à incessante perseguição masculina (Lee & Hays, 2004).

Estudos sobre a reprodução de tartarugas, quer marinhas, quer de água doce, evidenciam que estas podem armazenar esperma nos ovidutos (Gist & Jones, 1989), até uma duração máxima de 4 anos (Ewing, 1943; Magnusson, 1979; Pearse & Avise, 2001). Assim, as tartarugas fêmeas não necessitam de acasalar durante os intervalos entre ninhos da mesma época (Gist & Congdon, 1998). A duração longa de armazenamento de esperma confere uma vantagem selectiva que traz enormes

benefícios de valor adaptativo (*fitness*: Oring *et al.*, 1992) e a garantia de fertilização dos ovos (Conner & Crews, 1980; Jun-yi, 1982; Olsson *et al.*, 1996).

Durante a época de desova, que ocorre entre Outubro e Março no Hemisfério Sul, e entre Maio a Agosto no Hemisfério Norte (Dodd, 1988), as fêmeas podem perder até um quarto do peso corporal para a produção de ovos telolécitos. Assim, durante este período, estão mais susceptíveis a temperaturas baixas, provavelmente optando, por isso, por manter-se em regiões com temperaturas mais amenas. Esta sugestão é reforçada pelo programa de recuperação de marcadores e da baixa captura de tartarugas na rede anti-tubarões em Kwazulu-Natal, África do Sul, durante o período de desova (Hughes, 1974).

Vários estudos de marcação e retorno mostram que as tartarugas fêmeas nidificam nas mesmas praias entre as sucessivas épocas de reprodução (Meylan, 1982; Bjorndal *et al.*, 1983). No entanto, foi através dos estudos genéticos e de marcação de crias (Hughes & Brent, 1972, citado por Tucek *et al.*, 2014) que se determinou que as tartarugas cabeçudas nidificam na mesma região em que nasceram, fenómeno designado por *natal homing* (Miller *et al.*, 2003) rejeitando a hipótese de que as tartarugas seguiam as rotas de tartarugas mais experientes, fenómeno designado por *social imprinting* (Owens *et al.*, 1989).

Ao emergirem, as tartarugas cabeçudas fêmeas deixam um rasto com 70 a 90 cm de largura, moderadamente profundo e as marcas são diagonais e assimétricas, dada a forma de deslocação das barbatanas frontais (Miller *et al.*, 2003).

A tartaruga fêmea selecciona o local para nidificar preferencialmente acima da linha de maré alta, para o ninho não sofrer inundações que podem ser letais para os embriões (Whitmore & Dutton, 1985), mas sem ser demasiado longe do mar para reduzir o tempo de exposição aos predadores (Blamires *et al.*, 1998) e/ou reduzir a probabilidade de desorientação das crias (Godfrey & Barreto, 1995).

As características ambientais do ninho, nomeadamente a temperatura, a humidade, a salinidade e a coesão e permeabilidade da areia, afectam o sucesso da embriogénese, a proporção entre os sexos, o *fitness*, a vulnerabilidade aos predadores de ovos, entre outros factores (Spotila *et al.*, 1987; Mortimer, 1990; Miller, 1997).



Por vários motivos, as tartarugas cabeçudas podem abortar a postura de ovos (Limpus, 1985; Dodd, 1988) mas geralmente regressam, na mesma noite ou na noite seguinte, à mesma praia para nidificar (Limpus, 1985).

Por época de nidificação, uma tartaruga cabeçuda pode fazer entre 3 a 5 ninhos, com intervalo entre 12 a 15 dias (Miller, 1997; Shanker *et al.*, 2003). Por cada ninho, são depositados entre 100 a 120 ovos (Hughes *et al.*, 1967). A postura dos ovos requer entre 1 a 2 horas (Hirth, 1980).

Os ovos das tartarugas cabeçudas são brancos, esféricos, cleidóicos com casca flexível de aragonite, medem aproximadamente 4 cm de diâmetro e pesam em média 36g (Ewert, 1979; Van Buskirk & Crowder, 1994)

Após o período de nidificação as fêmeas retornam para as áreas de alimentação, onde permanecem até à próxima época de desova, isto é, durante um período que varia entre 2 a 3 anos (Schroeder *et al.*, 2003).

1.5 JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO

As tartarugas cabeçudas encontram-se em perigo de extinção de acordo com a lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature*, IUCN; IUCN, 2014) e no apêndice I da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Fauna e da Flora Selvagem Ameaçadas de Extinção (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*, CITES) e apêndice I e II da Convenção sobre a Conservação de Espécies Migradoras da Fauna Selvagem (*Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals*, CMS; também conhecida como Convenção de Bona).

A Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro (RMPPPO), criada em 2009, reforçou a optimização do esforço de monitoria e a qualidade dos dados recolhidos que havia sido iniciado em 1994 entre a Ponta Malongane e a Ponta Dobela. Desde 2010, a RMPPPO e a Associação para Investigação Costeira e Marinha (AICM) iniciaram a recolha de amostras de tecido de tartarugas marinhas para posterior análise genética e contribuição para o conhecimento da sua estrutura populacional (M. Pereira, com. pess.).

O conhecimento da estrutura populacional de uma espécie numa determinada área geográfica é fundamental para a delimitação de um plano de gestão e conservação, uma vez que a diversidade genética dentro e entre as populações naturais influencia directamente a capacidade de adaptação das espécies e é, por isso, essencial para a sua conservação.

Assim, a escolha desta área para a realização do presente estudo deve-se ao facto de esta ser a maior e mais importante área de nidificação de tartarugas cabeçudas no país (Videira *et al.*, 2008), que fazem parte do Segmento Populacional Discreto do Oceano Índico Sul (USFWS-NOAA, 2011), e ao facto de existir uma plataforma de colaboração e apoio logísticos proveniente da parceria entre a RMPPPO, a AICM e o Centro Terra Viva (CTV), criada em 2009.

1.6 OBJECTIVOS

Este estudo teve como objectivo principal determinar a estrutura populacional, variabilidade genética e o tamanho efectivo da população de tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*) que desovam na Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro (RMPPPO) e a sua potencial conectividade com outras áreas de nidificação e alimentação.

As análises genéticas utilizadas (ADN mitocondrial e ADN nuclear) constituem a componente mais importante deste estudo. No entanto, de modo a contextualizar, são igualmente referidos dados de monitoria, marcação/recaptura e da aplicação de marcadores satélites colhidos durante as últimas quatro épocas.

Desta forma, o estudo visa:

- i. Contribuir para a identificação dos níveis de diferenciação entre as populações (organizadas em Unidades de Gestão Regionais);
- ii. Contribuir para a associação dos haplótipos das áreas de alimentação com os haplótipos das áreas de nidificação;
- iii. Avaliar a contribuição de machos e fêmeas para a conectividade entre populações. Estas informações irão permitir determinar o estado das populações nidificantes nas praias da RMPPPO quanto à sua história demográfica e viabilidade a longo prazo por forma a otimizar a sua conservação.
- iv. O estudo visa também analisar e discutir a importância dos dados moleculares e as suas aplicações práticas, aliado a outros parâmetros biológicos, para a preservação de tartarugas cabeçuda.

1.7 HIPÓTESES

A monitoria e marcação/recaptura de fêmeas de tartarugas cabeçudas em Moçambique e na África do Sul evidenciam que estas correspondem a uma população única (USFWS-NOAA, 2011). Contudo, não existe nenhum estudo genético baseado em amostras de tartaruga cabeçuda nas áreas de nidificação de Moçambique. Assim, e juntamente com a reduzida diversidade genética da espécie, esperada também nas populações em estudo, a hipótese para este trabalho foi de que deveria ser encontrado maioritariamente o mesmo haplótipo que o descrito para a África do Sul e, tendo em consideração a complexidade

das rotas migratórias, a probabilidade de se observar estruturação populacional, quer ao longo das praias da RMPPO quer entre as regiões (Sul de Moçambique e África do Sul) seria baixa. Em relação a demografia populacional a hipótese era de que a população sofreu uma redução recente e actualmente esta a aumentar de dimensão.

Esta tese está dividida em seis capítulos:

Capítulo 2 – “Descrição da área de estudo”. Este capítulo apresenta o georreferenciamento da área de estudo e a descrição oceanográfica e climatológica da região. Descreve os ecossistemas costeiros e marinhos da RMPPO, em especial as florestas dunares, praias arenosas e recifes de corais, que qualificam esta área como hotspot de biodiversidade e suportam o estatuto de conservação da área.

Capítulo 3 – “Monitoria e marcação de tartarugas cabeçudas”. Este capítulo retrata o histórico da monitoria e marcação entre a Ponta do Ouro e a Ponta Abril e analisa os dados de monitoria e marcação de fêmeas cabeçudas para inferir o tamanho populacional e características biológicas e comportamentais, como por exemplo o número de ninhos por fêmeas, a biometria e os intervalos de reimplantação.

Capítulo 4 – “Estrutura genética populacional de tartaruga cabeçuda na Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro”. Neste capítulo é feita a descrição a diversidade genética das tartarugas cabeçudas com base no ADN mitocondrial e no ADN nuclear. Apresenta-se a relação entre os haplótipos e os locais onde estes já foram reportados. Ainda, é feita a inferência sobre a estruturação, o tamanho do efectivo populacional e a demografia da população de tartarugas cabeçudas.

Capítulo 5 – “Conclusões”. Aborda sobre a hipótese de colonização recente das praias de nidificação da RMPPO, a relação do tamanho populacional inferido pela monitoria e marcação e pela diversidade genética, e a sua relação para a conservação das tartarugas cabeçudas.

Capítulo 6 – “Recomendações para futuros estudos de investigação”. Indica potenciais áreas de investigação para aumentar o conhecimento da dinâmica populacional de tartarugas cabeçudas e suporte para as medidas de conservação plasmadas no plano de manejo da RMPPO e estratégias nacionais para a conservação desta espécie.

CAPÍTULO 2. DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

2.1 LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA ÁREA DE ESTUDO

Moçambique encontra-se no sudeste de África, entre as latitudes $10^{\circ}27'S$ e $26^{\circ}52'$ e longitudes $30^{\circ}12'E$ e $40^{\circ}51'E$, e possui cerca de $784,032\text{km}^2$ de área e está subdividido em 10 províncias (ASCLME, 2012). O país faz fronteira com a Tanzânia no limite a Norte, com o Malawi, a Zâmbia e o Zimbabwe a Oeste e com a África do Sul e a Suazilândia a Sul e a costa Este é banhado pelo Oceano Índico. Possui uma linha de costa de 2 470 km, sendo a maior linha de costa da região da África oriental (Figura 2.1-a). A plataforma continental possui cerca de $104\,300\text{ km}^2$.

A área de estudo foi a Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro (RMPPO) que localiza-se no extremo sul de Moçambique, pertencendo ao distrito de Matutuíne, na província de Maputo (Figura 2.1-b). Este distrito possui uma superfície de $5\,387\text{ Km}^2$. A área de estudo compreendeu o limite sul da costa da Ponta do Ouro junto a fronteira com a África do Sul até a Ponta Abril, correspondendo às latitudes $26^{\circ}51'S$ e $25^{\circ}60'S$ numa extensão de aproximadamente 90 km de praia (Figura 2.1-c).

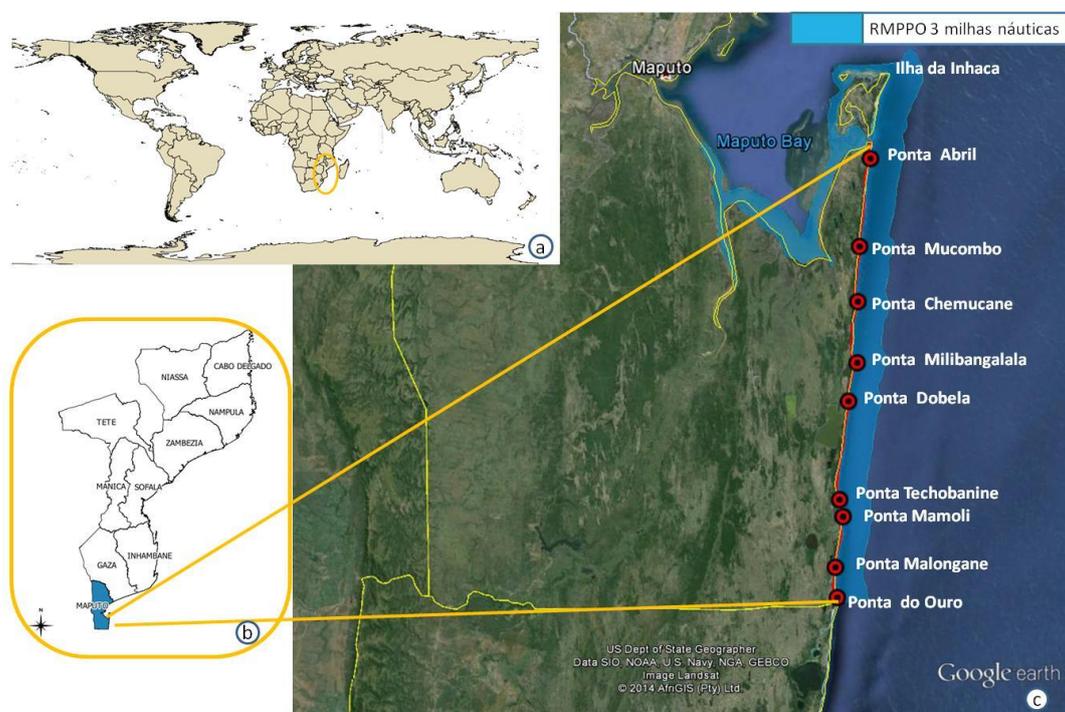


Figura 2.1 - a) Localização de Moçambique num *mapa mundi* (círculo amarelo); **b)** Destaque a azul da província de Maputo no extremo Sul de Moçambique e **c)** Os limites da área de estudo e as principais pontas.

2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E BIOLÓGICAS GERAIS DA REGIÃO

2.2.1 OCEANOGRAFIA

O Oceano Índico é caracterizado pela Corrente Equatorial Sul (SEC), que flui na direcção Este-Oeste, com fornecimento do fluxo da corrente da Indonésia (ITF; Figura 2.2). Perto da costa Este de Madagáscar, a SEC divide-se em duas correntes, a Corrente Nordeste de Madagáscar (NEMC) e a Corrente Sudeste de Madagáscar (SEMC). A NEMC transporta cerca de 30 Sverdrup (Sv) para a Corrente Costeira da África Oriental (EACC), contribuindo também para o fornecimento de água para o Canal de Moçambique (Schott & McCreary, 2001). A SEMC transporta cerca de 20 Sv para o extremo sul de Madagáscar, onde se formam vários vórtices dipolos que migram para a costa Africana mas uma parte da SEMC pode retroflectir, alimentando o fluxo noroeste, a Este de Madagáscar (De Ruijter *et al.*, 2004; Quartly & Srokosz, 2004; Quartly *et al.*, 2006). No entanto, os estudos referidos anteriormente salientam que é provável que estes volumes estejam sujeitos a variações sazonais.

Ao longo da larga amplitude latitudinal de Moçambique (10°20'S e 26°50'S), podem-se identificar duas massas de água superficiais (até 100-150 metros de profundidade): a água superficial tropical, que é influenciada pela massa de água equatorial da SEC (salinidade igual a 35.5) na região norte, e a massa de água superficial subtropical (salinidade superior a 35.5), proveniente do centro do vórtice anticiclónico subtropical do Oceano Índico, na região sul (Saetre & da Silva, 1982). Assim, tal como reportado por Sete *et al.* (2002), a temperatura superficial anual é mais baixa na região sul de Moçambique do que na região norte. O Canal de Moçambique, com 400 km de largura no ponto mais estreito, separa Moçambique da Ilha de Madagáscar. A Ilha de Madagáscar é uma barreira para algumas das dinâmicas do Oceano Índico, como os giros, excepto nos extremos sul e norte (Massinga & Hatton, 1996).

Vários estudos recentes têm estudado as dinâmicas oceanográficas do Canal de Moçambique, evidenciando a ligação das correntes associadas às monções das regiões tropicais através das correntes do canal de Moçambique que flui para o sul até a jusante do sistema de intercâmbio Interoceânica em torno de África do Sul, formando o sistema

da corrente das Agulhas. Existem dois tipos de monções, a Monção de Nordeste e a Monção de Sudoeste (Lutjerharm, 2006; Schott *et al.*, 2009; Lutjerhams *et al.*, 2012; Ternon *et al.*, 2013).

Durante a Monção de Nordeste (Novembro a Março) a Corrente Equatorial Norte (NEMC) desloca-se até à costa africana onde, ao nível da linha do equador, flecte para Este e origina a Contracorrente Equatorial Sul (SECC), que se desloca para Leste, completando um giro com o sentido oposto ao dos ponteiros do relógio. No Hemisfério Sul, a Corrente Equatorial Sul (SEC) continua, junto ao continente Africano, como Corrente das Agulhas. Esta corrente, de água quente, banha as costas orientais do Sul de África, até flectir para sudeste, altura em que se junta à Corrente Circumpolar Antártica (Schott *et al.*, 2009).

Durante a Monção de Sudoeste (Maio a Setembro), a Corrente Equatorial Norte (NEC) muda de sentido e, juntamente com a Contracorrente Equatorial (ECC), originam a Corrente de Monção de Sudoeste (SMC). Por sua vez, a Corrente Equatorial Sul (SEC) origina a Corrente da Somália (SC), que atravessa o Equador e desloca-se para Norte, formando um giro no sentido do ponteiro do relógio, até se juntar à Corrente de Monção. A Corrente Equatorial Sul, a Corrente da Somália e a Corrente de Monção, formam um giro provocado pelos ventos dominantes, criando *upwellings* nas costas da Somália e da Arábia (Schott *et al.*, 2009).

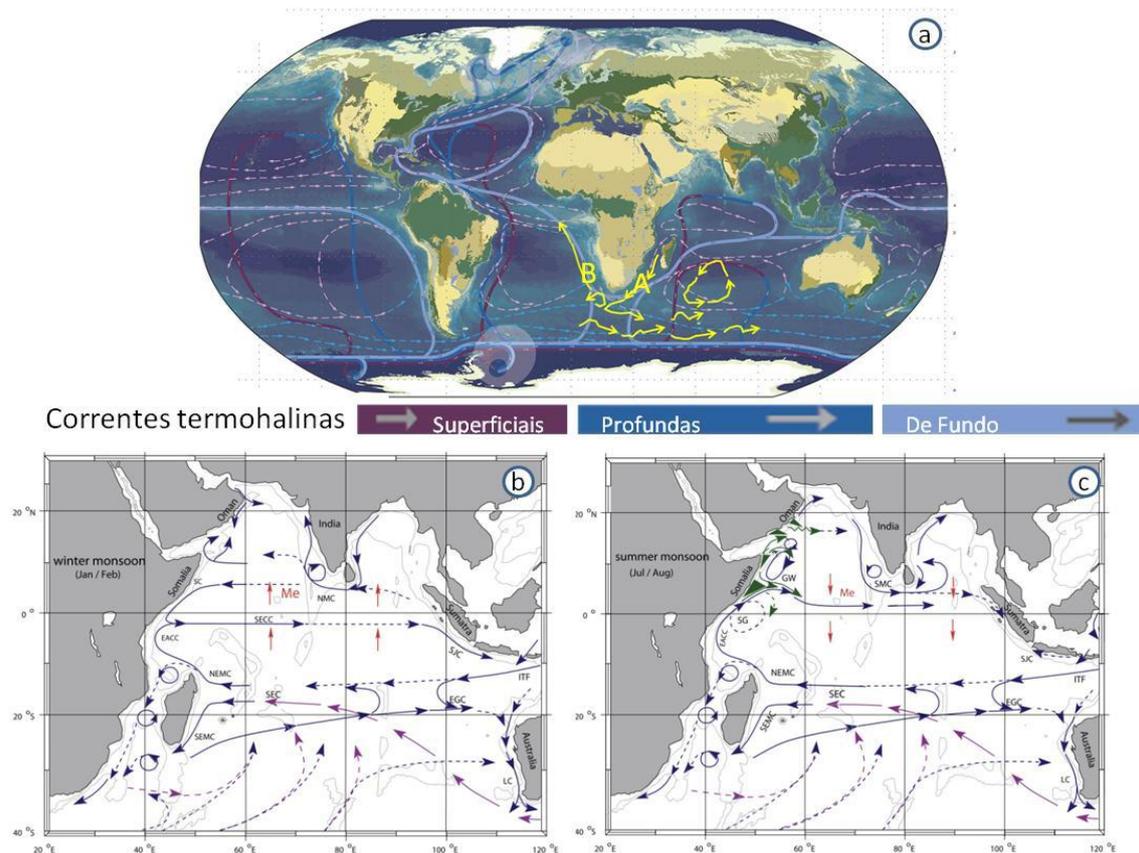


Figura 2.2 - Representação esquemática das principais correntes oceânicas do Oceano Índico e do Suldeste do Oceano Atlântico. **a)** Fluxo de calor, correntes termohalinas, Corrente das Agulhas (A) e Corrente de Benguela (B). **b)** Monção de Nordeste e **c)** Monção de Sudoeste. Corrente Equatorial Sul (SEC), Contracorrente Equatorial Sul (SECC), Corrente Equatorial Nordeste e Sudoeste de Madagáscar (NEMC e SEMC), Corrente Costeira da África Oriental (EACC), Corrente da Somália (SC), Giro do Sul (SG), Grande Whirl (GW) e upwelling (sombreado verde), Correntes das Monções Sudoeste e Nordeste (SMC e NMC), Corrente Java Sul (SJC), Corrente Este do Giro (EGC), e Corrente de Leeuwin (LC). O fluxo de retorno subsuperficial do supergiro é mostrado em magenta. Vectors vermelhos apontam as direções dos transportes meridionais Ekman (Me). ITF mostra fluxo da corrente da Indonésia (Adaptado de *The Global Education Project* e *Schott et al.*, 2009).

No canal de Moçambique formam-se em média cinco a seis vórtices anticiclónicos por ano (De Ruijter *et al.*, 2002; Backeberg *et al.*, 2008). Estes vórtices com 300 a 350 km de diâmetro propagam-se na direcção sul a aproximadamente 3-6 km por dia, podendo as correntes, nas extremidades do vórtice, alcançar a velocidade de 2 m/s (Schouten *et al.*, 2002; Schouten *et al.*, 2003) e produzir uma corrente para sul do canal de Moçambique e outra em direcção a norte para o lado de Madagáscar (De Ruijter *et al.*, 2002). De acordo com de Ruijter e colaboradores (2002), os vórtices de Moçambique podem ser transportadores efectivos de água do Mar Vermelho, em direcção à Corrente

das Agulhas. No entanto, Lutjerhams e colaboradores (2012) relataram um evento de corrente contínua de curta duração, que foi caracterizado como atípico, intermitente e altamente irregular, com uma duração média de 9 dias (± 5 DP; Lutjerhams *et al.*, 2012).

Na região Sul, a plataforma continental estende-se até cerca de seis milhas náuticas de largura, das quais as três milhas náuticas iniciais pertencem à RMPPPO. Esta região é fortemente influenciada pela Corrente das Agulhas (Bjerner & Johansson, 2001; DNAC, 2011). O ciclo de marés é semi-diurno (com duas marés baixas e duas marés altas por dia) e a amplitude varia entre 1.8 a 2.4 m (Pereira *et al.*, 2004). Contra-correntes junto à costa, com direcção sul-norte são comuns (Saetre & da Silva, 1982), mas tendem a ser fracas ($< 0.25 \text{ m.s}^{-1}$; Schumman, 1988, citado por Pereira *et al.*, 2004). A temperatura média anual das águas costeiras da região é de 24.0°C , variando entre 22.5°C no inverno a 26.4°C no verão. As contra correntes no sul de Moçambique (Baía de Maputo) formam penínsulas orientadas para norte, principalmente Machangulo (Santa Maria), Inhambane e São Sebastião (Penínsulas do Bazaruto; Saetre & Silva, 1979; Sete *et al.*, 2002; Lutjerharm, 2006).

2.2.2 CLIMA

De acordo com a classificação de Koppen o clima da região sul de Moçambique é subtropical (Bjerner & Johansson, 2001), mas na região costeira o clima é tropical de savana (Aw: “A” significa clima tropical e “w” significa estação seca no inverno, tendo origem na palavra inglesa *winter*: Cuamba *et al.*, 2006).

O clima está dividido em duas estações: a fria, que compreende o período de Abril a Setembro, e a quente, de Outubro a Março. A época quente corresponde à época de maior precipitação, sendo Dezembro e Janeiro os meses mais chuvosos.

2.2.3 BIODIVERSIDADE COSTEIRA E MARINHA NA RMPPO

Da diversidade ecológica que é possível encontrar na área, destacam-se as dunas cobertas de vegetação, lagoas costeiras, praias arenosas de águas quentes e transparentes e recifes de corais, aliadas a uma paisagem cénica (Hatton, 1995).

As dunas parabólicas vegetadas que atingem alturas superiores a 100 metros e os lagos de barreira e extensas praias de areia são típicos desta secção (Hatton, 1995; Massinga & Hatton, 1996). Estas praias são tipicamente arenosas e largas possuindo algumas zonas rochosas, como a ponta conspícua da Ponta do Ouro (Figura 2.3-a), Ponta Mamoli, Ponta Mucombo e Ponta Abril. A área terrestre é caracterizada por uma riqueza de biodiversidade de plantas e elevado nível de endemismo (CEPF, 2010).

A costa arenosa é tipicamente caracterizada por dunas primárias, colonizadas por plantas pioneiras como *Scaevola plumieri*, *Ipomoea pes-caprae*, *Cyperus maritimus* e *Sporobolus virginicus*, e por dunas secundárias onde a vegetação lenhosa se torna predominante (Bandeira *et al.*, 2007). Duas espécies de tartarugas marinhas, a tartaruga cabeçuda (*Caretta caretta*) e a tartaruga de couro (*Dermochelys coriacea*) desovam nestas praias arenosas (Magane & João, 2002).

A área total de recife no Sul do país tem aproximadamente 5km² (ORI, dados não publicados, citado por DNAC, 2011). A fauna documentada dos recifes subtidais é muito diversificada, dominada por 376 espécies de peixes (Pereira *et al.*, 2004), 19 géneros de corais duros e 10 de corais moles, 9 géneros de esponjas e 5 géneros de tunicatos (Robertson *et al.*, 1996). Os corais moles (Alcyonacea) são dominados pelos géneros *Lobophytum*, *Sinularia* e *Sarcophytom* (Pereira *et al.*, 2004). Nesta área também foram identificados recifes mais profundos, onde ocorrem corais duros ramificados, encrustantes e maciços (respectivamente *Acropora*, *Echinopora* e *Porites*; Pereira 2004). A maior parte dos peixes de corais registados pertencem aos peixes borboletas (Chaetodontidae), peixe-papagaio (Labridae), peixe-barbeiro (Acanthuridae), peixe-castanhetas (Pomacentridae), peixe-porco (Balistidae) e garoupas (Serranidae). Algumas espécies predadoras pertencem as famílias Carangidae e Lutjanidae (Robertson *et al.*, 1996; Pereira, 2003; Pereira & Fernandes, 2014). Os recifes costeiros menos profundos são também habitat de vários invertebrados como por exemplo,

lagostas (*Panulirus* spp.), mexilhões, ostras, ascídias e lapas (Kyle, 1992, citado por DNAC, 2011). Nos recifes já foram observadas tartarugas marinhas verdes (*Chelonia mydas*; Figura 2.3-b) e bico-de-falcão (*Eretmochelys imbricata*). Diferentes espécies de mamíferos marinhos ocorrem na área, nomeadamente de golfinhos das espécies *Tursiops aduncus*, *Tursiops truncatus* e *Sousa chinensis* (Guissamulo & Cockcroft, 2004; Muando, 2012), baleia corcunda (*Megaptera novaengliae*), baleia franca do sul (*Eubalaena australis*) e orca (*Orcinus orca*; Gonçalves, P. comm. pess.).

Sob influência dos rios Limpopo, Incomáti e Maputo, que anualmente escoam cerca de 208km³ de águas ricas em nutrientes para a Baía de Maputo (Saetre & da Silva, 1982), do estuário do Rio Bembé, e pelas características oceanográficas da baía, a região oriental da Península de Machangulo possui uma pequena área de mangal (Figura 2.3-c) composta por cinco espécies: *Avicennia marina*, *Rhizophora mucronata*, *Bruguiera gymnorrhiza*, *Ceriops tagal* e *Lumnitzera racemosa* (DNAC, 2011).

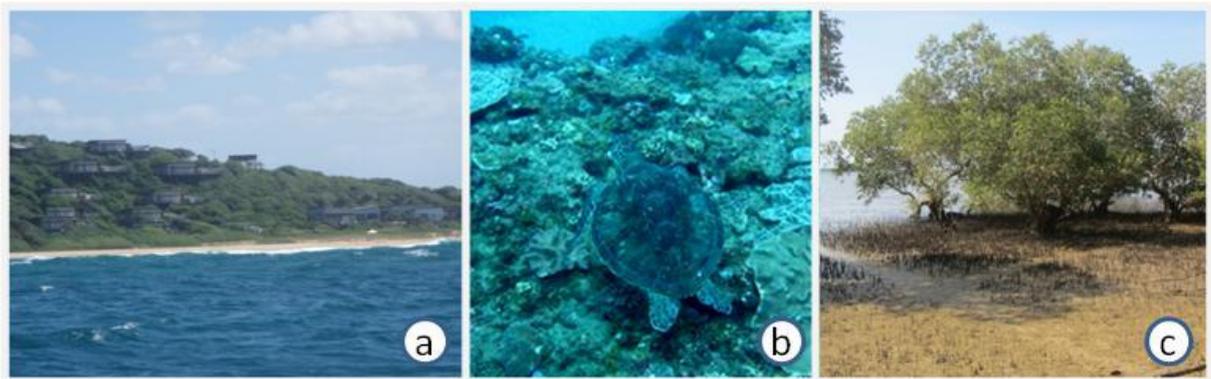


Figura 2.3 - a) Dunas da Ponta do Ouro; b) Tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) juvenil a alimentar-se no recife “Texas” da RMPPPO e c) Mangais em Santa Maria.

2.3 ESTATUTO DE PROTECÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro (RMPPPO) com uma superfície de 678Km², foi criada pelo Decreto-Lei n.º 42/2009, de 21 de Agosto para facultar a preservação e protecção das espécies marinhas, costeiras e seus habitats, incluindo as dunas primárias da praia.

Na área de estudo são permitidas várias actividades turísticas, como por exemplo caminhar na praia, mergulho de apneia ou scuba, observação de mamíferos marinhos, pescas recreativa e desportiva, desde que sejam cumpridas as regras estabelecidas no plano de manejo. Assim, constituem práticas interditas dentro dos limites da reserva: a pesca semi-industrial e industrial; apanha ou pesca de espécies nos recifes de coral; pesca com dinamite e/ou substâncias nocivas ou outro método prejudicial para as espécies; pesca de qualquer espécie protegida por lei; condução de veículos motorizados ao longo da praia; construção de infra-estruturas, salvo acampamentos precários de pescadores artesanais (DNAC, 2011).

CAPÍTULO 3. MONITORIA E MARCAÇÃO DE TARTARUGAS CABEÇUDAS

3.1 INTRODUÇÃO

O programa de monitoria e marcação das tartarugas marinhas nidificantes iniciou em 1994 entre a Ponta Malongane e a Ponta Dobela, numa extensão de 30km. Nesta fase inicial, o programa era liderado pelo Sr. Pierre Lombard com apoio técnico do Dr. George Hughes, que na altura coordenava o programa de monitoria na África do Sul.

No período entre 1994 a 2007 o esforço de monitoria foi muito irregular e geralmente cobria os meses de Dezembro e Janeiro. A partir de 2007, com o apoio de diversas organizações como a AICM, o CTV e o WWF, o programa de monitoria passou a cobrir a área entre a Ponta do Ouro e a Ponta Mucombo. Actualmente a monitoria é realizada entre Outubro a Março, e integra cerca de 50 monitores provenientes das comunidades locais e cobre toda a costa do Distrito de Matutuíne, desde a Ponta do Ouro à Ponta Abril.

Ao longo dos 20 anos de monitoria, entre as épocas 1992/93 a 2013/14, foram marcadas 1545 tartarugas fêmeas e registados 4974 ninhos e 10385 emergências de tartarugas cabeçudas (Videira *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Videira *et al.*, 2011; Louro *et al.*, 2012; Louro & Fernandes, 2013; Fernandes *et al.*, 2014). Pereira e colaboradores (2014) reportaram um aumento do número de emergências de tartarugas cabeçudas e tartarugas gigantes na RMPPO nas últimas seis épocas (2007/8 a 2013/14) possivelmente devido ao aumento do esforço de monitoria, resultante da extensão da área e período de monitoria. Durante este período, foram reportados em média 296 ninhos (± 118 DP) ninhos de tartaruga cabeçuda e 28 (± 11 DP) ninhos de tartaruga gigante (Pereira *et al.*, 2014a).

A área da RMPPO é considerada um *hotspot* de nidificação de tartarugas cabeçudas em Moçambique, onde tem sido reportado mais de 80% dos ninhos destas espécies em relação ao resto do país (Videira *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Videira *et al.*, 2011; Louro *et al.*, 2012; Louro & Fernandes, 2013; Fernandes *et al.*, 2014).



Com a criação da RMPPPO, em 2009, e melhoramento das condições de fiscalização, a mortalidade de tartarugas por causas antropogénicas reduziu ou foi mesmo nula (Pereira *et al.*, 2014a).

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 ESFORÇO DE AMOSTRAGEM

A amostragem realizou-se durante quatro épocas de nidificação de tartarugas marinhas, 2010/11, 2011/12, 2012/13 e 2013/14, entre Outubro e Março. A monitoria foi realizada na RMPPPO entre a Ponta do Ouro e a Ponta Abril. Dada a vasta extensão de praia da RMPPPO, a área foi subdividida em 4 secções: Ponta do Ouro - Ponta Malongane, Ponta Malongane - Ponta Dobela, Ponta Dobela - Ponta Mucombo e Ponta Mucombo - Ponta Abril (Figura 3.1).



Figura 3.1 Representação das distâncias das secções de praia da Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro onde é feita a monitoria da nidificação das tartarugas cabeçudas.

Cada secção possui um grupo de monitores que realizam diariamente as patrulhas nocturnas para a recolha de dados e marcação das tartarugas marinhas. No entanto, a duração das patrulhas foi variável, dependendo das condições de marés e meteorologia, e do número de emergências de fêmeas. Durante o pico da desova, em Dezembro, as patrulhas realizaram-se entre as 18:00h±1:00h até à 1:00h±1:00h. No total, foram

realizadas 9 viagens para o acompanhamento dos monitores e recolha de amostras de tecido mole para análises de genética.

3.2.2 RECOLHA DE DADOS DURANTE A PATRULHA

A monitoria consistiu na recolha de dados biométricos. Assim, após a tartaruga ter iniciado a postura dos ovos procedeu-se à recolha de dados biométricos, a verificação da presença do marcador de titânio. Os dados biométricos amostrados por rotina são o comprimento e a largura da carapaça. Ao longo do período de monitoria foram aplicados dois métodos de medição, um com fita métrica (comprimento e largura curva da carapaça) e outro com craveira mecânica (comprimento e largura recta da carapaça).

3.2.3 MARCAÇÃO DE TARTARUGAS CABEÇUDAS

A aplicação do marcador de titânio é feita no tecido mole entre a terceira e quarta escama da barbatana frontal das tartarugas cabeçudas. Estes marcadores possuem um número de identificação e o contacto do programa de monitoria (Figura 3.2-a). Deste modo é possível fazer-se a monitoria dos movimentos de longa distância através dos programas de marcação-recaptura, estudos da taxa de crescimento ou do desenvolvimento de doenças.



Figura 3.2 – a) Marcador observado na barbatana de anterior de uma tartaruga cabeçuda; b) Pierre Lombard a fazer a medição da largura recta com a craveira mecânica.

3.2.4 ANÁLISE DOS DADOS DE MONITORIA E ESTIMATIVA DO TAMANHO POPULACIONAL DE FÊMEAS NIDIFICANTES

Os dados recolhidos durante o período de 2010 a 2014, isto é, o número de emergências, ninhos postos, marcação de tartarugas e recapturas foram analisados. Esta informação foi previamente publicada nos relatórios anuais de monitoria de tartarugas marinhas em Moçambique (Videira *et al.*, 2011; Louro *et al.*, 2012; Louro & Fernandes, 2013; Fernandes *et al.*, 2014). Informação adicional sobre a origem e código dos marcadores existentes nas tartarugas (recapturas) foi obtida na base de dados de tartarugas marinhas do Centro Terra Viva.

O método da estimativa do número de fêmeas baseou-se na média harmónica, o mínimo e o máximo das quatro épocas, da contagem de fêmeas feitas através das marcações e recapturas, o número total de ninhos e emergências, tendo em consideração às frequências obtidas para o número de ninhos e emergências por fêmea. Foi relacionada a possível sobrevalorização da estimativa do número de fêmeas com a probabilidade de observação directa das tartarugas. Para a contagem do número de tartarugas observadas considerou-se apenas as entradas de dados que possuíam informação sobre a biometria ou marcação/recaptura pelo total de emergências de tartarugas cabeçudas.

3.2.5 ANÁLISE DOS DADOS DE BIOMETRIA

Os dados de biometria recolhidos durante 2007 a 2014, disponíveis na base de dados do Centro Terra Viva, foram analisados. Para o efeito converteu-se as medições do comprimento curvo da carapaça (CCC) para o comprimento recto da carapaça (CRC), utilizando a seguinte fórmula de Frazer & Ehrhart (1983), que foi determinada com base nos dados recolhidos na Florida:

$$CRC = 0.980 (CCC) - 5.14$$

Frazer & Ehrhart (1983) referem que o modelo pode não ser adequado para outras populações de tartarugas cabeçudas e deve-se ter em atenção aos limites dos tamanhos integrados pelo modelo, não devendo ser aplicado para tartarugas com menos de 50 cm de CCC e menos do que 45 cm de CRC.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 ESFORÇO DE MONITORIA

A época 2010/11 teve um esforço ligeiramente inferior comparativamente às restantes épocas (Tabela 3.1). Observou-se uma correlação positiva não significativa entre o esforço e o número de emergências ($R^2=0.02$), o número de ninhos postos ($R^2=0.35$), o número de marcações ($R^2=0.52$) e o número de recapturas ($R^2= 0.15$).

Tabela 3.1 - Esforço de monitoria e método de patrulha entre as épocas 2011/12 e 2013/14 na Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro por secção de praia.

Secção de praia	Método	Extensão de praia monitorada (km)	Esforço de monitoria por época (número de dias, data de início e fim da monitoria)			
			2010/11 ¹	2011/12 ²	2012/13 ³	2013/14 ⁴
P. Ouro – P. Malongane	a pé	8	151 (31/10/10 – 31/03/11)	183 (01/10/11 - 31/03/12)	182 (01/10/12 - 31/03/13)	182 (01/10/13 – 31/03/14)
P. Malongane – P. Dobela	a pé	32	182 (01/10/10 – 31/03/11)	183 (01/10/11 - 31/03/12)	182 (01/10/12 - 31/03/13)	182 (01/10/13 – 31/03/14)
	de carro	32	44 (24/11/10 – 06/01/11)	50 (02/12/11 - 22/01/12)	50 (01/12/12 - 24/01/13)	55 (01/12/13 – 24/01/14)
P. Dobela – P. Mucombo	a pé	30	182 (01/10/10 – 31/03/11)	183 (01/10/11 - 31/03/12)	182 (01/10/12 - 31/03/13)	182 (01/10/13 – 31/03/14)
P. Mucombo-Santa Maria	a pé	20	153 (30/10/10 – 31/03/11)	183 (01/10/11 - 31/03/12)	182 (01/10/12 - 31/03/13)	182 (01/10/13 – 31/03/14)
Total		90	712	782	778	783

¹(Videira *et al.*, 2011) ²(Louro *et al.*, 2012) ³(Louro & Fernandes, 2013) ⁴(Fernandes *et al.*, 2014)

3.3.2 DADOS DE MONITORIA RECOLHIDOS ENTRE AS ÉPOCAS 2010/11 A 2013/14

Na figura 3.3 apresenta-se o número de marcações, recapturas, ninhos postos e emergências de tartarugas cabeçudas durante as últimas quatro épocas de nidificação na RMPPO. Durante este período registou-se um total de 3098 ninhos, 708 marcações, 392 recapturas e observou-se um total de 6108 emergências.

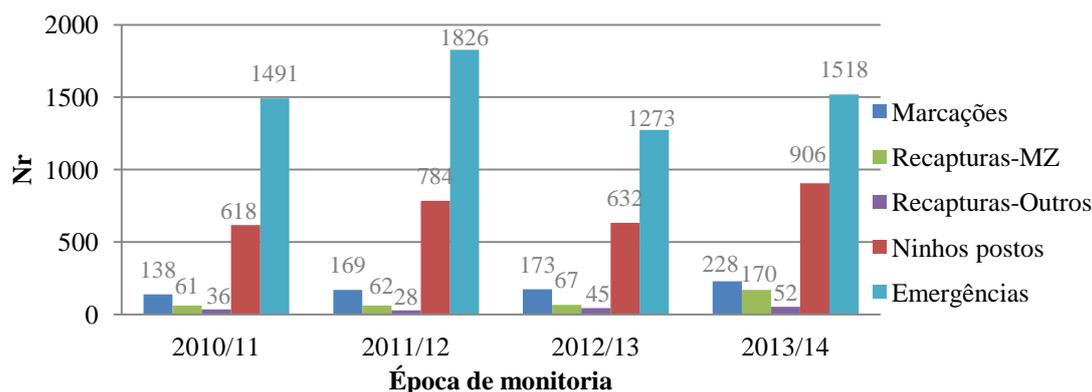


Figura 3.3 - Dados do programa de monitoria e marcação das fêmeas nidificantes de tartaruga cabeçuda na Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro.

Foi registada uma média anual de 1527 (± 228 DP) emergências de tartarugas cabeçudas, variando de 1273 a 1826. A percentagem de emergências sem ninhos confirmados para as quatro épocas variou entre 39.7% (603 em 2013/14) e 54.9% (818 em 2010/11).

Tendo em consideração as quatro épocas obteve-se uma média anual de 735.0 (± 136.5 DP) ninhos postos, variando entre 618 ninhos em 2010/11 a 906 ninhos em 2013/14 (Tabela 3.2). A secção de praia entre a Ponta Malongane e a Ponta Dobela apresentou mais de 50% dos ninhos postos. Considerando a extensão de praia de 32 km, esta secção apresentou uma densidade média de 11.4 ninhos/km.

Tabela 3.2 - Média do número de ninhos postos e estimativa da densidade (ninhos/km) entre as épocas 2010/11 a 2013/14 por secção de praia.

Secção	Média ninhos \pm Desvio Padrão (mín-máx)	Km	Densidade média (ninhos/km)	Densidade mínima (ninhos/km)	Densidade máxima (ninhos/km)
Ponta Mucombo	134.3 \pm 28.0 (115-175)	20	6.7	5.8	8.8
Ponta Dobela-Ponta Mucombo	189.0 \pm 77.0 (105-290)	30	6.3	3.5	9.7
Malongane-Dobela	365.5 \pm 67.1 (294-453)	32	11.4	9.2	14.2
Ponta do Ouro-Malongane	46.3 \pm 16.5 (27-67)	8	5.8	3.4	8.4
RMPPPO (sem a Inhaca)	735.0 \pm 136.5 (618-906)	90	8.2	6.9	10.1

Durante o período deste estudo, 708 tartarugas fêmeas foram marcadas, correspondendo a uma média anual de 177 (\pm 37 DP) novas marcações. Em relação às recapturas, 392 tartarugas cabeçudas foram reportadas como já possuindo pelo menos um marcador, correspondendo a uma média anual de 130 (\pm 62 DP) tartarugas recapturadas. Por época, em média 90 (\pm 53 DP) tartarugas cabeçudas possuíam um marcador Moçambicano (código MZ) e 40 (\pm 10 DP) possuíam marcador Sul-Africano (códigos AA, ZABB, ARR, BB, FF, GG, HH, JJ, KK, LL, MM, NN, PP, RR, SS, ST, TT, XX, ZABB, ZACC, ZAPP, ZARR, ZASS, ZAST, ZATT, ZAUT, ZAVV, ZAXX e ZAYT).

3.3.3 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE EMERGÊNCIAS E NINHOS POR FÊMEA

O número médio de emergências por tartaruga por época, entre 2010 a 2014, variou de uma (71.2%) a quatro (1.0%) vezes (Figura 3.4). O número médio de ninhos por tartaruga foi de 1.3 (\pm 0.6 DP) ninhos e variou entre 1 e 3 (Figura 3.5). No entanto, ao analisar os dados de monitoria da RMPPPO recolhidos entre 1997 a 2014, observou-se que mais de metade das emergências não apresenta informação sobre a tartaruga, nomeadamente de biometria e/ou de marcação e recaptura (Tabela 3.3).



Figura 3.4 - Percentagem do número de emergências por tartaruga cabeçuda entre as épocas 2010/11 a 2013/14 na RMPPPO.

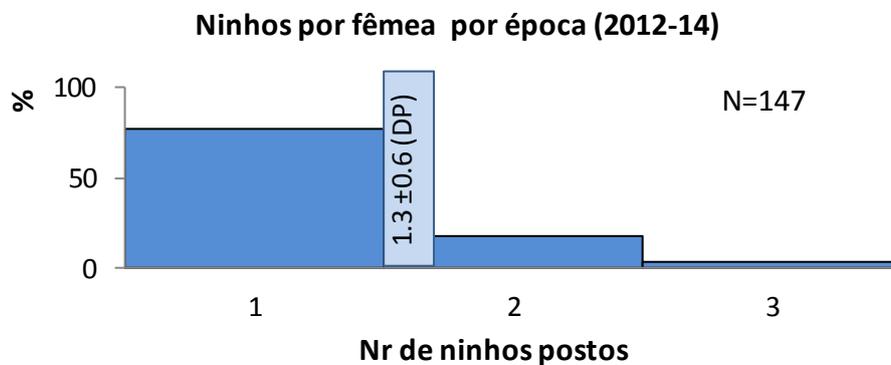


Figura 3.5 - Percentagem de número de ninhos por tartaruga entre as épocas de 2012/13 a 2013/14

Tabela 3.3 - Percentagem da observação directa de fêmeas de tartarugas cabeçudas considerando todos os dados de 1997 a 2014 disponíveis na base de dados.

	Total de emergências	Total de observações directas	Observação directa (%)
Ponta do Ouro - Ponta Malongane	225	15	7
Pta Malongane - Pta Dobela	7190	2271	32
Ponta Dobela- Ponta Mucombo	442	ND	ND
Ponta Mucombo - Santa Maria	639	15	2
Total Geral	8496	2301	27

ND - informação não disponível. Os dados inseridos na base de dados não apresentam informação completa.

O intervalo de remigração de 176 tartarugas cabeçudas, com histórico de marcação e recaptura entre 2003 a 2014, variou de 1 a 11 anos, sendo a média de 3.3 anos (± 1.8 DP) e a moda foi de dois anos de intervalo (Figura 3.6). Entre 1997/98 a 2013/14 a tartaruga cabeçuda FF551 foi observada 19 vezes (duas em 2002/03, quatro em 2003/04, sete em 2007/08, três em 2008/09 e três em 2010/11).

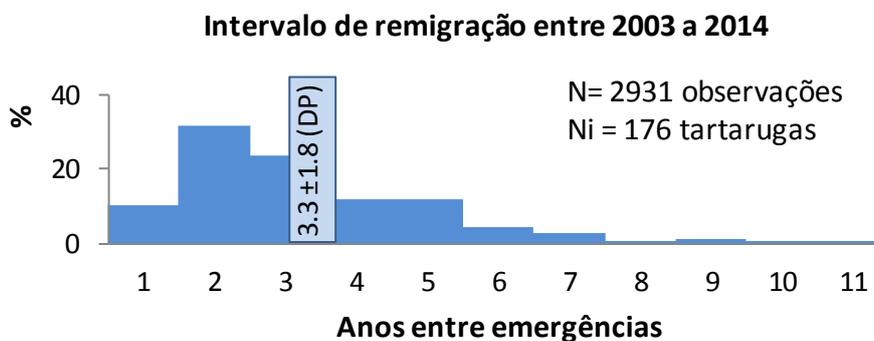


Figura 3.6 - Percentagem do intervalo de tempo entre emergências por tartaruga cabeçuda entre as épocas 2010/11 a 2013/14 na RMPPO.

3.3.4 TAMANHO POPULACIONAL DAS FÊMEAS NIDIFICANTES COM BASE NOS CENSOS DE MONITORIA

O tamanho populacional (N) das fêmeas nidificantes de tartarugas cabeçudas por época, com base na média harmónica das tartarugas marcadas e recapturadas, mas sem repetir a mesma tartaruga, foi de 290 (variação entre 235 e 450).

Considerando a média de 735.0 ninhos (± 136.5 DP) e a variação 618 a 906 ninhos por época e que uma tartaruga pode nidificar entre uma a três vezes (Figura 3.5), obteve-se um N de 735, 368 e 245, respectivamente. Utilizando as frequências do número de ninhos por tartaruga cabeçuda obtemos um N de 648 tartarugas cabeçudas (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Estimativa do número de fêmeas nidificantes com base no número de ninhos. A média ponderada teve em consideração as frequências relativas de 0.776, 0.184 e 0.041 para um, dois e três ninhos por fêmea, respectivamente.

Nr ninhos por tartaruga	Número de fêmeas nidificantes				
	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	Média das épocas
1	618	784	632	906	735
2	309	392	316	453	368
3	206	261	211	302	245
Média ponderada	541	686	553	793	648

Considerando a média de emergências por época (1527 ± 228 DP) e que uma tartaruga pode emergir entre uma a quatro vezes (Figura 3.4), obteve-se um N de 1527, 764, 509 e 382, respectivamente. Utilizando as frequências do número de emergências por tartaruga cabeçuda obtemos um N de 1286 (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Estimativa do número de fêmeas nidificantes com base no número de emergências. A média ponderada teve em consideração as frequências relativas de 0.712, 0.212, 0.065 e 0.011 para uma, duas, três e quatro emergências por fêmea, respectivamente.

Nr emergências por tartaruga	Número de emergências de fêmeas nidificantes				
	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	Média das épocas
1	1491	1826	1273	1518	1527
2	746	913	637	759	764
3	497	609	424	506	509
4	373	457	318	380	382
Média ponderada	1256	1538	1072	1279	1286

3.3.5 BIOMETRIA

Com base nos 86 dados de biometria recolhidos entre 2007 a 2014 na RMPPPO, excluindo a secção de Malongane a Dobela e a Ilha da Inhaca, o comprimento curvo da carapaça (CCC) das tartarugas cabeçudas variou de 75.0 a 104 cm (média de 90.3 ± 6.97 cm) e a largura curva da carapaça (LCC) variou de 60.0 a 90.0 cm (média de 80.0 ± 8.6 cm). A média anual do comprimento curvo da carapaça variou entre 90.3 ± 12.1 cm (em 2008/09) a 90.3 ± 4.2 cm (em 2013/14) e a largura curva da carapaça variou de 71.3 ± 10.8 cm (em 2008/09) a 84.0 ± 3.4 cm (em 2013/14). Convertendo o CCC para o comprimento recto da carapaça (CRC) obteve-se uma média de 79.5 ± 5.0 cm (variou de 57.1 a 96.8).



Com base nos 1927 dados de biometria recolhidos entre 1995 a 2014, entre Malongane a Dobela (PMA), o comprimento recto variou de 72.0 a 147.5 (média 84.2±4.1cm) e a largura recta variou de 56.0 a 87.3 cm (média 66.6 ±3.2cm). A média anual do comprimento recto da carapaça variou entre 83.2 ±3.4 cm (em 2011/12) a 86.0 ±4.5 cm (em 1999/2000) e a largura recta da carapaça variou de 65.81 ±2.8 cm (em 2011/12) a 67.3 ±2.6 cm (em 2006/07).

As tartarugas cabeçudas da RMPPPO apresentaram um CRC (média de 82.9 ±4.9 DP com variação de 57.1 a 147.5 cm) semelhante ao reportado pelo programa de monitoria da África do Sul e do Sudeste dos Estados Unidos (Tabela 3.6)

Tabela 3.6 – Média, mínimo e máximo do comprimento recto da carapaça (CRC) das tartarugas cabeçudas de populações de diferentes regiões (n-numero de tartarugas cabeçudas observadas)

Local	CRC (cm)	Características das fêmeas	Referências
RMPPPO n=2 013	82.9 ±4.9 57.1 a 147.5	Tartarugas marcadas e recapturadas	Presente estudo
África do Sul	83.7 ±4.2 72.0 a 99.2	Tartarugas observadas pela primeira vez (isto é, sem marcador)	Tucek et al., 2014
África do Sul n=13 109	86.0 ±47.5 cm	Tartarugas marcadas e recapturadas	Nel et al., 2013
Mediterrâneo	≈60.0 a 77.9 (CCC=66.5 a 84.7)		Margaritoulis et al. 2003
EUA-SE	≈80 (CCC=87)		Bjorndal et al. 2001

*CRC – Comprimento recto da carapaça; CCC – comprimento curvo da carapaça

Na figura 3.8 apresenta-se a correlação positiva mas com valor de R^2 baixo ($R^2=0.45$) entre a largura e o comprimento da carapaça para a secção de praia entre a Ponta Malongane e a Ponta Dobela.

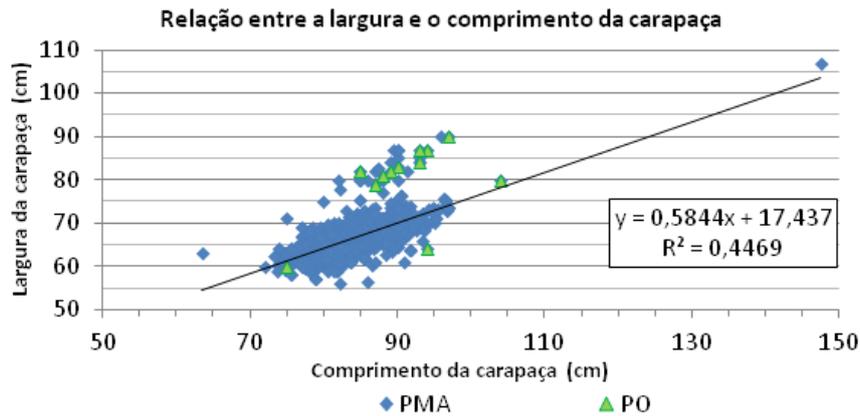


Figura 3.7 - Correlação entre o comprimento e a largura da carapaça de tartarugas cabeçudas entre as épocas 1997/98 a 2013/14 na RMPPPO. Na secção entre Malongane a Dobela (PMA) as medidas foram mensuradas com uma craveira mecânica e no resto da RMPPPO (RMPPPO, sem PMA) foram recolhidas com fita métrica.

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 INFERÊNCIAS SOBRE A POPULAÇÃO NIDIFICANTE DE TARTARUGAS CABEÇUDAS COM BASE NOS DADOS DE MONITORIA

A partilha de fêmeas nidificantes entre a África do Sul e Moçambique foi evidenciada através do programa de marcação e recaptura de tartarugas realizado em ambos países. Na RMPPPO, observou-se uma média de 40 tartarugas cabeçudas com marcador Sul-Africano por época de nidificação. Na África do Sul têm sido reportadas aproximadamente 20 tartarugas com marcador Moçambicano, por época de nidificação (Nel, 2010).

A maior agregação de fêmeas nidificantes do Índico Sul ocorre em Kwazulu-Natal, com cerca de 1300 a 2500 ninhos por época, numa extensão de 56 km (Nel *et al.*, 2013). Na RMPPPO entre as épocas 2010/11 a 2013/14 foram reportados entre 618 a 906 ninhos (média de 735.0 ninhos \pm 136.5). Considerando o número de ninhos por tartaruga por época (entre um a três) estimou-se uma população nidificante por época de cerca de 245 a 648. Estes valores são coerentes com a análise da marcação e recaptura de tartarugas cabeçudas nas últimas quatro épocas que permitiram estimar cerca de 290 tartarugas na RMPPPO.

Nel e colaboradores (2010) reportaram que aproximadamente 79% dos ninhos de tartarugas cabeçudas foram colocados na África do Sul e 21% no Sul de Moçambique, durante a época de nidificação de 2009/10. No sul de Moçambique, para além da região entre a Ponta do Ouro à Ponta Mucombo, a nidificação de tartarugas cabeçudas ocorre, embora em menor número, na Ilha da Inhaca, Macaneta, Manhiça, Bilene e em algumas praias de Xai-Xai e Inhambane onde o esforço de monitoria é irregular. Rakotonirina (2001) reportou a ocorrência de nidificação de tartarugas cabeçudas em Madagáscar, com aproximadamente 100 ninhos por época. No entanto, não existe informação disponível, baseada na marcação/recaptura e genética, sobre partilha de tartarugas fêmeas entre o sul de Moçambique e Madagáscar.

Na RMPPO, excluindo a Ilha da Inhaca, entre 2010 a 2014 registou-se uma média de 1527 emergências (± 228 DP) e de 735 ninhos (± 136 DP) por época. Pereira e colaboradores (2014) analisaram os dados recolhidos ao longo de vinte anos de monitoria durante a época de nidificação entre a Ponta Malongane e a Ponta Dobela, e reportaram uma média de 82 ninhos (± 52 DP) entre 1996/97 e 2006/7, 203 ninhos (± 109 DP) entre 2007/8 e 2009/10 e 366 ninhos $\pm (67$ DP) entre 2010/11 a 2013/14.

Nel e colaboradores (2013), com base nos dados recolhidos entre Bhangá Nek e o estuário de Kosi, região com maior intensidade de nidificação da África do Sul, entre 1963 a 2013, reportaram um aumento do número de ninhos de tartarugas cabeçudas, especialmente na última década, passando de 250 para 1700 ninhos. Este aumento populacional foi relacionado com a redução da pressão antropogénica (mortalidade de fêmeas e de recolha de ovos) na África do Sul (Nel *et al.*, 2013). A monitoria e protecção de fêmeas e ninhos durante 50 anos permitiram maior recrutamento e aumentou a probabilidade de novas gerações alcançarem a idade reprodutiva (média de 36.2 anos ± 7.71 DP) e regressarem à região para nidificar (Tucek *et al.*, 2014). Assim, o aumento do número de ninhos na RMPPO em parte pode ser explicado pelo aumento do esforço de monitoria mas também pela influência positiva do programa de conservação de tartarugas marinhas na África do Sul.

O programa de monitoria no sul de Moçambique produziu uma série de dados ainda muito curta para que se possa inferir até que ponto está a contribuir para a conservação das tartarugas cabeçudas na região. Este facto reforça a importância de se manter o

programa de monitoria na RMPPO de modo a obter uma série de dados mais longa que permita observar o seu sucesso para o aumento populacional de fêmeas, o grau de precisão da fidelidade das fêmeas às praias de nidificação, entre outros aspectos biológicos cruciais para a sua conservação.

3.4.2 RELAÇÃO ENTRE AS EMERGÊNCIAS, NINHOS E MARCAÇÃO

A percentagem de emergências sem ninhos confirmados para as quatro épocas de monitoria na RMPPO, variou entre 39.7% (603 em 2013/14) e 54.9% (818 em 2010/11). Nel *et al.* (2013) reportaram que as tartarugas cabeçudas não nidificaram em 45% das emergências realizadas em Kwazulu-Natal, entre Bhanga Nek e o estuário de Kosi, desde 1963. No entanto, em algumas regiões a percentagem de emergências de tartarugas cabeçudas sem postura de ninhos foi consideravelmente superior, como por exemplo para a Baía de Lagana (Grécia) que teve 74% de emergências sem ninhos entre 1984 e 2002 (Margaritoulis, 2005).

As tartarugas marinhas podem abortar a postura por diversos motivos imprevisíveis, mas existe uma relação com as características ambientais, como por exemplo a humidade da área, presença de vegetação próxima da linha de maré alta, extensão da praia, erosão e formação elevações de areia, entre outras características, e com a degradação do ambiente por causas antropogénicos, sendo de destacar a iluminação e outros distúrbios (Dodd, 1988; Katselidis & Dimopoulos, 2000). No entanto, estes estudos ressaltam que as actividades de monitoria e de ecoturismo não são prejudiciais para a nidificação se seguirem as regras de manejo de tartarugas marinhas.

Considerando as últimas 4 épocas de monitoria na RMPPO, a densidade média de ninhos variou de 6.9 a 10.1 ninhos/km. Ronel e colaboradores (2013) quantificaram um aumento de 250 para 1700 ninhos em 12.8 km de praia, entre Bhanga Nek e o estuário de Kosi na África do Sul, correspondendo a um aumento de densidade de 19 para 132 ninhos/km.

Ao longo das quatro épocas de monitoria foram marcadas 723 tartarugas cabeçudas na RMPPO (excluindo Inhaca), sendo que 77.7% das marcações foram feitas na secção entre Ponta Malongane a Ponta Dabela.

A média de 1.4 emergências (± 0.7 DP) com variação de 1 a 4 emergências e a média de 1.3 ninhos (± 0.6 DP) com variação de 1 a 3 ninhos por tartaruga cabeçuda na RMPPO foi consideravelmente mais baixa do que a média de ninhos por tartaruga (3.7 ninhos) reportada por Nel e colaboradores (2013) para a área de Kwazulu-Natal, bem como a estimativa global de 3 a 5 ninhos por tartaruga (Miller, 1997; Shanker *et al.*, 2003). Isto provavelmente resultou da baixa probabilidade de observação directa de tartarugas cabeçudas (inferior a 50%). Assim, sugere-se que o esforço de monitoria da marcação e recaptura na RMPPO deve ser aumentado para melhorar a representatividade destas médias, e melhorar as inferências do tamanho da população nidificante de tartarugas cabeçudas por época.

Os intervalos de remigração das fêmeas entre épocas de nidificação variaram de 1 a 11 anos, com a maioria das fêmeas a terem um intervalo de 2 a 3 anos. Limpus (1985) e Dodd (1988) reportaram uma variação de 1 a 9 anos, destacando que a maioria das fêmeas remigrou com intervalos entre 1 a 4 anos. Os intervalos de nidificação mais longos podem estar associados ao esforço de monitoria e a extensão de área coberta pelo estudo. Limpus (1985) também sugeriu a possibilidade de existirem períodos mais longos de quiescência reprodutiva.

No entanto, é importante salientar-se que as análises feitas com base na marcação e recaptura de tartarugas devem ter em consideração a probabilidade de recapturar uma determinada tartaruga tendo em consideração o total de fêmeas nidificantes. Assim, a análise deve ser feita com base numa série de dados longa e informação complementar referente a perda de marcadores (estimado através do número de tartarugas cabeçudas que apresentam cicatrizes na região onde o marcador foi aplicado) e a recaptura de tartarugas mortas (por causas naturais ou antropogénicas). Estes dados podem ser analisados através do programa MARK (White & Burnham, 1999), um programa complexo que implementa vários modelos de marcação/recaptura que permite inferir o tamanho populacional com base na probabilidade de recaptura.

3.4.3 BIOMETRIA

O comprimento recto da carapaça das tartarugas cabeçudas que nidificam na RMPPO variou entre 57.1 a 147.5 cm (média 82.9 cm \pm 4.9 DP), sendo, tal como seria de se esperar semelhante ao reportado por Tucek e colaboradores (2014) para a África do Sul (média 83.7 cm \pm 4.2 DP). Tucek *et al.* (2014) reportaram que as tartarugas cabeçudas reprodutoras fêmeas da África do Sul apresentam tamanhos semelhantes às do Sudeste dos Estados Unidos, que são maiores que as do Mediterrâneo, e menores que as da Austrália.

O tamanho da carapaça não é um indicador directo da idade da tartaruga, mas existe um tamanho mínimo associado à maturação e início da reprodução das fêmeas (Hughes, 1974). A variação do tamanho mínimo entre as populações de tartarugas cabeçudas pode estar associado a factores intrínsecos, como o genótipo das tartarugas e a factores extrínsecos, como a produtividade das áreas de alimentação, a altura da mudança da zona oceânica para a zona costeira pelos juvenis, e a metodologia aplicada (Tiwari & Bjorndal, 2000; Hatase *et al.*, 2002; Roark *et al.*, 2009; Casale *et al.*, 2011). De acordo com Tucek e colaboradores (2014), a variabilidade de tamanhos das tartarugas cabeçudas que nidificam no sudeste de África pode ser explicada pela diferença da produtividade primária entre os ambientes formados pelas características oceânicas da região, por um lado as águas mais quentes do Oceano Índico e por outro lado a influência das Águas do Oceano Atlântico mais a Sul, com maior influência nos juvenis que dispersam usando correntes oceânicas.

Através da análise da recaptura de crias marcadas desde 1972, Tucek e colaboradores (2014), estimam que a idade média da primeira nidificação é de 36.2 anos (\pm 7.7 DP) para um intervalo de confiança a 95% entre 28.2 a 44.3 anos, validando a observação feita por Nel e colaboradores (2013) em relação ao aumento acentuado da população de fêmeas e consequentemente de ninhos na África do Sul na última década.

CAPÍTULO 4. ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DE TARTARUGA CABEÇUDA NA RESERVA MARINHA PARCIAL DA PONTA DO OURO

4.1 INTRODUÇÃO

4.1.1 APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

O conhecimento da estrutura populacional de uma espécie é fundamental para conhecer a distribuição dos indivíduos e a conectividade entre populações. Estas informações servem de base para a criação de planos de manejo e conservação.

A análise da variabilidade genética das populações e das espécies é importante para inferir a sua história, organização e ecologia. Vários tipos de marcadores podem ser usados para estudar a variação genética directamente ao nível do ADN. Alguns são gerados pela amplificação aleatória de ADN polimórfico (*Random Amplification of Polymorphic DNA* - RAPD), outros resultam da digestão de ADN amplificado por enzimas de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphisms* - RFLP), outros resultam da amplificação de microssatélites ou ainda da sequenciação de porções de ADN, seja nuclear ou mitocondrial. Estes marcadores permitem estudar a estrutura social e demográfica das populações, sistemas de acasalamento, análise de paternidade e relações de parentesco, sucesso reprodutivo, endocruzamento, hibridização, comportamento migratório, viabilidade populacional e eventualmente até susceptibilidade a alterações ambientais (Conceição *et al.*, 1990; Schroth *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2006).

4.1.2 GENÉTICA POPULACIONAL

A genética populacional lida com o estudo da variabilidade genética das populações, descrevendo a forma como as frequências dos diferentes alelos presentes numa população se alteram ao longo das gerações. A base da teoria da genética populacional surgiu no início do século XX, após a redescoberta das leis de herança mendeliana, graças ao trabalho de três matemáticos: Fisher (1930), Wright (1931) e Haldane (1932). Foi o trabalho desenvolvido por estes três cientistas que permitiu compatibilizar a

genética mendeliana com a teoria da evolução proposta por Darwin. Restava solucionar o problema da continuidade dos caracteres nas populações ao longo das gerações, que foi conseguido pela formulação de um modelo de equilíbrio matemático das frequências dos alelos numa população ao longo do tempo, o princípio de Hardy-Weinberg.

O modelo de Hardy-Weinberg foi demonstrado independentemente por Godfrey Harold Hardy na Inglaterra e por Wilhelm Weinberg, na Alemanha, em 1908. Os pressupostos originais para o equilíbrio Hardy-Weinberg eram que a população: 1) é infinita (ou efectivamente grande, no sentido de eliminar-se a deriva genética); 2) possui um regime de reprodução sexuada; 3) os indivíduos acasalam-se aleatoriamente, isto é sem selecção sexual ou desvio de aleatoriedade por dispersão geográfica (panmixia); 4) é diplóide; 5) possui igual número de fêmeas e machos, e a frequência dos alelos é equivalente nos dois sexos; 6) todos os casais são férteis e têm o mesmo número de prole; e 7) não sofre selecção natural, mutações e migração (ou seja, sem fluxo génico; Hardy, 1908; Weinberg, 1908). Este modelo prevê que as frequências alélicas de uma população mendeliana permanecerão constantes ao longo das gerações, independentemente da variante do gene ser raro ou frequente. É a acção de forças, como por exemplo a deriva genética (devido ao tamanho finito das populações) ou a selecção natural, a existência de mutação ou a migração (ou seja, a ocorrência de fluxo génico) que provoca a alteração das frequências alélicas ao longo das gerações, ou seja, a evolução.

De acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, se os indivíduos de uma população se reproduzem ao acaso, isto é, se a população é panmítica, as frequências genotípicas podem ser deduzidas a partir das frequências alélicas. Para o caso mais simples de um único *locus* com dois alelos A e a com frequências alélicas p e q, respectivamente, o modelo de Hardy-Weinberg prediz que a frequência genotípica para os homocigóticos AA e aa será p^2 e q^2 , respectivamente, e para o heterocigótico Aa será $2pq$.

A estruturação genética de uma espécie é gerada quando os indivíduos não acasalam aleatoriamente devido a barreiras ao fluxo génico entre as populações. Nesta situação, as frequências genotípicas observadas na espécie como um todo diferem das frequências esperadas de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Ecologicamente, os desvios à panmixia podem ainda estar relacionados com o sistema de acoplamento, ou com a estrutura social. Estes processos levam a que o tamanho efectivo da população (N_e ; que

pode ser interpretado como a fracção da população que gera descendência) decresça em relação ao número de indivíduos realmente presentes na espécie (Allendorf, 2008). A estruturação populacional e o reduzido fluxo génico levam à divergência entre a composição genética das populações dado que as forças evolutivas passam a actuar de forma mais independente em cada subpopulação.

4.1.3 CARACTERÍSTICAS DO ADN MITOCONDRIAL E DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA

O ADN mitocondrial (ADNmt) é uma molécula de material genético circular, de cadeia dupla, localizado nas mitocôndrias. O genoma mitocondrial das tartarugas cabeçudas tem 16440 pares de bases (pb), contendo 37 genes (13 genes codificadores de proteínas, 22 genes de ARN transportador e dois genes de ARN ribossómico) e uma região de controlo (Drosopoulou *et al.*, 2012).

A região controlo (da qual faz parte o *d-loop*) é uma região não-codificante com cerca de 1122 pb e está localizada entre os genes que codificam o ADN para a transferência dos aminoácidos prolina e fenilalanina (Monzón-Argüello, 2010). Esta região é responsável pelo início da replicação e transcrição do ADNmt (Taberlet *et al.*, 1996).

Brown e colaboradores (1979) referem que as mitocôndrias têm funções celulares extremamente importantes para o funcionamento de um organismo e, por isso, seria de esperar que a evolução mitocondrial nos vertebrados fosse altamente restrita. Apesar de durante muitos anos esta ideia ter sido contrariada, considerando-se que a evolução do ADNmt seria neutral, têm-se acumulado trabalhos que mostram que de facto a sua evolução é por vezes afectada por selecção natural (p.ex. Melo-Ferreira *et al.*, 2014).

A taxa de mutação do ADNmt nas tartarugas marinhas é consideravelmente inferior em comparação com a maioria dos outros vertebrados (Avisé *et al.*, 1992; Avisé, 2007). Mesmo assim, este material genético apresenta um nível de variabilidade adequado para a realização de estudos populacionais, mas fraca resolução para analisar subpopulações (Avisé *et al.*, 1992).

Os primeiros estudos do genoma mitocondrial das tartarugas marinhas usaram enzimas de restrição para identificar mutações e assim definir haplótipos (ou seja, combinações de mutações na sequências de bases nucleotídicas). Esta técnica de RFLP permitiu identificar oito haplótipos (A a H) em tartarugas cabeçudas (e.g. Bowen *et al.*, 1992; 1993).

Com o avanço tecnológico, foram desenvolvidos *primers* para a região de controlo ou *d-loop*, o TCR5 e TCR6 (Norman *et al.*, 1994; Encalada *et al.*, 1996; Bowen *et al.*, 1998; Encalada *et al.*, 1998; Laurent *et al.*, 1998; Bowen *et al.*, 2005), e mais tarde os LCM15382/H950 (Abreu-Grobois *et al.*, 2006). Os *primers* TCR5 e TCR6 permitiram a amplificação de 380 pb daquela região do ADN mitocondrial e a identificação de 64 haplótipos diferentes do Mediterrâneo e Atlântico (ACCSTR, 2014a). Os *primers* LCM15382/H950 (Abreu-Grobois *et al.*, 2006) permitiram sequenciar aproximadamente 800 pb, subdividindo os haplótipos em 78 haplótipos, excluindo os haplótipos que foram removidos por possuírem erros de sequenciação ou de nomenclatura (ACCSTR, 2014b).

4.1.4 UNIDADES DE GESTÃO (UG) COM BASE NO ADN MITOCONDRIAL DAS TARTARUGAS CABEÇUDAS

As unidades de gestão (UG) de tartarugas marinhas são definidas com base nas praias de nidificação que apresentam diferenças significativas nas frequências dos haplótipos de ADNmt (Moritz, 1994), ou seja, de matrizes de população geneticamente distintas. A estrutura filogeográfica profunda tem relevância para os esforços de conservação e de gestão pois cada conjunto de populações assim definidas possui uma fracção significativa e original da variação genética total de uma espécie ou legado hereditário. Portanto, estas unidades estão representadas pelo isolamento demográfico das fêmeas, pois o ADNmt é de transmissão materna, resultante da filopatria à região de nidificação (Bowen *et al.*, 1992; Allard *et al.*, 1994; Bowen & Karl, 1996; FitzSimmons *et al.*, 1997; Bowen *et al.*, 2004; Lee, 2008; Garofalo *et al.*, 2009). Assim, este comportamento de *natal homing* define os limites da população reprodutiva (Bowen *et al.*, 2005).

A caracterização destas populações nidificantes é essencial para definir a escala em que as áreas de nidificação devem ser geridas como populações demograficamente auto-suficientes em relação ao recrutamento de fêmeas reprodutoras (Shamblin *et al.*, 2014). Portanto, quando não ocorrem trocas significativas de fêmeas entre áreas de nidificação, a descendência também manterá o mesmo fundo genético de haplótipos mitocondriais.

Assim, se uma colónia de fêmeas de uma determinada região sofrer uma grande redução numérica, por causas antropogénicas ou naturais, é improvável que seja restabelecida, pelo menos a curto prazo, por fêmeas de outras regiões, independentemente da população masculina permanecer intacta ou haver conectividade entre populações através do fluxo genético mediado pelos machos. Esta evidência reforça que cada colónia de nidificação é demograficamente autónoma na produção de descendência desde que as fêmeas permaneçam filopátricas (Awise, 2007).

4.1.5 EXPANSÃO DAS TARTARUGAS CABEÇUDAS ESTIMADA ATRAVÉS DAS LINHAGENS MATERNAS (ADN MITOCONDRIAL)

As análises do ADN mitocondrial de tartaruga cabeçuda permitiram identificar duas linhagens bastante divergentes, designadas de haplogrupo I (HGI) e haplogrupo II (HGII; Bowen *et al.*, 1994). Com base no tempo de coalescência de linhagens mitocondriais obtido através da sequenciação do genoma mitocondrial estima-se que o ponto de bifurcação primária, isto é, entre HGI e HGII, foi há aproximadamente 4.1 milhões de anos (Ma; Duchene, 2012). Esta bifurcação é consistente com a hipótese da ascensão do Istmo do Panamá, que começou a 15Ma (Mioceno) e aproximadamente a 2.8Ma (Plioceno) criou uma barreira total para a migração de espécies marinhas entre o Oceano Atlântico e o Pacífico (Lessios, 2008).

A grande divergência entre os haplogrupos I e II é seguida por uma divisão mais recente das linhagens do haplogrupo I em dois subgrupos, o haplogrupo Ia (HGIIa) e o haplogrupo Ib (HGIIb). Esta divisão é congruente com uma filogenia mitogenómica que incluiu três haplótipos globais: *CC-A1*, *CC-A2* e *CCPI* (Duchene, 2012). Os haplótipos do HGIIa terão divergido dos restantes haplótipos do HGIIb há aproximadamente 2.7Ma (Duchene, 2012).

HAPLOGRUPO I (HGI)

O HGI foi representado pelo *RFLP B* (corresponde ao *CC-A1*), o haplótipo *C* (corresponde ao *CC-A4*) e o *RFLP F* (corresponde ao *CC-A11*), presentes em amostras de tartarugas fêmeas nidificantes no sudeste dos EUA, Brasil e Omã, respectivamente (Bowen *et al.*, 1994; Shamblin *et al.*, 2014). Com a análise das sequências da região controle de 380pb, as linhagens ocidentais do Oceano Pacífico (Japão) e da Austrália, anteriormente designadas por *RFLP H* (sequências *CCP1* e *CCP5*) e *RFLP G* (corresponde ao *CCP2* e *CCP3*), foram agrupadas de forma mais estreita com o clado contendo *CC-A1*, em vez de *CC-A2*, sendo transferidas para o HGI (Bowen, 2003).

Os haplótipos CCP do HGIa, o *CCP1* idêntico à sequência *CC-A34* (sequência de referência ACCSTR e GenBank EF033112, respectivamente), *CCP2* e *CCP5* idêntico à sequência *CC-A33* (sequência de referência ACCSTR e GenBank EF0033113.1, respectivamente) aparentam ser as linhagens mais antigas. Os haplótipos *CC-A34* e *CC-A33* foram reportados apenas para as populações que nidificam no Oeste da Austrália, Queensland e Nova Caledônia (Fitzsimmons *et al.*, 1996; Boyle *et al.*, 2009).

Em oposição, a estruturação das linhagens HGIb pode ser definida por radiações de um pequeno número de haplótipos basais (*CC-A4.2*, *CC-A4.1*, *CC-A4.3* e *CC-A24.1*), o que implica a diversificação *in situ* e intensificação da colonização por etapas em cada uma das três unidades de gestão regionais (RMU) do Atlântico que possuem haplótipos neste clado.

A população nidificante do Brasil apresenta estes haplótipos basais do HGIb, o que sugere ser de linhagens mais antigas do que a população nidificante do Sudoeste dos EUA (Shamblin *et al.*, 2014). A população nidificante de Cabo Verde apresenta uma dominância do haplótipo *CCA1.3*. Este haplótipo constitui o centro de uma radiação em estrela de haplótipos, o que sugere que Cabo Verde pode sediar a segunda colônia de tartarugas cabeçadas mais antiga do Atlântico (Monzón-Argüello, 2010). O haplótipo mais comum nos Estados Unidos é o *CC-A1.1*, que possui uma posição derivada em relação ao *CC-A1.3* e *CC-A1.4*, o que implica que os Estados Unidos hospedam o haplótipo mais jovem do HGIb no Atlântico, apesar desta agregação de nidificação ser a maior da bacia do Atlântico (Shamblin *et al.*, 2012).

No clado HG1b encontram-se as variantes do *CC-A11*, que são raras nas áreas de nidificação do Atlântico Norte, e foram bem diferenciados da variante do Oceano Índico, mais concretamente em Omã (Shamblin *et al.*, 2014).

HAPLOGRUPO II (HGII)

O HGII foi representado pelo *RFLP D* (corresponde ao *CC-A2*) presente nas populações nidificantes do sudeste dos EUA, África do Sul e Grécia (Bowen *et al.*, 1994; Shamblin *et al.*, 2014).

O HGII possui uma frequência alta do haplótipo *CC-A2.1* em três unidades de gestão regional: o oeste do Oceano Atlântico (ex: sudeste dos EUA, Cabo Verde e México), o Mar Mediterrâneo (ex. Grécia) e o sudoeste do Oceano Índico (ex. África do Sul). Este facto sugere uma colonização relativamente rápida ou expansão demográfica rápida de colónias recém-fundadas nessas regiões (Shamblin *et al.*, 2014).

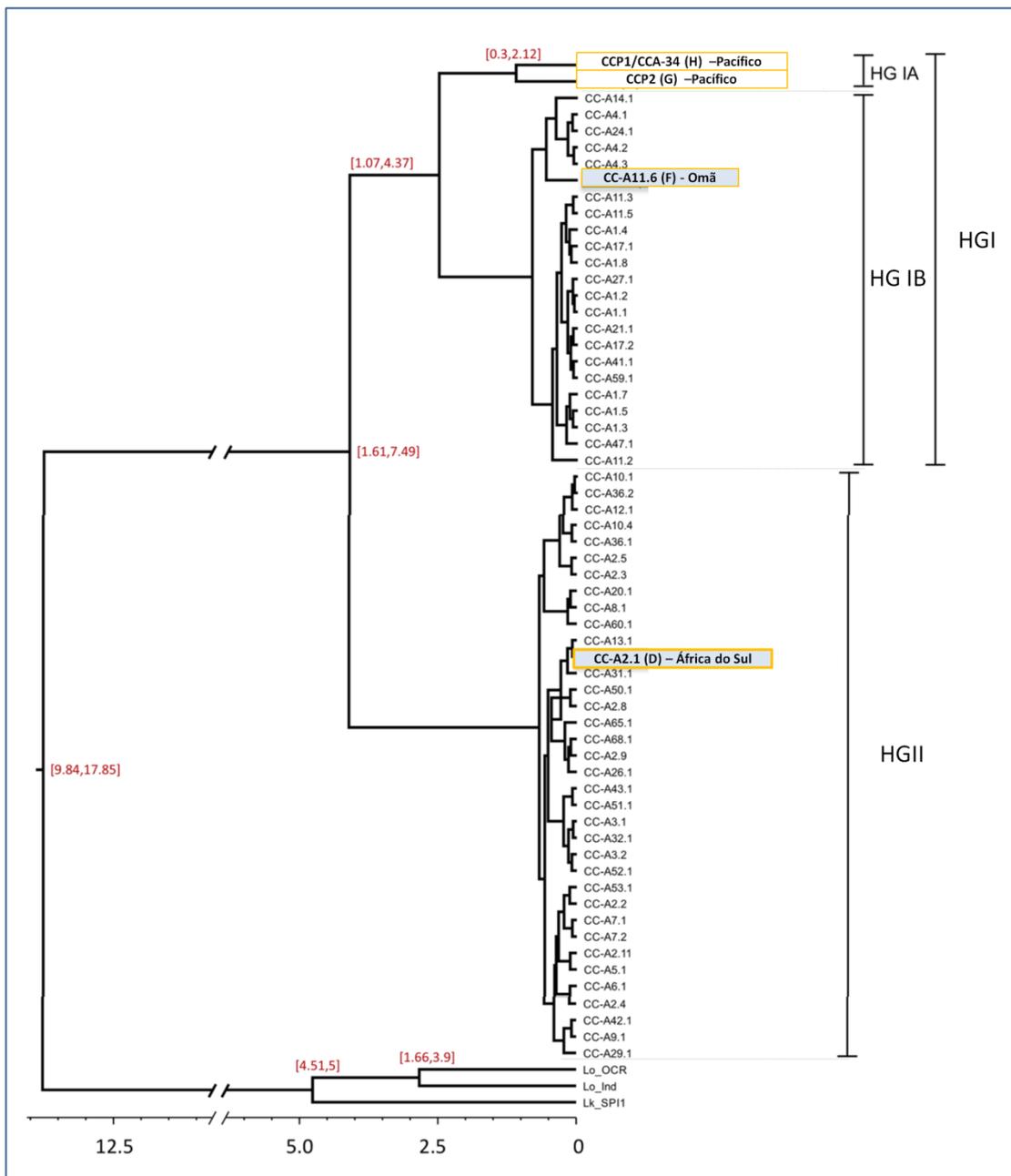


Figura 4.1 - Cronograma para os haplótipos com 800pb da região controlo de tartarugas cabeçadas obtido com base no modelo Bayesian *relaxed-clock* do programa BEAST. O eixo x indica o tempo de divergência em milhões de anos. Os haplótipos observados nas praias de nidificação na região do Oeste do Oceano Índico encontram-se destacados a azul. Os haplótipos observados no Oceano Índico encontram-se destacados a laranja. Imagem adaptada de Shamblin *et al.* (2014).

Vários estudos reforçam que a conectividade entre as populações baseada no ADNmt deve ser analisada num contexto evolutivo e que só através do conhecimento da variabilidade genética nas praias de nidificação ainda não estudadas é que se pode compreender a expansão e conectividade de larga escala entre as populações (Roberts *et al.*, 2004; Bowen & Karl, 2007; Hamann, 2010). A colonização de novas praias de nidificação, com efeito de longo alcance na estrutura populacional, são eventos raros e associados à dispersão causada por correntes, destacando a potencial importância da dispersão de juvenis durante a fase oceânica para o assentamento em novas áreas (Hays, 2010).

EXPANSÃO DO SUDOESTE DO OCEANO ÍNDICO PARA O OCEANO ATLÂNTICO

A invasão do Atlântico por linhagens Indo-Pacífico, por via da África Austral, foi estabelecida para muitos organismos marinhos, incluindo tartarugas cabeçudas (Floeter *et al.*, 2008). Bowen e colaboradores (1994) propuseram um cenário de colonização do Atlântico pela linhagem do haplótipo RFLP D (sequência CC-A2.1) oriundo do Índico com base na migração de juvenis oceânicos da África do Sul para o Atlântico Sul. Os padrões de dispersão de juvenis provenientes da África do Sul para o Atlântico Sul foram determinados através da recuperação de juvenis com marcas cravadas na carapaça no Atlântico (Baldwin *et al.*, 2003) e na deriva passiva determinada por modelos oceanográficos (Mansfield & Putman, 2013). Esta rota migratória também foi observada em duas das onze fêmeas de tartarugas coriáceas que foram marcadas por satélite em KwaZulu-Natal, entre 1996 e 2003 (Luschii *et al.*, 2006). No entanto, o mesmo não foi observado para as oito tartarugas cabeçudas marcadas em Kwazulu-Natal, nem nas três tartarugas cabeçudas marcadas na RMPPO (Pereira *et al.*, 2014b) que subiram pelo canal de Moçambique.

Uma inferência adicional da possível conectividade entre as tartarugas cabeçudas do Índico e do Atlântico Sul resulta da análise de mistura de stocks (*mixed stock analysis* - MSA) de tartarugas juvenis capturadas acidentalmente pela pesca com palangre em zonas de alimentação no Atlântico Sul ao largo da costa do Brasil. Nestas áreas de alimentação foram identificados os haplótipos CC-A2, CC-A11, CC-A33, CC-A34, também presentes no Oceano Índico, e CC-A4, que é abundante no Brasil (Reis *et al.*,

2010). Estes haplótipos, presentes nas três unidades de gestão regional do Oceano Índico, representam aproximadamente metade das agregações de alimentação no Oceano Atlântico (Shamblin *et al.*, 2014). Mansfield & Putman (2013) também confirmaram a presença dos haplótipos *CC-A2.1* e *CC-A11.6* no Oceano Atlântico e reconsideraram a migração de longa distância como sendo uma possibilidade de conectividade entre as populações dos Oceanos Índico e Atlântico Sul.

Esta escala espacial de dispersão de juvenis é consistente com a conectividade genética entre as tartarugas fêmeas que ocorrem nas praias de nidificação do Japão e as tartarugas juvenis nas áreas de alimentação próximas do México (Bowen *et al.*, 1995), e entre as tartarugas fêmeas que nidificam na Austrália e os juvenis nas áreas de alimentação na costa do Peru (Boyle *et al.*, 2009).

EXPANSÃO DA COLONIZAÇÃO DO INDO-PACÍFICO A PARTIR DE POPULAÇÕES DO OCEANO ATLÂNTICO

Recentemente, a análise do padrão de distribuição e da diversidade de haplótipos de tartarugas cabeçudas no Mediterrâneo, no Oeste do Oceano Atlântico e no Sudoeste do Oceano Índico sugerem que a hipótese de uma colonização recente da África do Sul pela linhagem *CC-A2* é mais provável do que uma colonização de leste para oeste pois na África do Sul apenas se observou o haplótipo *CC-A2.1* enquanto no Mediterrâneo e o Oeste do Atlântico ocorrem pelo menos 30 haplótipos que derivam do *CC-A2.1* (Shamblin *et al.*, 2014). Esta hipótese também é suportada pelos estudos de filogeografia das tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) que apresentam um padrão similar. Nesta espécie, o haplótipo *CM-A8* é o único representante do clado no canal de Moçambique (Bourjea *et al.*, 2007) e nas praias de nidificação das ilhas Vamizi (Anastácio *et al.*, 2014) mas nas praias do Atlântico Sul ocorrem vários haplótipos derivados do *CM-A8* (Bjorndal *et al.*, 2006; Formia *et al.*, 2006).

A possível recente invasão do Oceano Índico a partir do Atlântico por pelo menos três linhagens diferentes de tartarugas marinhas sugere que a colonização de novos locais de nidificação distantes das praias natais é muito mais complexo do que um colapso dos mecanismos de fidelidade das fêmeas (*natal homing*), na presença de dispersão oceânica de pequenos juvenis.

Uma vez que as populações de tartarugas cabeçadas em ambas as bacias do Atlântico e Indo-Pacífico apresentam haplótipos dos dois clados primários de ADNmt (HGI e HGII), Avise (2007) sugeriu que se trata de um evento vicariante antigo, tal como para as tartarugas verdes. No entanto, para o caso das tartarugas cabeçadas foi seguido por transferências secundárias de linhagens de ADNmt entre o Atlântico e o Indo-Pacífico por via de migrações ocasionais pelo Cabo da Boa Esperança (Bowen *et al.*, 1994).

Esta interpretação parece plausível pelo menos biologicamente, pois as tartarugas cabeçadas do Oceano Índico actualmente nidificam a cerca de 1000 km de distância do Cabo da Boa Esperança (Kwazulo-Natal e Sul de Moçambique), e, em geral, esta espécie está mais adaptada a nidificar em temperaturas mais amenas dos regimes de clima temperado do que as tartarugas verdes, que estão mais dependentes de temperaturas tropicais (Bowen *et al.*, 1994).

REFÚGIO NO OCEANO ÍNDICO

Uma hipótese alternativa é que a linhagem CC-A2.1 refugiou-se no Oceano Índico e teve uma expansão demográfica recente após um efeito de gargalo severo. Isto pode explicar a falta de diversidade de haplótipos nas praias de nidificação da África do Sul. O estudo mais alargado das sequências mitogenómicas e marcadores nucleares pode esclarecer as hipóteses de expansão, isto é, se foi de Este para Oeste ou vice-versa (Shamblin *et al.*, 2014).

Em várias espécies, a colonização do Oceano Índico a partir de populações do Oceano Atlântico através do Cabo das Agulhas aparenta ser mais rara do que o padrão oposto. No entanto, para além de tartarugas verdes (Bourjea *et al.*, 2007), o fluxo génico do Atlântico para o Oceano Índico foi proposto para os tubarões-martelo (*Sphyrna lewini*) (Duncan *et al.*, 2006).

EXPANSÃO DE COLONIZAÇÃO DO NORTE DO OCEANO ÍNDICO A PARTIR DO ATLÂNTICO

Shamblin *et al.* (2014) sugerem uma colonização recente do Norte do Oceano Índico (Omã) a partir da invasão pelo Indo-Pacífico da linhagem ancestral das actuais linhagens do Atlântico. Mais recentemente, a linhagem que terá dado origem ao

haplótipo CC-A11.6, hipótese suportada pela estreita relação com os demais haplótipos presentes nas populações nidificantes do Oceano Atlântico, terá invadido o Atlântico a partir do Índico. Estas colonizações nas duas direcções exemplificam uma história de múltiplos contactos e trocas entre oceanos detectados com ferramentas moleculares.

EXPANSÃO DE COLONIZAÇÃO DO OESTE DO OCEANO ÍNDICO A PARTIR DE POPULAÇÕES DO ESTE DO OCEANO ÍNDICO

Prince (1994) reportou a observação de crias de tartarugas cabeçadas arrojadas ao longo da costa sudeste e sul da Austrália após tempestades e sugeriu que a Corrente Leeuwin transporta pelo menos algumas tartarugas para o sul a partir das colónias natais. Com base em análises genéticas de juvenis encalhados ao longo do sudeste da costa Australiana, Boyle e colaboradores (2009) sugeriram que as tartarugas jovens da Austrália Ocidental não atingem a costa oriental, ou seja, permanecem no Oceano Índico.

A intensidade da Corrente de Leeuwin tem uma variabilidade interanual associada ao El Niño-Oscilação Sul, e uma variabilidade sazonal sendo menos intensa nos meses de verão (Schiller *et al.*, 2008). A Corrente de Leeuwin frequentemente desencadeia vórtices de núcleo quente, e alguns são de duração longa podendo alcançar a Corrente da Austrália Ocidental, que forma o braço oriental do giro subtropical do Oceano Índico (Fang & Morrow, 2003), invocando a possibilidade de conectividade entre as populações do Oceano Índico. No entanto, dada a complexidade da dinâmica do giro subtropical do Oceano Índico, e especificamente a corrente da fronteira leste no sudeste do Oceano Índico (Stramma & Lutjeharms, 1997), é necessário fazer-se um estudo mais detalhado sobre a dispersão das tartarugas cabeçadas.

A expansão das linhagens de tartaruga cabeçada entre oceanos provavelmente ocorreu várias vezes e para o caso das linhagens do HGI é provável que a colonização tenha ocorrido nas duas direcções entre o Atlântico e o Pacífico (Bowen *et al.*, 1994).

4.1.6 CARACTERÍSTICAS DO ADN NUCLEAR

Os marcadores genéticos nucleares de herança biparental que tem sido mais frequentemente utilizados em estudos populacionais de tartarugas marinhas são os microssatélites (Phillips *et al.*, 2014), também denominados repetições curtas em série (*Short Tandem Repeats - STRs*) ou sequências simples repetidas (*Simple Sequence Repeats - SSRs*).

Os microssatélites são pequenos fragmentos do genoma eucariótico que exibem repetições em série de um motivo de dois a seis pares de bases (Tautz & Renz, 1984; Kashi & Soller, 1999). Estes fragmentos estão localizados nos intrões, regiões sem tradução, exões codificantes e próximos dos sítios de início de transcrição (Payseur *et al.*, 2011).

Os microssatélites são marcadores genéticos nucleares de hereditariedade Mendeliana (herança biparental), multialélicos e codominantes, não revelando uma análise diferencial ao longo da ontogenia do indivíduo (Oliveira *et al.*, 2006).

As variações no número de unidades de repetição resultam da perda ou ganho de uma ou mais unidades durante a replicação (Figura 4.2) através de um processo designado por “*slippage replication*”. Os erros que não são corrigidos são designados por *proofreading errors* (Menotti-Raymond & O’Brien, 1995).

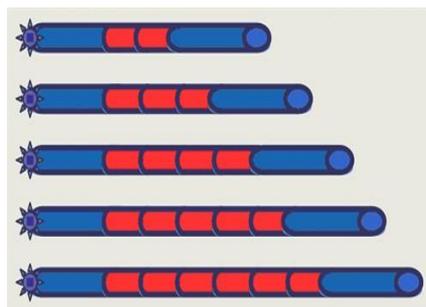


Figura 4.2 - Exemplo de 5 alelos de um *loci* microssatélite com 2, 3, 4, 5 e 6 unidades de repetição (indicadas a vermelho). Retirado de *Source Bioscience Lifescience* (lifesciences.sourcebioscience.com)

Os microssatélites têm apresentando um elevado grau de polimorfismo em todos os organismos eucarióticos examinados até à data. A sua elevada variabilidade permite considerar cada indivíduo como uma única unidade taxonómica operativa (*Operational*

Taxonomic Unit - OTU), possibilitando a aplicação de uma variedade de análises a nível individual desde que vários microssatélites diferentes sejam analisados em conjunto. Com base no seu motivo de repetição, os microssatélites podem ser classificados como perfeitos, imperfeitos ou compostos. Designam-se por perfeitos quando a sucessão das unidades de repetição não é interrompida, por imperfeitos quando a sequência de repetições está dividida por um ou mais nucleótidos e por compostos quando são constituídos por motivos de repetição diferentes (Weber *et al.*, 1990).

De modo geral, a taxa de mutação dos microssatélites está positivamente relacionada com o número de motivos de repetição (Payseur *et al.*, 2011; Willems *et al.*, 2014), ou seja, microssatélites cujo alelo principal tem um maior número de motivos de repetição exibem uma maior variabilidade. No entanto, outros factores também têm influência sobre a taxa de mutação dos microssatélites, tais como a sequência da região flanqueadora (Kruglyak *et al.*, 1998; Santibanez-Koref *et al.*, 2001), a localização no cromossoma, o grau de heterozigotia e a substituição de bases na sequência do microssatélite (Schlotterer & Tautz, 1992; Goldstein & Clark, 1995; Harr *et al.*, 1998; Payseur *et al.*, 2011), entre outros. Devido à elevada taxa de mutação, a homoplasia torna-se muito mais provável, ou seja, não é possível assumir seguramente que dois alelos idênticos no estado são idênticos por descendência.

Assim, a maioria das mutações nos microssatélites resulta de adições ou deleções de uma cópia da repetição em tandem (modelo mutação passo a passo, SMM) e podem gerar alelos com tamanhos previamente existentes (homoplasia) ressaltando que o modelo de alelos infinitos (IAM) é provavelmente inapropriado (Slatkin, 1995; Jarne & Lagoda, 1996).

Os microssatélites podem servir como ferramentas para avaliar os níveis de endogamia (FIS), o que é particularmente importante para as espécies em vias de extinção. Os níveis de endogamia permitem inferir sobre a estrutura genética de populações e subpopulações. Ainda, permitem avaliar a história demográfica (por exemplo, para procurar evidências de gargalos populacionais - *bottlenecks*), o tamanho efetivo da população (N_e) e para avaliar a magnitude e direcção do fluxo génico entre populações (Selkoe & Toonen, 2006).

4.1.7 ESTRUTURAÇÃO E FLUXO GENÉTICO MEDIADO PELOS MACHOS

Os estudos de genética de populações de tartarugas cabeçudas do Atlântico, baseados em marcadores microssatélites, reforçam o conhecimento da filopatria das fêmeas, tal como fundamentado pelo estudo do ADNmt, e sugerem a ocorrência de filopatria para os machos, embora em menor grau do que o verificado para as fêmeas (FitzSimmons *et al.*, 1997; Carreras *et al.*, 2007; Velez-Zuazo *et al.*, 2008). Isto porque, ao contrário do ADNmt, que é apenas transmitido pelas fêmeas, os microssatélites estão localizados nos autossomas e são transmitidos em igual proporção por machos e fêmeas.

No entanto, Bowen e colaboradores (2005) reportaram um contraste dos resultados obtidos com base no ADNmt e no ADN nuclear (ADNn) para as diferentes fases do ciclo de vida das tartarugas marinhas na região do Atlântico Norte. Neste estudo, verificou-se a existência de estruturação no ADNmt em tartarugas cabeçudas fêmeas, de acordo com as praias de nidificação, mas não em crias e juvenis na zona oceânica (Bowen *et al.*, 2005), o que evidencia a partilha de áreas.

Em vários estudos a estruturação de populações de tartarugas nidificantes não foi observada pelos microssatélites, o que significa que os machos podem copular com fêmeas de outras populações nidificantes. Este fluxo génico mediado pelos machos permite a conectividade entre populações consideradas isoladas de acordo com a informação mitocondrial (FitzSimmons *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 2004; Bowen *et al.*, 2005; Carreras *et al.*, 2007; Naro-Maciel, 2007). Estes estudos ressaltam que o fluxo génico nuclear pode ocorrer quando as tartarugas partilham as áreas de alimentação ou corredores de migração. Esta hipótese é também suportada pelos estudos de telemetria e marcação-recaptura que revelaram conectividade entre indivíduos de diferentes populações em áreas de alimentação (Carr & Stancyk, 1975; Limpus, 1992; Luschi *et al.*, 1998; Papi *et al.*, 2000; Hays *et al.*, 2002; Godley *et al.*, 2003).

4.1.8 TAMANHO EFECTIVO DA POPULAÇÃO

O tamanho efectivo populacional (N_e) é quantificado pelo número de indivíduos reprodutores necessários para manter a variabilidade genética nos descendentes. Assim, o N_e é geralmente menor que o tamanho da população (N), e está sob influência de características reprodutivas e conectividade populacional.

Através de dados moleculares é possível estimar o N_e (Waples, 1989; Wang, 2009) e de inferir os N_e anteriores (Garza & Williamson, 2001). O cálculo do N_e é extremamente útil para a biologia evolutiva e para a determinação do estatuto de conservação de espécies. A diversidade génica baixa, e consequentemente baixo N_e , aumenta o risco de extinção de uma população e pode estar associada à redução da adaptabilidade às mudanças ambientais (Frankham *et al.*, 1999; Franklin & Frankham, 1998). Assim, considerar o N_e e as implicações para a diversidade génica de uma população é importante em espécies ameaçadas (Hare *et al.*, 2011)

Existem alguns estudos que aplicam a estimativa do N_e para as populações de tartarugas marinhas, nomeadamente em tartaruga gigante (Rivalan *et al.*, 2006), bico-de-falcão (Phillips *et al.*, 2014), tartaruga de carapaça achatada (Theissinger *et al.*, 2009). No entanto estes estudos, a excepção de Philips e colaboradores (2014), não fazem uma relação entre o N_e e o tamanho populacional obtido através de censos. A falta de informação, nomeadamente sobre os machos, dificulta a quantificação da perda de variação genética, ou da avaliação da forma como os baixos níveis de variação podem retardar a recuperação da população e reduzir a capacidade de adaptação às perturbações futuras, tais como a mudança climática global (Hawkes *et al.*, 2009).

4.1.9 EVENTOS DEMOGRÁFICOS

Os eventos demográficos, redução ou expansão de uma população, deixam uma marca genética temporária, nomeadamente a diferença entre a distribuição alélica observadas e a esperada pelo equilíbrio de deriva genética e mutação (Cornuet & Luikart, 1996).

Uma população que tenha sofrido uma redução (*bottleneck*) irá apresentar um excesso de diversidade genética relativamente à diversidade estimada com base no número de alelos, considerando o pressuposto de equilíbrio de deriva genética e mutação (Nei *et al.*, 1975). Uma população que tenha sofrido uma expansão recente irá apresentar uma deficiência de diversidade genética, por possuir muitos alelos raros (Nei *et al.*, 1975).

Assim, os instrumentos de genética podem ser usados para distinguir dois tipos de cenários demográficos: ciclos naturais de longo termo versus fundação por imigração.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 RECOLHA DE AMOSTRAS DE TECIDO MOLE

As amostras de tecido mole foram recolhidas de tartarugas identificadas com um marcador de titânio (ver marcação de tartarugas no capítulo 3) para evitar a replicação de amostras.

Procedeu-se à biopsia de 3-5 mm de tecido mole da barbatana posterior, previamente limpa com álcool etílico a 96%. Este procedimento foi realizado com luvas, bisturis e lâminas descartáveis esterilizadas com álcool e chama (Figura 3.2b). A biopsia não é prejudicial para as tartarugas marinhas (Bjorndal *et al.*, 2010).



Figura 4.3 - Recolha de uma amostra de tecido mole de uma tartaruga cabeçuda (Fotografia gentilmente cedida por Jess Williams)

No total obteve-se 63 amostras de tecido mole de tartarugas cabeçudas (60 fêmeas adultas, das quais 3 foram mortas por pescadores em Závora e 1 por causas naturais, e 3 crias mortas). A amostragem foi feita nas praias de nidificação da RMPPO das quais 4 foram recolhidas entre a Ponta do Ouro - Ponta Malongane, 39 entre a Ponta Malongane - Ponta Dobela, e 7 entre a Ponta Dobela - Ponta Mucombo e 9 entre a Ponta Mucombo - Ponta Abril. A norte da RMPPO, em Xai-Xai e Závora, foram recolhidas apenas 4 amostras de tartarugas cabeçudas (Figura 4.4).

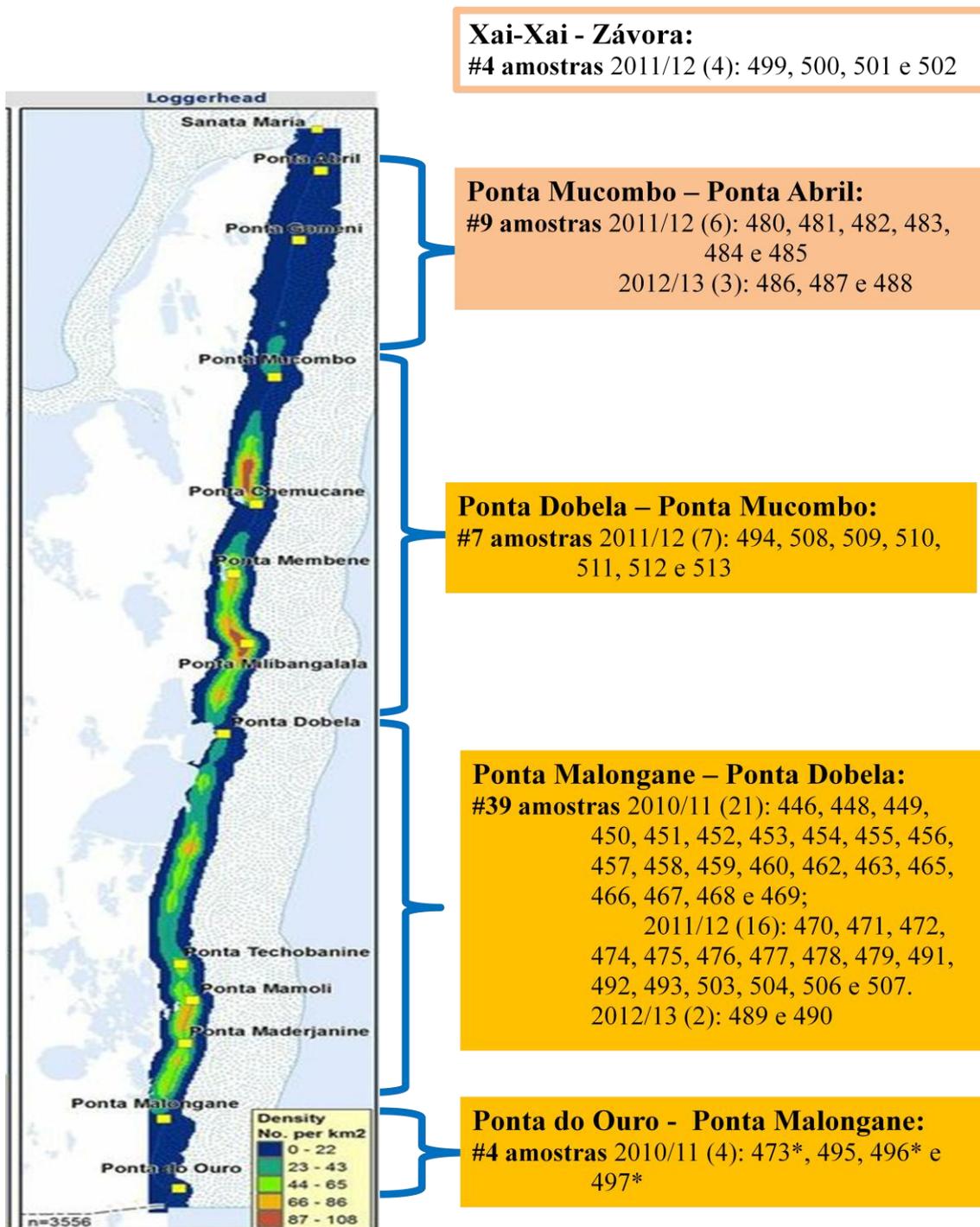


Figura 4.4 - Locais de amostragem de tecido de tartaruga cabeçuda e o respectivo número de amostras por época (total de 63 amostras). As amostras de Závora e Xai-Xai (Grupo 5) foram recolhidas em tartarugas mortas. *crias mortas (mapa gentilmente cedido pela RMPPO).

4.2.2 TRANSPORTE DAS AMOSTRAS E TRABALHO LABORATORIAL

As análises genéticas foram realizadas em Portugal, no Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos da Universidade do Porto (CIBIO/InBIO-UP). Uma vez que todas as espécies de tartarugas marinhas constam da lista da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Flora e Fauna Selvagens (CITES; <http://www.cites.org/>), para transportar as amostras de tecido mole recolhidas foi necessário obter-se previamente a autorização para exportação e importação. Em Moçambique a CITES é representada pelo Ministério para a Coordenação Ambiental (MICOA) e em Portugal pelo Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF). Estas instituições emitiram as licenças nr. MZ-0188-2013 e 13-PT-LX0004/P, respectivamente.

As análises laboratoriais foram realizadas nos laboratórios do Centro de Testagem Molecular (CTM) do CIBIO/InBIO-UP, Portugal, em Junho de 2013. Para facilitar a ordem de análise laboratorial e introdução na base de dados do CIBIO, foram atribuídas às amostras uma enumeração contínua de T446 a T513.

4.2.3 EXTRACÇÃO DO ADN

Antes de iniciar a extracção, foi efectuada a esterilização de um tabuleiro de vidro, pinças e bisturi com lixívia para remover possíveis vestígios de ADN de extracções prévias e álcool para remover o excesso de lixívia. Após cada utilização, o processo de esterilização dos bisturis e pinças, fazendo uso de álcool etílico a 90% e chama de uma lamparina, foi repetido. Estas esterilizações servem para prevenir contaminações entre amostras, uma vez que o espaço é usado por vários investigadores. Para evitar uma possível contaminação entre as amostras manipuladas, foram desenhadas quadrículas no tabuleiro e cada amostra foi colocada numa quadrícula (Figura 4.5).

Para cada amostra, foi efectuada uma lavagem em água destilada para remover o excesso de álcool. A seguir à lavagem, cortou-se um pedaço de tecido, que foi triturado. O corte e a trituração foram feitos no tabuleiro.



Figura 4.5 - Trituração de uma amostra de tecido mole.

A qualidade das amostras foi determinada pela presença/ausência de cheiro desagradável, presença/ausência de cor no álcool onde estavam preservadas e outros sinais de degradação evidente. Cinquenta e uma amostras apresentavam maior integridade e 8 amostras estavam parcialmente degradadas, isto é, foram consideradas amostras de extracção difícil. No primeiro caso, o ADN foi extraído com o Kit *Easy Spin* (Citomed) e nas restantes foi utilizado o Kit *QIAamp DNA Micro* (Quiagen). O produto da extracção foi armazenado a -20°C .

De seguida é descrito o protocolo de extracção para cada kit de acordo com o fabricante.

PROTOCOLO DE ISOLAMENTO DE ADN GENÓMICO DE TECIDOS ATRAVÉS DO KIT *EASY SPIN*

Este kit foi desenvolvido para o isolamento rápido do ADN genómico de tecido animal. O método consiste na ligação de aproximadamente $10\ \mu\text{g}$ de ADN genómico nas membranas incorporadas em colunas *EasySpin* e na lavagem das colunas para descartar proteínas, sais, nucleótidos e outras impurezas.

Para o efeito, as amostras (até $30\ \mu\text{g}$) foram colocadas em tubos de centrifugação de 1.5 ml, ao qual foram adicionados $300\ \mu\text{l}$ de solução ACL e $20\ \mu\text{l}$ de Proteinase K. Os componentes da solução foram homogeneizados mecanicamente num agitador vortex. Este preparado foi incubado a 55°C por 3 horas para proporcionar a lise celular. Após o arrefecimento, à temperatura ambiente, procedeu-se a uma nova homogeneização, no

agitador vortex, durante aproximadamente 20 segundos, que foi seguida por uma centrifugação a 14 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos.

Tendo cuidado para não ressuspender o precipitado, 300 µl do sobrenadante foram pipetados para tubos com a coluna *EasySpin* e adicionados 300 µl de Solução AB. De seguida, os tubos foram invertidos para permitir a mistura e colocados em repouso durante 2 minutos.

A solução foi centrifugada a 4000 rpm durante 2 minutos e o sobrenadante, carregado de impurezas, foi descartado. Foram adicionados à solução 500 µl de solução de lavagem e esta foi posteriormente submetida a uma centrifugação a 8000 rpm durante 1 minuto. A lavagem foi repetida descartando o sobrenadante e centrifugando a 14 rpm durante 5 minutos para remover resíduos da solução de lavagem.

A coluna foi colocada num tubo de plástico de 1.5ml e foram adicionados 50 µl de tampão de eluição na parte central da membrana da coluna. De seguida o tubo foi incubado a 55°C durante 10 minutos. Para finalizar, foi centrifugado a 14000 rpm durante 5 minutos para eluir o ADN da coluna. A solução com o ADN foi recolhida no tubo.

PROTOCOLO DE ISOLAMENTO DE ADN GENÓMICO DE TECIDOS ATRAVÉS DO KIT *QIAAMP ADN MICRO*

Este protocolo requer que as centrifugações sejam feitas a uma temperatura ambiente de 15-25°C e que as amostras de tecido sejam preparadas numa superfície fria. Antecipadamente foram preparadas as soluções tampão AL (*lysis buffer*) e ATL (*tissue lysis buffer*), isto é, foram aquecidas a 70°C e posteriormente homogeneizadas para remover o precipitado.

As amostras de tecido, com menos de 10mg, foram transferidas para tubos de centrifugação de 1.5 ml. De imediato, foram adicionados às amostras 180 µl de tampão ATL e estabilizadas à temperatura ambiente. Foram adicionados 20 µl de Proteinase K, tendo as amostras posteriormente sido homogeneizadas no agitador vortex durante 15 segundos. Os tubos foram depois colocados no misturador térmico pré-aquecido a 56°C, e incubados a essa temperatura durante a noite para proporcionar a lise celular.

No dia seguinte, foram adicionados 200 µl de tampão AL e misturados no agitador vortex durante 15 segundos, tornando a solução homogénea. De seguida 200 µl de etanol (96-100%) foram adicionados e a solução foi misturada no agitador vortex durante 15 segundos.

Os tubos foram incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente (15-25°C) e de seguida centrifugados para retirar as gotas da tampa. Cuidadosamente, toda a solução do passo anterior foi transferida para uma coluna *QIAamp MinElute*, sem molhar o aro, e centrifugada a 8000rpm durante 1 min.

A coluna *QIAamp Min Elute* foi inserida num tubo de coleta de 2 ml, e descartou-se o tubo que continha o sobrenadante. Cuidadosamente, foram adicionados 500 µl de tampão AW₂ (*Wash buffer*) na coluna *QIAamp MinElute* e centrifugados a 8000 rpm durante 1 minuto. A coluna *QIAamp Min Elute* foi novamente colocada num novo tubo de coleta de 2 ml e centrifugada à velocidade máxima de 14000 rpm durante 3 minutos para secar completamente a membrana. De seguida foi colocada num tubo de plástico de 1.5 ml e adicionados 20-100 µl de tampão AE (*Elution buffer*) no centro da membrana da coluna, incubada à temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugada à velocidade máxima (14000 rpm) durante 1 minuto. No final, descartou-se a coluna e armazenou-se o tubo contendo a solução de ADN.

4.2.4 VISUALIZAÇÃO DO PRODUTO DE EXTRACÇÃO DE ADN

O sucesso da extracção de ADN foi avaliado por electroforese em gel de agarose a 0.8% p/v em tampão TBE 0.5x a 300 mV. A electroforese é uma técnica que permite separação de moléculas através da aplicação de uma corrente eléctrica. Neste caso, espera-se que os produtos da extracção sejam moléculas de tamanho relativamente grande, pelo que se opta pela utilização de agarose de baixa concentração como matriz do gel. O tampão utilizado para preparar o gel contém uma substância, ácido bórico, que actua como electrólito, permitindo a passagem da corrente eléctrica. A baixa concentração de agarose resulta num gel com poros suficientemente grandes para permitir a passagem das moléculas de ADN extraídas das amostras.

O gel de agarose a 0.8% (200 ml) foi preparado em solução tampão electrolítica Tris-Borato EDTA (TBE) 50 M (Tampão Tris-borato-EDTA: Tris 89 mM, ácido bórico

89mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) e homogeneizado após aquecimento no microondas. De seguida, foram adicionados 7 µl de GelRed (Biotium) no gel, um marcador de ácidos nucleicos fluorescente, que permite visualizar as bandas de ADN usando um transiluminador de luz ultra-violeta (UV). Depois de arrefecida, a solução foi vertida para um recipiente com pentes (o recipiente serve de molde para o gel e os pentes servem para formar os poços onde se insere a solução com o produto da extracção).

A preparação do produto de extracção consistiu em misturar numa microplaca, com agitação suave, 2 µl do extrato de ADN a 3 µl de solução de azul de bromofenol a 0.1%. Esta solução corante contém EDTA e sacarose e cumpre duas funções: facilitar a inserção das amostras nos poços do gel de agarose (graças ao elevado peso molecular da sacarose) e marcar a posição do ADN no gel durante a corrida, uma vez que o ADN, que é uma substância incolor, migra mais devagar que o corante.

Após a solidificação do gel foram removidos os pentes. O gel foi colocado numa tina de electroforese horizontal, e adicionou-se o tampão TBE até cobrir o gel. De seguida, foram preenchidos os poços com as misturas acima preparadas (Figura 4.6-a e Figura 4.6-b). No último poço de cada fila, colocou-se 2µl de marcador de peso molecular, uma mistura com fragmentos cujos pesos moleculares são conhecidos.

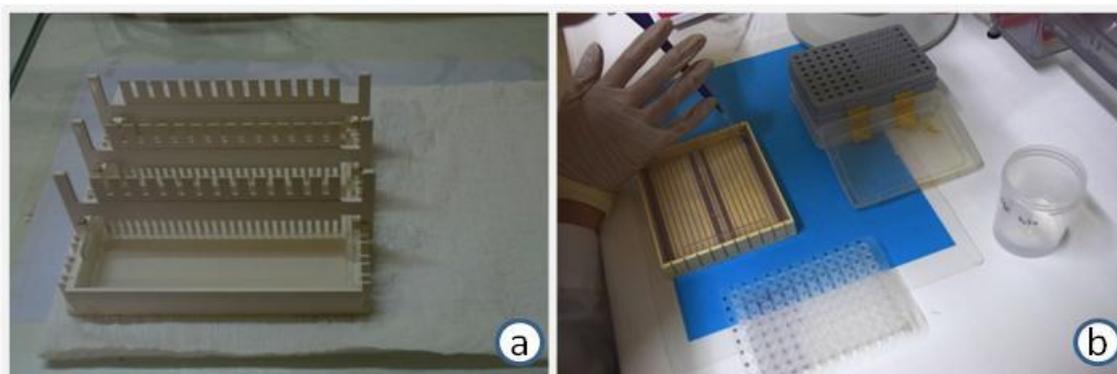


Figura 4.6 - a) Polimerização do gel de agarose com os pentes colocados para formar os poços; **b)** Inserção das amostras no gel de agarose.

Finalmente, o gel foi submetido a uma corrente eléctrica de 300 mV permitindo a migração das moléculas de ADN (Figura 4.7). A corrida electroforética decorreu durante aproximadamente 10-15 minutos.

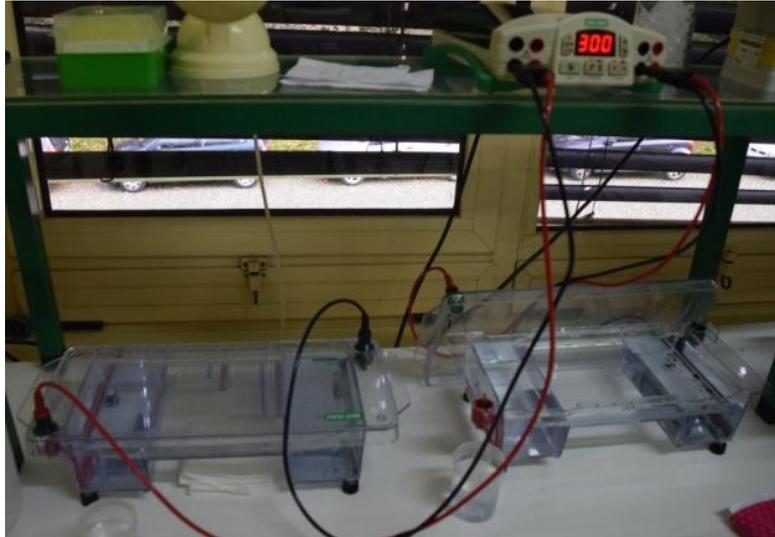


Figura 4.7 - Corrida electroforética para visualização do produto da extracção de ADN.

O gel foi então colocado num transiluminador UV (Figura 4.8-a), que permitiu ver se a extracção foi bem-sucedida e determinar a qualidade e quantidade de ADN recuperado por amostra (Figura 4.8-b), e os resultados foram registados.

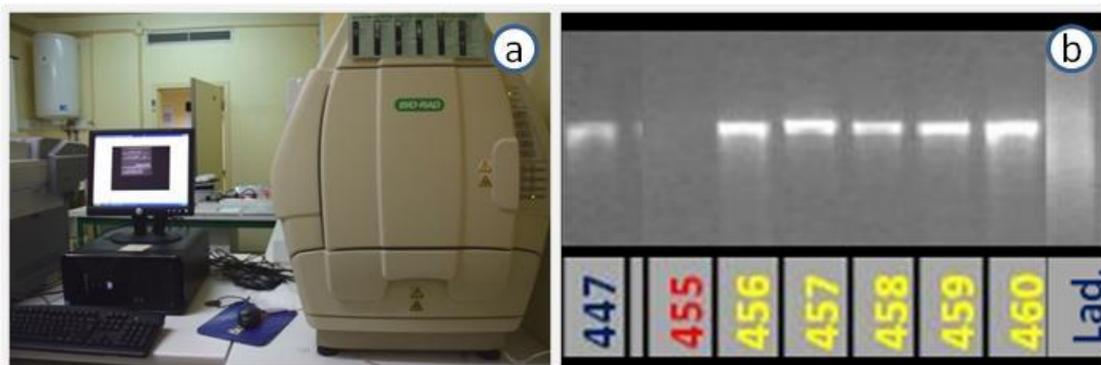


Figura 4.8 - a) Visualização das bandas de ADN num transiluminador UV (à direita na imagem) ligado a um computador; **b)** Exemplo de um gel de agarose 0.8% (p/v) corado com GelRed onde se pode ver o resultado de uma extracção de ADN. As bandas brancas nítidas mostram que a extracção foi adequada e a ausência de banda (amostra 455) mostra que a extracção falhou. As bandas do marcador de peso molecular (indicado com “Lad.” na imagem) não estão nítidas.

4.2.5 AMPLIFICAÇÃO DO ADN MITOCONDRIAL POR PCR

Para a amplificação de uma sequência de cerca de 800 pb da região controlo do ADN mitocondrial (ADNmt) foram colocados numa microplaca 0.4 µl do *primer forward* LCM15382 (5' - GCT TAA CCC TAA AGC ATT GG - 3' (Abreu-Grobois *et al.*, 2006), 0.4 µl do *primer reverse* H950 (5' - TGC ACG GCC AAT CAT TTT GAA CGT AG - 3'), magnésio e dNTPs de acordo com as condições descritas pelos autores (Figura 2). Os *primers* são sequências curtas e sintéticas de nucleótidos (normalmente têm entre 20 a 30 pares de bases) que, ao ligar-se com a sequência complementar da cadeia de ADN, actuam como marcadores da região do ADN que se quer estudar em mais detalhe.

De seguida foram adicionados 10 µl do produto de extracção de cada amostra. Para despistar possíveis contaminações foi feito o controlo negativo, ou seja a mesma mistura mas sem o produto de extracção.

A microplaca foi introduzida no termociclador e estabelecido o programa representado na figura 4.9. A amplificação consistiu em 36 ciclos com os seguintes passos: a) desnaturação ou separação das duas cadeias de ADN, b) hibridação (*annealing*) ou ligação dos *primers* à cadeia molde de ADN, e c) extensão ou síntese de novos fragmentos de ADN mediante a actuação da polimerase do ADN (*Taq DNA Polimerase*). A extensão final permite completar a síntese de fragmentos incompletos dos ciclos anteriores. Os produtos de PCR foram depois armazenados a 20°C.

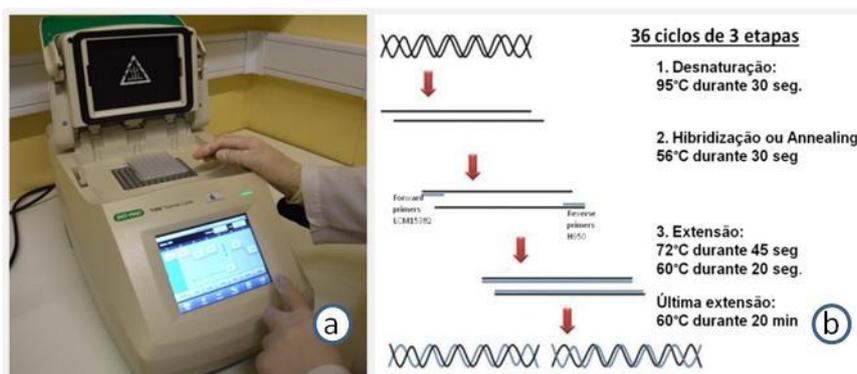


Figura 4.9 - a) Introdução da microplaca com as soluções de PCR no termociclador; b) Esquema da amplificação do fragmento mitocondrial por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e das condições do programa optimizadas para os primers LCM15382 e H950. Os detalhes da reacção estão descritos no texto. Adaptado de Molecular Station, 2009.

De seguida, foi efectuada a visualização do produto de PCR recorrendo a uma electroforese em gel de agarose de 2%. Esta maior percentagem de agarose resulta num gel com poros mais pequenos, mais útil para a visualização de moléculas com menor tamanho, como é o caso dos produtos da amplificação. Para o efeito, foram adicionados 2 µl do produto de PCR e 3 µl de azul de bromofenol numa microplaca. O restante procedimento é idêntico ao descrito no ponto anterior (visualização do produto da extracção).

Para a sequenciação, as amostras com bandas mais carregadas foram diluídas com tampão TBE na proporção de 1:2. A placa com as amostras foi gentilmente abanada para retirar possíveis bolhas das amostras (que poderiam dar erros de leitura nos capilares do sequenciador). Os produtos resultantes do PCR foram depois purificados com ExoSAP-IT® (Amersham Biosciences), uma solução que contém as enzimas exonuclease e fosfatase alcalina (*Shrimp Alkaline Phosphatase*).

Assim, a purificação baseia-se na acção da exonuclease I para remover os *primers* residuais, e da fosfatase alcalina para remover o dNTPs não incorporados. Para o efeito, foi adicionado 1 ml de ExoSAP-IT a 7-8 µl do produto de PCR. Durante este procedimento, especial atenção foi prestada de modo a manter a ExoSAP-IT num bloco frio e protegida da luz. De seguida, foi efectuada uma mistura suave no agitador vortex e incubação a 37°C, durante 15 minutos e depois a 80°C durante 15 minutos, para que o calor inactivasse as enzimas.

A solução de *Sephadex* serve para remover os ácidos nucleicos residuais. Usou-se 200 µl de *Sephadex* para cada 5 µl do produto de PCR por cada coluna ABI da placa de limpeza. Para o efeito, a solução de *Sephadex* foi misturada rigorosa e frequentemente durante a pipetação para evitar a precipitação de cristais e a distribuição desigual de cristais nas colunas. De seguida, a placa de recolha foi colocada por baixo da placa de limpeza e centrifugada a 2950 rpm durante 3 min. Após a centrifugação, o líquido depositado na placa de recolha foi rejeitado.

De seguida, os produtos de PCR foram adicionados no centro de cada coluna e uma nova placa de coleta (para ir para o sequenciador ABI) foi colocada por baixo da placa de limpeza, e repetida a centrifugação. Por fim, o conteúdo da placa de recolha foi seco

novamente, tendo sido colocado num termociclador durante 10-20 min a 95°C. O conteúdo da placa foi re-hidratado por adição de 12 µl de Hi-Di formamida, tendo repousado durante 15 min à temperatura ambiente antes da sequenciação.

A sequenciação foi realizada utilizando o protocolo *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* v 3.1 (Applied Biosystems), com os mesmos *primers* usados no PCR, e analisado com um sequenciador genético ABI 3730 (Applied Biosystems), nas instalações da empresa StabVida (www.stabvida.com).

4.2.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO ADN MITOCONDRIAL

As leituras dos cromatogramas das sequências das cadeias *forward* e *reverse* foram efectuadas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>; Hall, 1999). Este programa permite obter a sequência complementar da cadeia *reverse* e o alinhamento das sequências através das ferramentas “*Complement reverse*” e “*ClustalIW Multiple Alignment*”, respectivamente. Todas as sequências foram individualmente analisadas para detectar possíveis erros de leitura e excluir amostras ou porções de sequências para as quais não foi possível determinar com certeza a atribuição das bases nucleotídicas. Para cada amostra reconstituiu-se a região sequenciada concatenando as sequências obtidas nas reacções com os *primers forward e reverse*. Estas sequências foram então alinhadas para análises posteriores.

A procura dos haplótipos correspondentes às sequências foi feita no GenBank, a base de dados do Instituto da Saúde Norte-americano (NIH) que reúne sequências publicadas e verificadas no GenBank, no Laboratório Europeu de Biologia Molecular (EMBL) e no Banco de dados de ADN do Japão (DDBJ), usando a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para estudar a relação entre os haplótipos das tartarugas cabeçudas, foi também efectuada a importação dos haplótipos de tartarugas cabeçudas de outras populações, com 800pb, da base de dados do *Archie Carr Center for Sea Turtle Research* (<http://accstr.ufl.edu/>). O objectivo destes passos foi identificar e comparar as similaridades das sequências mitocondriais encontradas na RMPPO com a de outras populações de tartarugas cabeçudas. Após a identificação dos haplótipos (sequências com uma determinada combinação de nucleótidos), foi estimada a

diversidade de haplótipos e de nucleótidos (Nei, 1987) das amostras da RMPPPO no programa DnaSP v5.10.01 (Librado & Rozas, 2009).

Através do programa Network v4.6.1.0 e do algoritmo Median-Joining (Bandelt *et al.*, 1999), foi produzida uma rede de haplótipos de tartarugas cabeçudas que nidificam em diferentes praias do oceano Índico, Atlântico, Pacífico e no Mediterrâneo.

4.2.7 MARCADORES UTILIZADOS, PCR E GENOTIPAGEM DE ADN NUCLEAR (MICROSSATÉLITES)

Foi utilizado um conjunto de 21 microssatélites isolados em *Caretta caretta* (Shamblin *et al.* (2007). A descrição dos microssatélites é apresentada na tabela 4.1.

Os *primers* dos microssatélites foram agrupados em quatro mixes. Cada *primer* estava associado a um marcador fluorescente na extremidade 5', nomeadamente FAM, VIC, NED ou PET (Tabela 4.2), e por isso permaneceram envolvidos em papel de alumínio de forma a ficarem protegidos da luz. A sequência dos *primers*, com 20 a 40 pares de base, são específicas para ligarem-se às regiões flanqueantes reduzindo a probabilidade de ligarem-se a outras regiões.

De seguida, foi adicionado uma solução designada por *master mix* que contém uma enzima polimerase do ADN (*Taq Polimerase*), magnésio, solução tampão e dNTPs.

O programa de amplificação do ADN nuclear (Tabela 4.3), tal como descrito para a amplificação do ADN mitocondrial, consiste em três fases (desnaturação, hibridação e extensão) mas com uma ligeira alteração que permite aumentar a especificidade da amplificação: utilizou-se um protocolo de PCR *touchdown*, ou seja, a temperatura de *annealing* foi diminuindo ao longo dos primeiros 21 ciclos.

Para cada amplificação foi utilizado um controlo negativo, isto é, uma solução com todos os componentes utilizados excepto o ADN (branco), para discriminar eventuais contaminações, e dois controlos positivos (com ADN previamente genotipado) para despistar problemas relacionados com as reacções de PCR.

Tabela 4.1 - Descrição dos 21 microssatélites analisados quanto ao motivo de repetição, tamanho do produto de PCR (em pb; TP) do alelo mais frequente e localização genômica.

Locus	Sequência do Primer	Motivo de repetição	TP (pb)	Número de acesso do GenBank
1 Cc1B03	F:CAGTCGGGCGTCATCATCAATAGCTCAGTCATAGGT R:GTTTAGCAGACATAGGGGAGTG	(ATCT)15	304	DQ917761
2 Cc1F01	F:CAGTCGGGCGTCATCAGTGTGAAGGCTCTAAACTAAT R:GTTTATACTGGGACGATAGGATAAA	(ATCT)15	332	DQ917762
3 Cc1G02	F:GGAAACAGCTATGACCATCTAAACATTGATAGT R:GTTTATACTGTGCTCTTTCGTGTAAT	(ATCT)9	286	DQ9117763
4 Cc1G03	F:CAGTCGGGCGTCATCAGGAATGTGCAGAATGTATGT R:GTTTAAACGAGCATGTATCTAAAGTAA	(AGAT)20	324	DQ9117764
5 Cc2G10	F:CAGTCGGGCGTCATCAGTGGCAAGGTCAAATACAG R:GTTTGGCCCTATTGGTGCACAC	(CTTT)16	301	DQ917766
6 Cc2H12	F:CAGTCGGGCGTCATCATCTCAGGAGTTTTGACTTG R:GTTTCCACACCCTGTTTCAGA	(AAAG)1... (AGGGC)9	325	DQ9117767
7 Cc5C08	F:GTTTCTTTGATGGTTTTCTGTTATC R:CAGTCGGGCGTCATCAGTCTTCAGGGTATCGTGTAAT	(CTTT)18	325	DQ917768
8 Cc5F01	F:GTTTAAAGGATTTGAGATGTTGTATG R:CAGTCGGGCGTCATCACCAGTTGTCTTTCTCCAGTG	(CTTT)13	161	DQ917769
9 Cc5H07	F:CAGTCGGGCGTCATCAAGGAAGGAGAGGCTTATTAC R:GTTTGGGCAATGAGACTGGAACATA	(CTTT)16	555	DQ917770
10 Cc7B07	F:GTTTATAATGTTGGTGAGCAATATAG R:CAGTCGGGCGTCATCAGGAGTTAA	(ATCT)18	266	DQ917771
11 Cc7C04	F:GTTTCTTAACCAACGGAGAAACA R:CAGTCGGGCGTCATCACTCCTTCAGAAGTCTTCACAT	(AGAT)11	226	DQ917772
12 Cc7G11	F:GTTTCTCAGCATGAAAGTGAATAC R:CAGTCGGGCGTCATCATGGATTTGT	(AGAT)14	310	DQ917774
13 CcP1F09	F:GGAAACAGCTATGACCATAAATGTTGCCGTTTCTATTG R:GTTTCTCCCCAACCTCTCAT	(ATCT)18	441	EU125405
14 CcP2F11	F:GGAAACAGCTATGACCATGTGCCTTAGGACTTGACTTG R:GTTTGAAGAAAATAAATGAAACACTC	(AAAG)15	286	EU125406
15 CcP5C11	F:GTTTCTATTTGACACCACTCCACTCT R:CAGTCGGGCGTCATCATTGATTCTCTTCCCTTTACA	(AAAG)7	188	EU125396
16 CcP7C06	F:CAGTCGGGCGTCATCATTAAATTCCTTCAGTTCAAGTG R:GTTTCTCAGCTTGAGCAAAGAGAGAG	(ATCT)15	306	EU125398
17 CcP7C08	F:CAGTCGGGCGTCATCAGAGCATTGGCAGCATAGA R:GTTTAGTGAGTTCTAAAATGCCTAAC	(ATCT)6	298	EU125399
18 CcP7D04	F:CAGTCGGGCGTCATCATGAGCAAAGTAACCCTAACCA R:GTTTGGAGCCAAATTAGAGATCAAC	(AGAT)17	375	EU125400
19 CcP7F06	F:GGAAACAGCTATGACCATGACCACCCTCCAGTGAA R:GTTTGTGTTGGTTGATTACTTCTATG	(ATCT)13	294	EU125402
20 CcP7H10	F:CAGTCGGGCGTCATCATCGAGACTCAATAAATACAGAGA R:GTTTATAACAACACAGCATAAAAATAAT	(AGAT)7	215	EU170009
21 CcP8D06	F:CAGTCGGGCGTCATCAGAAGTGGTGTCTTTGTA R:GTTTGTCCAGCATGAGAATGA	(CTTT)19... (CTTT)4... (CTTT)5	390	EU125404

Tabela 4.2 - Composição dos mixes preparados para a genotipagem dos 21 microssatélites analisados (V-volume).

	Mix 1		Mix 2		Mix 3A		Mix 3B	
Fluorescentes associados aos primers	Primers	V (µl)	Primers	V (µl)	Primers	V (µl)	Primers	V (µl)
FAM	CcP5C11 CcP7F06 CcP1F09	2,4 3,0 3,0	Cc2H12	3,6	Cc7H10	10,2	CcP8D06	2,0
VIC	CcP7C06 CcP7D04	6,0 1,8	Cc7C04 Cc5C08	2,4 6,0	Cc7G11	1,5	Cc2G10	0,8
NED	Cc5H07 CcP7C08	12,0 1,8	Cc8B07 Cc1F01	3,6 3,6	Cc1G02	3,0	Cc5F01	20,0
PET	CcP2F11	13,5	Cc1B03	3,6	Cc1G03	3,6		
H2O		169,5		231,6		245,1		31,6
Volume total		300,0		300,0		300,0		100,0

V – Volume

Tabela 4.3 - Programa de amplificação por PCR dos 21 microssatélites analisados

Fase da amplificação	Temperatura	Duração	Ciclos de repetição
Desnaturação inicial	95°C	15 min.	
Desnaturação	95°C	30 seg.	21 ciclos a cada ciclo reduziu-se 0,5°C da temperatura de annealing
Hibridização/ <i>Annealing</i>	60°C – 50°C	45 seg.	
Extensão	72°C	1 min.	
Desnaturação	95°C	30 seg.	24 ciclos
Hibridização/ <i>Annealing</i>	50°C	45 seg.	
Extensão	72°C	1 min.	
Extensão final	72°C	30 min.	
Temperatura final constante	10°C	constante	

A confirmação do sucesso de amplificação foi efectuada por corrida electroforética em gel de agarose 2% p/v a 300 mV. A electroforese e a coloração foram realizadas de acordo com as condições referidas para o teste de extracção do ADN. A aplicação de um marcador de peso molecular conhecido (*Marker 5*, Eurogentec) permitiu inferir, através da observação do gel num transiluminador UV, se o produto de amplificação correspondia ao tamanho médio documentado para os diferentes *loci* (Figura 4.10).

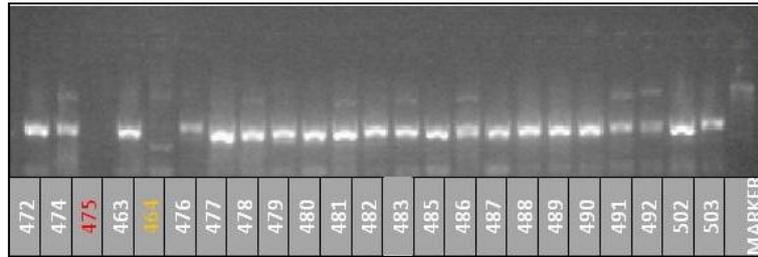


Figura 4.10 - Imagem exemplificativa do teste do sucesso da reacção de amplificação (do mix2, neste exemplo) num gel de agarose 2% (p/v). No poço sem banda, identificada pelo código a vermelho, não houve amplificação. O código a laranja indica a não amplificação (por se tratar de uma amostra de outras espécies de tartarugas marinhas; ver capítulo dos resultados mitocondriais). As bandas do marcador de peso molecular (*Marker 5*) não estão bem visíveis nesta imagem.

4.2.8 GENOTIPAGEM

A placa com o produto do PCR amplificado foi colocada no Sequenciador ABI, que fora previamente calibrado. Os capilares do sequenciador permitem a separação por electroforese dos fragmentos de ADN dos diferentes *loci* de cada *Mix* que estão marcados com fluorescência. A leitura dos tamanhos dos fragmentos dos *loci* foi feita no programa Genemapper (Applied Biosystems). Para cada *locus* foi analisado o polimorfismo, o intervalo de tamanho dos alelos e o motivo de repetição, usando o programa MS Excel 2007.

4.2.9 CONTROLO DA QUALIDADE DOS DADOS RECOLHIDOS

EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

A diversidade genética ou heterozigotia refere-se à proporção de indivíduos heterozigóticos numa população. Esta proporção apresenta um valor observado (H_o) que pode diferir do seu valor esperado (H_e). Estes valores são estimados tendo em conta o modelo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O modelo de Hardy-Weinberg postula que em populações de tamanho infinito de organismos diplóides, com reprodução sexuada, acasalamentos ao acaso, gerações não sobreponíveis, frequências alélicas iguais entre sexos, sem mutação, selecção e migração, as frequências alélicas mantêm-se contantes ao longo das gerações. Assim, os desvios dos dados de variação genética obtidos em relação ao modelo de Hardy-

Weinberg são quantificados através da comparação dos valores de frequências genóticas observadas e esperadas.

Os desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados no programa Genepop 4.2 (Raymond & Rousset, 1995) através do teste exacto pelo método Markov chain (parâmetros: *Dememorization*: 10000; *Batches*: 1000 e *Iterations per batch*: 5000), sendo a hipótese nula a “existência de déficit de homozigóticos ou excesso de heterozigóticos” testada pelo método de Fisher (estatística F ou Índice de Fixação).

Assim, a estatística F descreve a intensidade e o sinal do desvio ao equilíbrio, sendo F_{IS} positivo quando existe uma deficiência de heterozigóticos (ou excesso de homozigóticos) na população e é negativo quando existe um excesso de heterozigóticos (ou deficiência de homozigóticos; (Wright, 1951, 1965).

Se a população biológica analisada viola os pressupostos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, esperam-se desvios significativos em relação às expectativas deste modelo, e espera-se que estes desvios afectem a generalidade dos *loci* genotipados. Desvios específicos de um determinado *locus* podem indicar a existência de erros de genotipagem nesse *locus* em particular (ou uma história evolutiva não-neutral) e aconselham a sua eliminação do conjunto final de dados.

EQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (*LINKAGE EQUILIBRIUM*)

O *linkage disequilibrium* (desequilíbrio de ligação) é a associação não-aleatória de alelos de diferentes *loci*. Assim, o *linkage disequilibrium* descreve uma situação em que algumas combinações de alelos ou marcadores genéticos ocorrem mais ou menos frequentemente numa população do que era esperado pela formação aleatória de haplótipos a partir de alelos baseados nas suas frequências (Slatkin, 2008). Este sinal pode ser provocado pela localização próxima no genoma de pares de *loci* genotipados (e consequente baixa taxa de recombinação entre eles), *inbreeding* ou estruturação populacional não considerada, entre outros factores.

No programa Genepop 4.2 testou-se a hipótese nula “os genótipos de um determinado locus são independentes dos genótipos de outro locus” (Weir, 1996; Rousset, 2013) para os três conjuntos de resultados, ou seja, considerando uma, duas e cinco populações

(Figura 4.4). O programa organiza os pares de *loci* em matrizes, e de seguida procede ao teste global pelo método de Fisher para testar o nível de significância para cada par de *loci* de acordo com a amostra.

DETECÇÃO DE ALELOS NULOS - ERROS DE GENOTIPAGEM

Os erros de genotipagem afectam as estimativas das frequências alélicas e a discriminação dos diferentes genótipos. Falsas estimativas da frequência alélica podem por exemplo levar à consideração de um excesso de homozigóticos, errar na atribuição do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sobrestimar a hibridação ou inferências erróneas da estruturação populacional.

Ao longo da genotipagem podem ocorrer erros que resultam no aparecimento de alelos nulos, alelos intermédios, alelos semelhantes aos marcadores internos, bandas *stutter*, picos +A e alelos *drop-out* (Castro *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2004) e que por isso não correspondem ao genótipo real do indivíduo considerado.

No caso dos microssatélites, os alelos nulos podem aparecer quando ocorrem mutações nas regiões flanqueantes, que impedem a ligação do *primer* à cadeia de ADN e, conseqüentemente, não permite a amplificação (Kwok *et al.*, 1990), ou devido à amplificação diferencial de acordo com o tamanho dos alelos variantes, em que a amplificação é mais eficiente para os alelos de comprimento mais curto (Wattier *et al.*, 1998), ou ainda devido a falhas de amplificação por inconsistências na qualidade ou/quantidade de ADN molde para um determinado locus (Gagneux *et al.*, 1997; Garcia de Leon *et al.*, 1998). Assim, a genotipagem resulta num falso homozigótico que contribui para um erro das proporções genóticas e pode resultar num desvio ao equilíbrio de Hardy-Weinberg devido a um excesso de homozigóticos (Brookfield, 1996; Dakin & Avise, 2004). No entanto é importante referir que alguns factores biológicos, tais como efeito de Wahlund ou endogamia, podem causar défices heterozigotos em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (Chakraborty *et al.*, 1992) mas para ser o caso, estes efeitos devem fazer-se sentir na generalidade dos *loci* e não em apenas um *locus* em particular.

A identificação de possíveis erros de genotipagem foi feita no programa Microchecker. Este programa detecta e estima a frequência dos alelos nulos (r) através dos métodos

descritos por Chakraborty e colaboradores (1992) e Brookfield (1996). Se a distribuição de alelos nulos for equilibrada para as classes de alelos, o programa pode ajustar as frequências alélicas e genotípicas observadas (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Contudo, se o excesso de homocigóticos for observado em todos os *loci* o programa informa que a população não é panmítica.

No entanto, dada à potencialidade infinita das fontes de erro é impossível erradicá-las completamente e por isso, dependendo dos casos, poderá rejeitar-se o uso de determinado *loci*.

As análises da diversidade genética e estrutura populacional foram feitas tendo em consideração as seguintes partições (Figura 4.4):

- 1 população – inclui todas as amostras amplificadas (POP1);
- 2 populações – divide em dois grupos, o grupo a sul que inclui as amostras recolhidas na Ponta do Ouro, Ponta Malongane e Ponta Dobela (POP1) e o grupo a norte, que inclui as amostras recolhidas na Ponta Mucombo e uma amostra de Xai-Xai (POP2);
- 5 populações – corresponde a partição mais fina, em que cada secção de praia corresponde a uma população, sendo Ponta do Ouro (PO); Ponta Malongane (PMal); Ponta Dobela (PDob); Ponta Mucombo (PMuc) e Xai-Xai.

4.2.10 ESTIMATIVAS DE DIVERSIDADE GENÉTICA

As frequências alélicas de um fundo genético de uma determinada população permitem determinar a abundância de cada um dos alelos e são por isso o primeiro parâmetro representável que indica diferenças de diversidade genética entre populações. As principais variáveis para determinar a variabilidade alélica são: número de alelos distintos por *locus* para cada população (A) ou para todas as populações, número médio de alelos por *locus*, tamanho alélico modal (A_m), amplitude alélica (A_a), alelos privados (A_p) e riqueza alélica (R_s).

Os alelos privados (A privados) estão presentes exclusivamente numa população, normalmente com frequências baixas. Assim, estes alelos permitem melhorar a ligação

de um indivíduo a uma das populações amostradas, isto se existir uma estrutura evidente na população.

A riqueza alélica (R_s), também designada por diversidade alélica, é o número médio de alelos por *locus* numa população. Muitos estudos comparam o R_s entre amostras de tamanho diferente mas Leberg (2002) refere que é preciso ter atenção à existência de alelos raros que podem não ser detectados em amostras pequenas e por isso é importante standardizar a riqueza alélica. O cálculo da riqueza alélica foi feito no programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 1995) através da seguinte expressão (Petit *et al.*, 1998):

$$R_s = \sum_{i=1}^n \left[1 - \frac{\binom{2N - N_i}{2n}}{\binom{2N}{2n}} \right]$$

Assim, o cálculo da R_s baseia-se na estimativa do número de alelos diferentes numa subamostra $2n$ de uma amostra $2N$, sendo que $N \geq n$. Onde, n é definido como o menor número de indivíduos para um *locus* numa subamostra e N_i é o número de alelos de tipo i nos $2N$ genes. Cada termo do somatório corresponde à probabilidade de amostrar o alelo i pelo menos uma vez numa subamostra de tamanho $2n$. De seguida, estes dados foram comparados com os publicados nos estudos de Shamblin e colaboradores (2007, 2009).

Depois de calculadas as frequências alélicas por *locus* calculou-se a heterozigotia esperada (H_e) no Genetix 4.05 a um nível nominal de 0.05. A comparação da heterozigotia observada e a heterozigotia esperada podem indicar dinâmicas populacionais importantes. As frequências genotípicas de heterozigóticos (heterozigotia observada e heterozigotia esperada) da população amostrada podem ser comparadas com a de outras populações estudadas.

4.2.11 ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL

DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES (F_{ST})

Calculou-se a partição do déficit de heterozigóticos (F_{ST}) entre as praias de nidificação da RMPPO no programa Genepop 4.2 (Raymond & Rousset, 1995).

O F_{ST} representa variância entre subpopulações, onde S significa subpopulações e T população total. Assim, baseia-se na correlação das frequências alélicas dentro das subpopulações (H_S) relativamente às frequências alélicas da metapopulação (H_T).

$$F_{ST} = 1 - \frac{H_S}{2\bar{p}\bar{q}} \quad \text{ou} \quad F_{ST} = 1 - \frac{H_S}{H_T} \quad \text{ou} \quad F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

O F_{ST} varia de zero a um, sendo que quanto mais similar for as frequências alélicas das subpopulações, mais próximo será o valor da heterozigotia das subpopulações (H_S) e o valor da heterozigotia esperada da metapopulação, $2\bar{p}\bar{q}$, ou seja, o F_{ST} estará mais próximo do valor zero, o que significa a inexistência de estrutura populacional. Caso contrário, se cada população tiver fixado diferentes alelos, sendo o exemplo simplificado de uma subpopulação que possui apenas o alelo q e a outra subpopulação o alelo p, então a heterozigotia das subpopulações será zero, e conseqüentemente o F_{ST} será igual a 1, o que representa uma estruturação máxima da população.

ANÁLISE FACTORIAL DE CORRESPONDÊNCIA (AFC)

A Análise Factorial de Correspondência (AFC) foi feita no programa Genetix 4.05. O conceito de similaridade pelo método AFC baseia-se na distância χ^2 (uma variante da distância Euclideana), entre linhas ou entre colunas, das variáveis categóricas organizadas em tabelas de contingência, em vez de utilizar o coeficiente de correlação da análise de componentes principais (ACP).

A distância do χ^2 , para além da atenuação das coordenadas resultantes da ponderação, goza ainda da propriedade da equivalência distribucional, a qual permite substituir dois indivíduos de idêntico perfil por um único indivíduo de peso igual à soma dos pesos.

Em qualquer destes métodos são determinados, para cada eixo, coeficientes representativos da contribuição absoluta e relativa de cada variável (indivíduo,

população ou alelo). Os primeiros coeficientes exprimem a porção da inércia explicada por cada variável em relação a cada eixo principal, enquanto os segundos coeficientes indicam a parte da inércia de uma variável explicada pelo eixo principal.

Assim, após a escolha do número de eixos de inércia com base na análise do histograma dos valores próprios, atribuiu-se um significado aos eixos de inércia em termos das propriedades (ou indivíduos) que os explicam permitindo interpretar as relações entre indivíduos e propriedades com base no significado conferido aos eixos.

INFERÊNCIA BAYESIANA PARA DETERMINAR O NÚMERO DE POPULAÇÕES

A estrutura populacional foi determinada através do programa Structure 2.3 (Pritchard *et al.*, 2009) que emprega um método de agrupamento (*bayesian clustering*) para identificar a composição de um número K de populações, sem assumir nenhuma estrutura particular *a priori*.

O programa agrupa os indivíduos em k populações, de modo a que cumpram com o equilíbrio de Hardy-Weinberg e de ligação (*linkage*). No caso de detecção de estrutura populacional, a determinação do número mais provável de populações genéticas distintas foi feita através da estratégia descrita por (Evanno *et al.*, 2005) que emprega a estatística *ad hoc* Δk usando o programa Structure Harvester (Earl, 2012) .

Para o efeito foi definido:

- 3 Corridas (*runs*) para cada valor de K (1 a 6);
- Período de *burn-in* (*length of burn-in*) com comprimento de 100000;
- Cadeia de Monte Carlo via Cadeias de Markov com comprimento de 500000 gerações;
- Modelo de mistura populacional (*admixture model*);
- Frequências alélicas correlacionadas entre populações;
- Sem indicação da potencial populações de origem de cada indivíduo amostrado.

Para o modelo de mistura populacional, os indivíduos podem ter ascendência mista, ou seja um indivíduo pode herdar alguma fração do seu genoma de ancestrais da população k . Assim, o modelo permite associar a origem de cada alelo de forma independente a

um vector de ascendência condicional, $q(i)$. Este modelo é recomendado por ser flexível para lidar com as complexidades das populações reais, nomeadamente fluxo génico e zonas híbridas (Pritchard *et al.*, 2009).

Seguindo o mesmo esquema, foram realizadas corridas adicionais com a indicação do local de amostragem para cada individuo (opção *Loc Prior*; partição em duas e em 5 áreas de amostragem). Estas corridas permitem a eventual detecção de estruturação populacional mais subtil, não detectada na análise generalista, através da introdução de informação geográfica.

4.2.12 ESTIMATIVA DO EFECTIVO POPULACIONAL

O tamanho efectivo da população (N_e) é o tamanho ideal de uma população, ou seja, que atende a todos os pressupostos de Hardy-Weinberg, que iria perder heterozigotia a uma taxa igual à da população observada.

A estimativa do efectivo populacional das populações genéticas foi obtida através de dois programas, o ONeSAMP 1.2 (Tallmon *et al.*, 2008) e o LDNE (Waples & Do, 2008) com base na variação alélica dos microssatélites.

ONESAMP

O programa ONeSAMP 1.2 foi utilizado numa plataforma *online* (<http://genomics.jun.alaska.edu/>). Este programa utiliza uma computação Bayesiana aproximada para estimar o efectivo populacional com base nos genótipos dos microssatélites amostrados. Assim, introduziu-se os seguintes dados: número de indivíduos genotipados e os respectivos *loci*, motivo de repetição por locus que se encontra em equilíbrio de ligação, e informação complementar de diversos parâmetros da amostragem e biológicos, inclusive de prováveis tamanhos efectivos da população (dado o desconhecimento sobre este parâmetro o intervalo máximo foi utilizado: 2-10000).

Com base nestas informações, o programa ONeSAMP cria 50000 simulações de populações. Cada simulação da população possui um tamanho efetivo elaborado a partir de um número aleatório uniforme entre o N_e inferior e superior especificado. O

programa assume que cada população provém de uma população com um nível inicial de variabilidade genética determinado pelo *theta*, que é resultado do tamanho efectivo histórico e taxa de mutação (4μ). Dadas as inúmeras combinações possíveis, o valor de *theta* é determinado de forma aleatória para cada população a partir de um número aleatório uniforme entre dois a doze (Tallmon *et al.*, 2008). A estimativa do efectivo populacional é dado pelos limites credíveis para um intervalo de confiança de 95%.

LDNE

O programa LDNE versão 1.3.1 foi desenvolvido para estimar o tamanho efectivo da população (N_e) com base nos dados de desequilíbrio de ligação. O programa lê os dados genotípicas em formatos normalizados e pode acomodar um número arbitrário de amostras, indivíduos, *loci* e alelos, bem como de dois sistemas de acasalamento, a monogamia em série ou a monogamia permanente. Neste caso, seleccionou-se o modo monogamia em série.

O programa usa o método de Burrows, que não necessita de pré-suposições sobre acasalamento ao acaso, informações ou frequências haplotípica. A correção do enviesamento é feita através do método de Waples (2006). O LDNE calcula estimativas separadas usando diferentes critérios para a exclusão de alelos raros, o que facilita a avaliação de dados para os marcadores altamente polimórficos, como os microsatélites. Os intervalos de confiança foram determinados pelo método de Jackknife e pelos métodos paramétricos. O método de Jackknife aparenta ter melhor desempenho (Waples & Do, 2008).

Hill (1981) mostrou que o método aplicado pelo LDNE com base nos desequilíbrios de ligação tem baixa precisão, a não ser que os loci estejam fortemente ligados. No caso de haver forte associação entre os loci (desequilíbrio de ligação), a estimativa do N_e está fortemente associada a factores evolutivos antigos.

4.2.13 EVENTOS DEMOGRÁFICOS: BOTTLENECK

Para determinar a história demográfica da população da RMPPO, foram comparadas as distribuições alélicas observadas com as distribuições alélicas esperadas assumindo o equilíbrio de deriva genética e mutação e a variação neutral. Para o efeito, foi assumido

que a população não possui subestruturação, nem imigração e os loci não estão em desequilíbrio linkage e não possuem alelos nulos (Cornuet & Luikart, 1996).

No programa Bottleneck v1.2.02 (<http://www.ensam.inra.fr/URDC>; Cornuet and Luikart, 1996) calculou-se a heterozigotia esperada (H_e) considerando o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o equilíbrio esperado considerando o equilíbrio de deriva genética e mutação para cada locus. O nível de significância do número de loci com excesso ou deficiência de diversidade genética (heterozigotia) foi determinado pelo teste de *Wilcoxon sign-rank* (Luikart & Cornuet, 1998) e a descrição qualitativa da distribuição de frequências alélicas (*mode-shift indicator*).

As simulações de detecção de bottleneck foram feitas através do modelo de duas fases de mutação (TPM: Two-phase mutation model), pois para as tartarugas marinhas foram observadas, embora com menor frequência, mutações que envolvem mais do que uma unidade de repetição (Hoekert *et al.*, 2002). Assim, para o TPM considera-se que o processo de mutação conduz a adição de uma unidade de repetição com a probabilidade **p1** (*proportion of single mutation*) e a adição de várias unidades de repetição com a probabilidade p2 também designado por **Pg** (*proportion of multi-step mutations*; Di Rienzo *et al.*, 1994).

Alguns estudos estimam os valores para o pg e para o tamanho médio das mutações multi-passos **dg** (*the mean size of multi-step mutations*), como por exemplo:

Tartarugas gigantes: $p1=0.95$, $Pg = 0.05$ (Rivalan *et al.*, 2006);

Tartarugas oliváceas: $p1= 0.73$, $Pg = 0.27$ e $dg = 3.3$ (Hoekert *et al.*, 2002); e $p1= 0.90$ a 0.44 , $Pg = 0.10$ a 0.57 e o $dg = 3.1$ a 4.0 (Rodríguez-Zárate *et al.*, 2013);

Tartarugas verdes: $Pg = 0.57$, $dg = 4.0$ (Fitzsimmons, 1998)

Recomendação geral para os microssatélites: $p1=0.95$, $Pg = 0.05$ e variância do TPM =12 (Piry *et al.*, 1999).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 TAMANHOS DAS SEQUÊNCIAS, DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA E NUCLEOTÍDICA

Das 63 amostras de tartarugas cabeçadas colhidas na RMPPPO, amplificou-se um fragmento mitocondrial da região controlo em 61 amostras (apenas as amostras 455 e 475 não amplificaram).

As sequências obtidas apresentaram entre 707 a 815 nucleótidos que, depois de analisadas e comparadas manualmente no programa BioEdit, permitiram obter um fragmento de 642 pares de base em todas as amostras, a partir do qual se obtiveram as estimativas de diversidade genética e relações evolutivas entre haplótipos.

Destas sequências, 60 corresponderam ao haplótipo CCA2.1, descrito pela primeira vez em populações do Atlântico (Monzón-Argüello, 2010). A amostra T485, recolhida em Mucombo, da tartaruga com marcador MZ1248 apresentou uma nova mutação pontual, uma transição de um par de base, guanina para adenina (Figura 4.11) na posição do nucleótido 613 da sequência de referência CCA2.1 (EU179445; Figura 4.12). O haplótipo assim definido, temporariamente designado por CC-II, não tem correspondente nas bases de dados consultadas, parecendo ser exclusivo da população nidificante na RMPPPO.

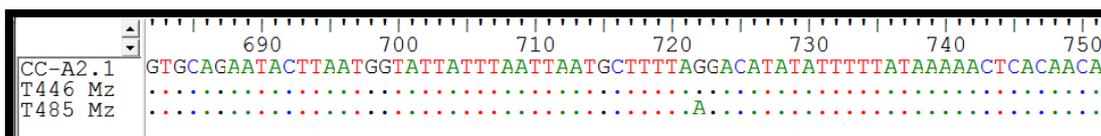


Figura 4.11 - Comparação das sequências de ADN mitocondrial de Moçambique (Mz) e do haplótipo CC-A2.1 para evidenciar a única mutação encontrada (transição) na amostra T485 (a posição indicada, nucleótido 722, refere-se à posição no alinhamento do conjunto das sequências obtidas neste trabalho; a posição da nova mutação nos haplótipos de referência, nucleótido 613, é indicana na Figura 4.10).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1301 bits(704)	0.0	706/707(99%)	0/707(0%)	Plus/Plus
Query 1	TGCCCAACAGAATAATCCATAAATACCTATCTATGTATTATCGTACATCAACTTATTTA	60		
Sbjct 109	TGCCCAACAGAATAATCCATAAATACCTATCTATGTATTATCGTACATCAACTTATTTA	168		
Query 61	CCACTAGCATATGATCAGTAATGTTGTCGATTAATCTGACCTTAAACATAAAAACTATTA	120		
Sbjct 169	CCACTAGCATATGATCAGTAATGTTGTCGATTAATCTGACCTTAAACATAAAAACTATTA	228		
Query 121	ATTTTGATAAACTGTTTTAGTTACATGACTATTATACAGGTAATAGGAATGAAATGATA	180		
Sbjct 229	ATTTTGATAAACTGTTTTAGTTACATGACTATTATACAGGTAATAGGAATGAAATGATA	288		
Query 181	TAGGACATAAAATTAACCAATTATTCTCAACCATGAATATCGTTACAGTAATAGGTTATT	240		
Sbjct 289	TAGGACATAAAATTAACCAATTATTCTCAACCATGAATATCGTTACAGTAATAGGTTATT	348		
Query 241	TCTTAGTTCAGCTCATCACGAGAAAATAAGCAATCCTTGTAGTAAGATACAATATTACCA	300		
Sbjct 349	TCTTAGTTCAGCTCATCACGAGAAAATAAGCAATCCTTGTAGTAAGATACAATATTACCA	408		
Query 301	GTTTCAAGTCCATTAAAGTCATGTCGTACATAACTGATCTATTCTGGCTCTGGTTGGTTT	360		
Sbjct 409	GTTTCAAGTCCATTAAAGTCATGTCGTACATAACTGATCTATTCTGGCTCTGGTTGGTTT	468		
Query 361	TTTCAGGCACATTAAAGGCAGTAAAGTTCATTGTTCTCTTTAAAAGGCCCTGGTTGCA	420		
Sbjct 469	TTTCAGGCACATTAAAGGCAGTAAAGTTCATTGTTCTCTTTAAAAGGCCCTGGTTGCA	528		
Query 421	AGTAAATGAGTTCATACATTAATAATTATAACCTGGCATACGGTGGTTTACTTGCATGT	480		
Sbjct 529	AGTAAATGAGTTCATACATTAATAATTATAACCTGGCATACGGTGGTTTACTTGCATGT	588		
Query 481	GGTAGTCTTTTTTCTCTTTGTGTTCTCAGGCCACATAACTGATACCTGCCGAATTGA	540		
Sbjct 589	GGTAGTCTTTTTTCTCTTTGTGTTCTCAGGCCACATAACTGATACCTGCCGAATTGA	648		
Query 541	TGAAACTGAGCCTACGTTCAAAATGATTGGCCGTGCAGAACTTAATGGTATTATTTAA	600		
Sbjct 649	TGAAACTGAGCCTACGTTCAAAATGATTGGCCGTGCAGAACTTAATGGTATTATTTAA	708		
Query 601	TTAATGCTTTTACACATATATTTTTATAAAAACTCACAAACAGTTATTTACAAGCTAAAA	660		
Sbjct 709	TTAATGCTTTTACACATATATTTTTATAAAAACTCACAAACAGTTATTTACAAGCTAAAA	768		
Query 661	CCCATTACAACCATACTTTTTAGTTAAACCCCCCACCCTTAAAC 707			
Sbjct 769	CCCATTACAACCATACTTTTTAGTTAAACCCCCCACCCTTAAAC 815			

Figura 4.12 - Alinhamento da sequência T485 (designada por *Sbjct*) e do haplótipo CC-A2.1 (EU179445, designada por *Query*) para evidenciar o local real da mutação (Imagem da análise da similaridade entre as duas sequências no Genebank).

No seu conjunto, a média da diversidade esperada por nucleótido (θ) foi de 0,00033, o número médio de diferenças entre nucleótidos por sítio entre duas sequências (diversidade nucleotídica; π) foi de 0.00005 e a diversidade haplotípica (h) de 0.033 (Tabela 5.1). Estas estimativas da diversidade haplotípica e nucleotídica são menores do que as encontradas para outras populações nidificantes de tartarugas cabeçudas do Mediterrâneo, em que a diversidade haplotípica variou de 0.083 a 0.481 e a diversidade nucleotídica variou de 0.00010 a 0.00056 (Yilmaz *et al.*, 2011).

No entanto, Shamblin *et al.* (2014) reportaram uma variação da diversidade haplotípica de 0 a 0.819 tendo em consideração 42 áreas de nidificação. A maior diversidade haplotípica em populações de tartaruga cabeçuda foi reportada para a área de nidificação de Quintana Roo (México) e a mais baixa, isto é, com um único haplótipo, para as áreas de nidificação da África do Sul (Índico Sudoeste), Omã (Índico Norte), Ilha Cape na Carolina-do-Sul e Ilha Ossabaw na Georgia nos EUA (Atlântico Nordeste) e Alagadi-Ciprus (Mediterrâneo).

Tabela 4.4 - Diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica para tartarugas cabeçudas por região

Espécies	Região		Nr ind.	Haplótipos	h	π	Referência
Tartaruga cabeçuda	Índico Sul	RMPPPO	61	2 (do HGII) CC-A2.1 e CC-I1	0.033	0.00005	O presente estudo
		Kwazulu-Natal	181	1 (do HGII) CC-A2.1	0.000	0.000	Bowen <i>et al.</i> (1994) Shamblin <i>et al.</i> (2014)
	Índico Norte	Omã	7	1 (do HGIIb) CC-A11.6	0.000	0.000	Bowen <i>et al.</i> (1994) Shamblin <i>et al.</i> (2014)
	Mediterrâneo	Mediterrâneo Oeste (Dalyan)	40	2 (do HGII) CC-A2.1 e CC-A3.1	0.481	0.00056	Yilmaz <i>et al.</i> (2011)
		Centro do Mediterrâneo (Tekirova, Belek, Kızılot e Gazipasa)	48	2 (do HGII) CC-A2.1 e CC-A3.1	0,083	0.00010	Yilmaz <i>et al.</i> (2011)
		Mediterrâneo Este (Anamur, Göksu Delta, Alata, Kazanlı, Akyatan, Agyatan e Samandag)	68	5 (do HGII) CC-A2.1 é dominante.	0.297	0.00041	Yilmaz <i>et al.</i> (2011)
	Atlântico Norte Oeste	Cape Island, Carolina-Sul, USA	52	1(do HGIIa) CC-A1.1	0.000	0.000	Shamblin <i>et al.</i> (2011) Shamblin <i>et al.</i> (2012)
		México (Ilha Cozumel, Quintana Roo)	154	16 (HGIIa e HGII)	0.819		Shamblin <i>et al.</i> (2012)
	Atlântico Sul Este	Brasil (Rio de Janeiro)	49	2 (HGII)	0.306		Reis <i>et al.</i> (2010) Shamblin <i>et al.</i> (2014)
	Atlântico Norte Este	Cabo Verde (Boa Vista)		9 (HGIIa e HGII)	0.579		Reis <i>et al.</i> (2010) Shamblin <i>et al.</i> (2014)

4.3.2 RELAÇÃO ENTRE OS HAPLÓTIPOS MAIS PRÓXIMOS DO HAPLÓTIPO DOMINANTE DO SUL DE MOÇAMBIQUE (HAPLÓTIPO CC-A2.1)

O haplótipo CC-A2.1 representa 98.3% das tartarugas amostradas. Este haplótipo também está presente nas populações nidificantes do Mediterrâneo, Índico Sul e Atlântico Nordeste (Shamblin *et al.*, 2014).

Uma vez que a população amostrada apresentou quase exclusivamente o haplótipo CC-A2.1, foi efectuada uma rede com os 29 haplótipos já descritos e que diferem do CC-A2.1 por uma a quatro mutações (Anexo 2). Estes haplótipos pertencem ao haplogrupo II (HGII).

As sequências seleccionadas para o desenho da rede têm cerca de 761 pares de bases. No entanto, para esta análise apenas se consideraram 758 pares de bases, correspondentes aos nucleótidos equivalentes entre todas as sequências consideradas. As relações entre os haplótipos foram representadas através da rede de haplótipos da Figura 4.13. Cada haplótipo do HGII foi associado às regiões onde foram reportados (Monzón-Argüello *et al.*, 2010; Shamblin *et al.*, 2012, 2014; Clusa *et al.*, 2013). No entanto, não foi considerada a frequência do haplótipo, pois apenas se pretende representar a proximidade entre as populações nidificantes de Moçambique/África do Sul, Mediterrâneo, Atlântico Noroeste e Atlântico Nordeste.

O padrão de ramificação em estrela a partir do haplótipo CC-A2.1 evidencia o carácter ancestral deste haplótipo, a partir do qual se terão originado os outros haplótipos (Figura 4.13).

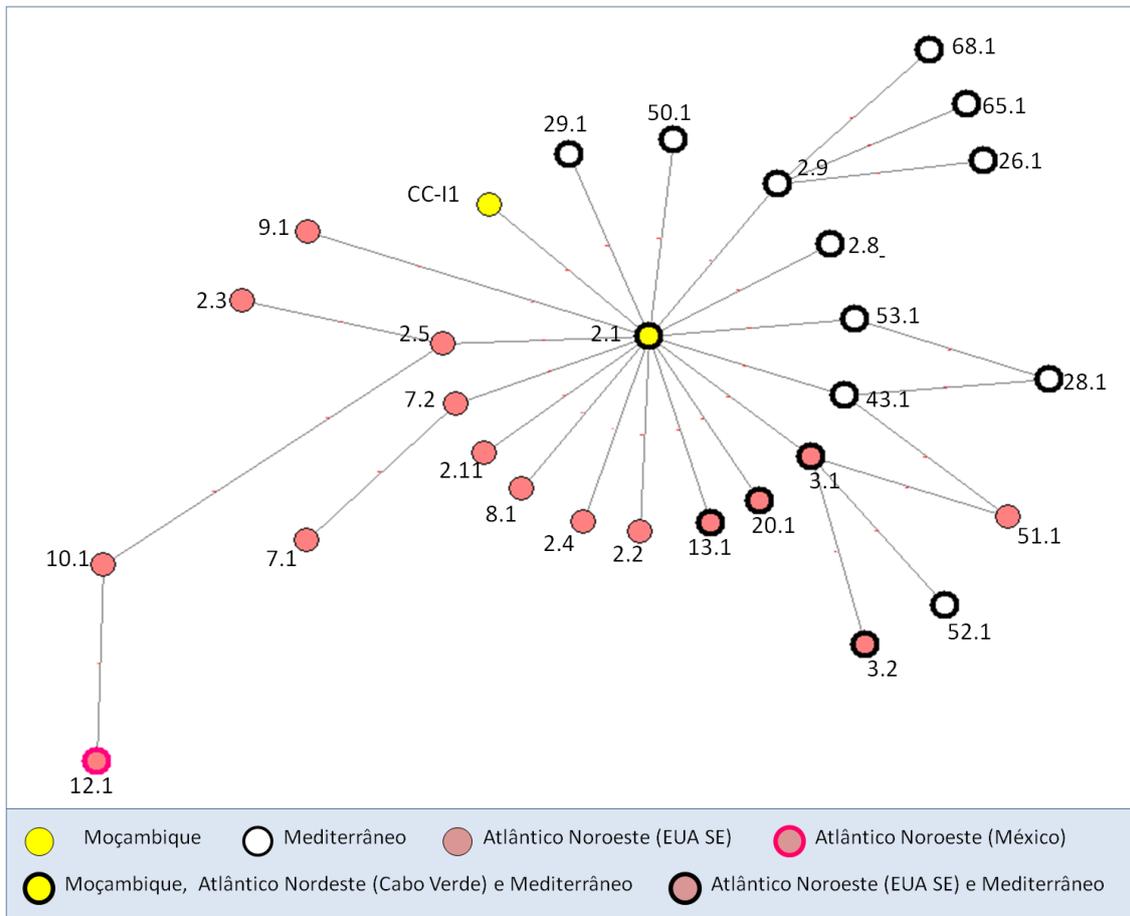


Figura 4.13 - Rede de 29 haplótipos de tartarugas cabeçadas (CC-A) com 1 a 4 mutações (pontos vermelhos) em relação ao haplótipo CC-A2.1. A representação dos círculos não é proporcional à frequência dos haplótipos.

4.3.3 RELAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DE POPULAÇÕES NIDIFICANTES NO OCEANO ÍNDICO, ATLÂNTICO E PACÍFICO

Para a análise da dispersão de haplótipos à escala global, fez-se a análise inicial dos 79 haplótipos presentes nas bases de dados (Anexo 3). Uma vez que as sequências disponíveis dos haplótipos do Pacífico e Omã apresentam cerca de 659 pares de bases, excluiu-se os sítios para os quais não existe informação equivalente entre as sequências. Com a exclusão desses sítios, as sequências passaram a ter apenas 477 pares de bases. Esta exclusão de nucleótidos resultou na perda de sítios informativos (mutações que permitiam distinguir diferentes haplótipos), tornando alguns haplótipos indistinguíveis, inclusive o CC-II. Na Figura 4.14, é apresentada uma rede simplificada, constituída pelos 23 haplótipos curtos (Anexo 4), que evidencia os 3 haplogrupos: HGII, HG1a e

HGIb. Esta rede mostra a partilha e isolamento de haplótipos entre os seguintes grupos regionais: Atlântico Nordeste, Atlântico Noroeste, Mediterrâneo, Índico Norte, Índico Sul e Pacífico (Shamblin *et al.*, 2014).

Entre os haplótipos CC-A2.1 (no HGII) e o haplótipo CCP2 (HGIa) foram identificados 20 sítios com variabilidade, e entre o haplótipo CC-A2.1 e o haplótipo CC-A11.6 foram identificados 27 sítios com variabilidade.

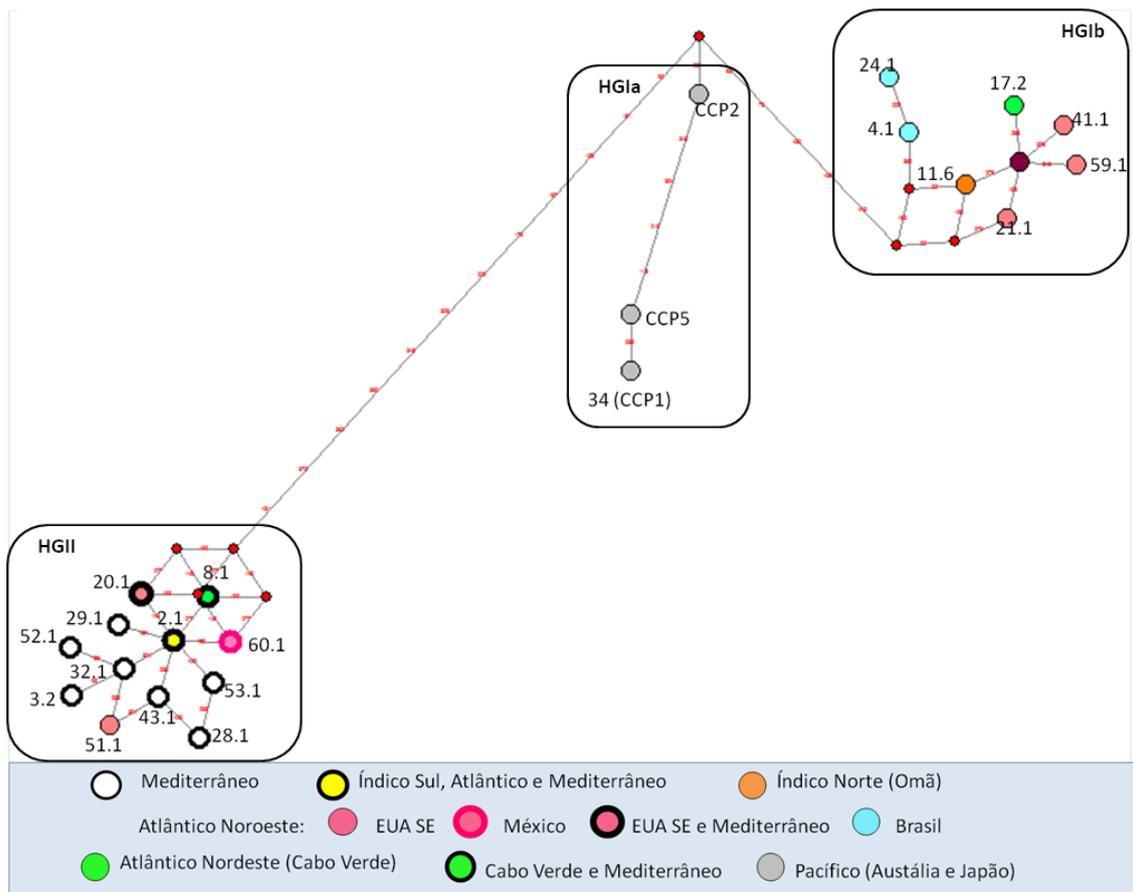


Figura 4.14 - Rede dos haplótipos de tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*) definidos a partir da análise de seqüências mitocondriais da região controlo com 477 pares de bases. O alinhamento com haplótipos curtos resultou na perda de parte da informação, incluindo a que permitia distinguir o novo haplótipo CC-I1 que foi encontrado na RMPPO. Cada ponto vermelho representa uma mutação. A representação dos círculos não é proporcional à frequência dos haplótipos. Os círculos vermelhos representam haplótipos não amostrados.

4.3.4 CARACTERÍSTICAS DOS *LOCI* DE ADN NUCLEAR

Das 63 amostras de tartarugas cabeçadas foram excluídas *a priori* 6 amostras (T455, T473, T475, T499, T500 e T501) por não terem amplificado para nenhum dos mixes. A amplitude alélica para os *loci* variou entre um mínimo de 134pb (Cc5F01) e um máximo de 424pb (CcP1F09) para N tartarugas cabeçadas genotipadas (Tabela 4.5). Assim, observou-se que os *loci* analisados foram polimórficos e o número total de alelos variou entre 2 (CcP7H10 e CcP5C11) e 27 (CcP8D06), com média de 9.95 alelos por locus. Shamblin e colaboradores (2007; 2009) reportaram os 21 loci como sendo tetranucleotídeos, mas nalguns casos neste estudo encontraram-se alguns padrões de mutações imperfeitos (nos loci Cc1B03, Cc1F01, Cc5H07, CcP2F11, Cc2G10 e CcP8D06).

Tabela 4.5 - Características da variabilidade alélica por *locus* em tartarugas cabeçadas nidificantes na RMPPPO. N- número de indivíduos genotipados, A- Número de alelos; AA-Amplitude alélica.

Locus	Motivo de repetição*	N	A	AA	EUA-SE*	
					A	AA
1 Cc1B03	(ATCT)15	55	12	287-329	13	264-314
2 Cc1F01	(ATCT)15	54	12	308-360	13	308-360
3 Cc1G02	(ATCT)9	55	12	270-314	14	262-322
4 Cc1G03	(AGAT)20	54	12	282-330	12	276-328
5 Cc2G10	(CTTT)16	56	13	269-309	21	261-326
6 Cc2H12	(AAAG)1... (AGGGC)9	55	9	295-395	13	294-357
7 Cc5C08	(CTTT)18	56	11	285-341	13	281-333
8 Cc5F01	(CTTT)13	56	11	134-182	21	137-191
9 Cc5H07	(CTTT)16	55	11	220-260	11	215-263
10 Cc7B07	(ATCT)18	54	19	231-311	16	223-299
11 Cc7C04	(AGAT)11	55	6	208-228	14	202-250
12 Cc7G11	(AGAT)14	56	7	181-213	11	282-322
13 CcP1F09	(ATCT)18	53	4	404-424	9	417-461
14 CcP2F11	(AAAG)15	54	16	270-328	18	268-312
15 CcP5C11	(AAAG)7	54	2	182-186	4	176-188
16 CcP7C06	(ATCT)15	56	4	278-302	10	274-314
17 CcP7C08	(ATCT)6	56	4	292-344	8	290-322
18 CcP7D04	(AGAT)17	54	10	347-387	14	343-395
19 CcP7F06	(ATCT)13	56	5	254-282	8	254-298
20 CcP7H10	(AGAT)7	55	2	203-207	6	203-223
21 CcP8D06	(CTTT)19...(CTTT)4...(CTTT)5	54	27	294-368	24	291-395

*Os dados referentes à população EUA-SE são de Shamblin *et al.*, 2007 (Loci 1 a 12; N=30) e de Shamblin *et al.*, 2009 (Loci 13 a 21; N=22)

Observou-se que a distribuição dos alelos por locus não segue a distribuição normal (Figura 4.15).

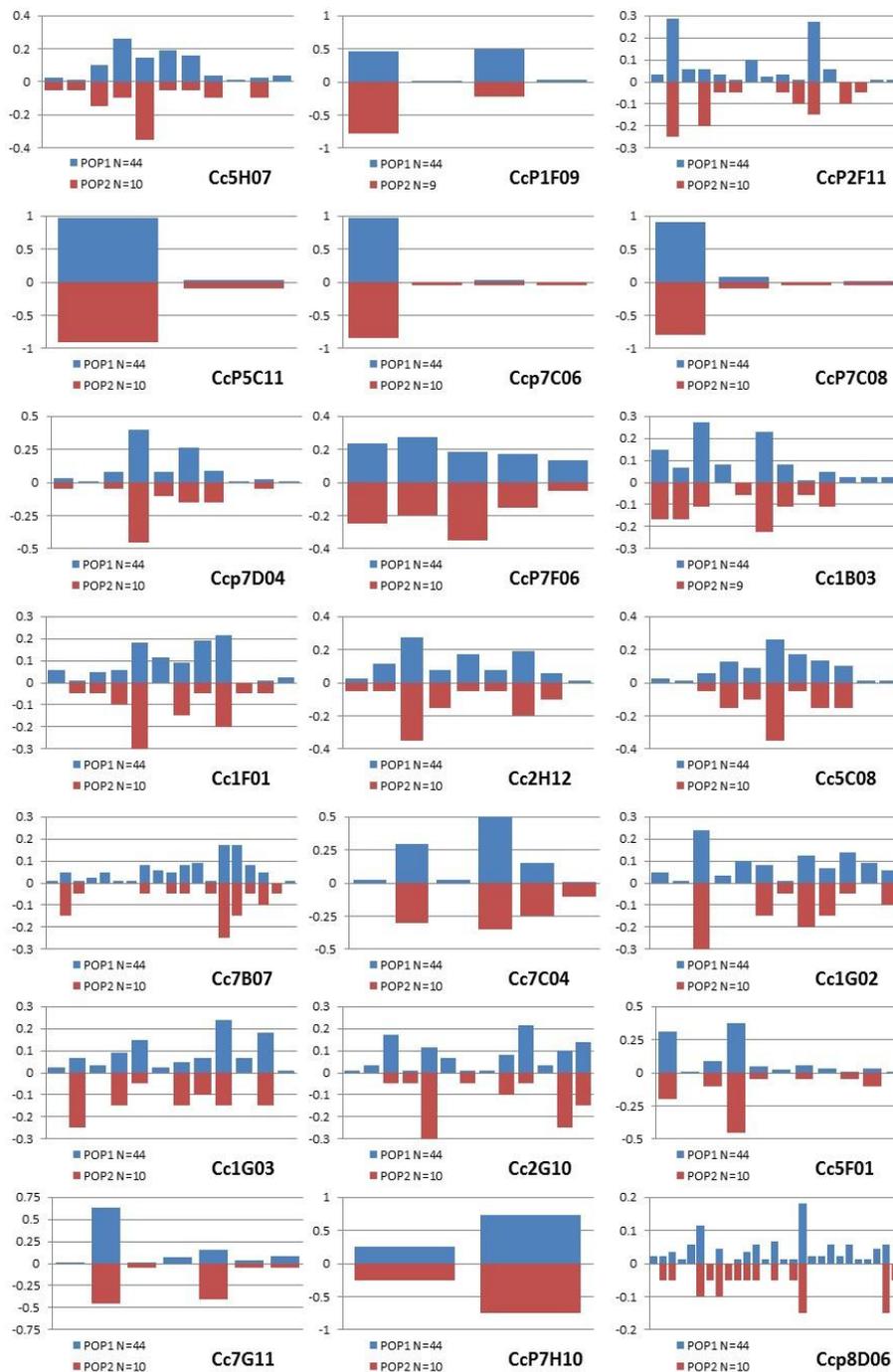


Figura 4.15 - Frequência alélica para cada *locus*, incluindo os alelos nulos para dois grupos, sendo o POP1 correspondente às secções de praia entre a Ponta do Ouro à Ponta Dobela (grupo mais a Sul) e a POP2 correspondente a secção de praia entre a Ponta Mucombo a Ponta Abril e incluindo uma amostra de Xai-Xai (grupo mais a Norte; ver localizações na figura 3.3). O eixo dos x representa os alelos e o eixo y, a frequência alélica para o tamanho do grupo (N).

4.3.5 CONTROLO DA QUALIDADE DOS DADOS RECOLHIDOS

EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E EQUILIBRÍO DE LIGAÇÃO

As amostras T503 e T507 foram eliminadas das análises por não terem genótipos para 40% dos *loci*.

Os loci CcP1F09, CcP2F11, Cc1B03, Cc5C08, Cc7B07, Cc1G02, Cc1G03, Cc2G10, Cc5F01 e Cc7G11 apresentaram um FIS (Weir & Cockerham) positivo, indicando tendência de excesso de homozigóticos. Os loci Cc2G10, Cc7G11 e CcP2F11 encontram-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4.6).

No entanto, apenas o locus CCP2F11 não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni, ou seja rejeita a hipótese nula de existir um défice de heterozigóticos.

O desequilíbrio de ligação foi significativo ($P < 0.05$) em 18 comparações de pares de *loci* (*pairwise comparisons*) para um total de 210 comparações. No entanto, nenhum par de *loci* encontrou-se em desequilíbrio de ligação após a correção de Bonferroni. Assim, todos os *loci* podem ser considerados como geneticamente independentes.

Tabela 4.6 - Estimativas do valor-P do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H1= Déficit de heterozigóticos). Os *locus* que não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg antes da correção de Bonferroni estão a vermelho. Após a correção apenas o *locus* CCP2F11 permanece em desequilíbrio de Hardy-Weinberg (SI – sem informação).

	Locus	1 População	2 Populações		5 Populações				
		RMPPPO	PO e P _{Mal}	P _{Muc} e Xai-Xai	PO	P _{Mal}	P _{Dob}	P _{Muc}	Xai-Xai
1	Cc1B03	0.3302	0.4655	0.2081	0.205	0.5767	0.189	1.000	SI
2	Cc1F01	0.8268	0.7701	0.7831	1.000	0.8167	0.681	0.200	
3	Cc1G02	0.5261	0.5306	0.5112	1.000	0.5452	0.700	0.601	
4	Cc1G03	0.1258	0.4081	0.0928	0.425	0.3881	0.304	1.000	
5	Cc2G10	0.0489	0.0250	1.0000	0.368	0.0219	1.000	1.000	
6	Cc2H12	0.8412	0.7863	0.8698	1.000	0.565	0.794	1.000	
7	Cc5C08	0.2553	0.1711	0.8704	0.296	0.1231	0.903	1.000	
8	Cc5F01	0.1790	0.1608	0.1149	0.367	0.1821	0.120	SI	
9	Cc5H07	0.9937	0.9888	1.0000	1.000	0.957	1.000	1.000	
10	Cc7B07	0.1358	0.0673	0.3462	0.546	0.0424	0.159	1.000	
11	Cc7C04	0.4914	0.8921	0.0531	0.910	0.8319	0.050	0.466	
12	Cc7G11	0.0412	0.0583	0.4243	0.685	0.0318	0.608	1.000	
13	CcP1F09	0.4132	0.5597	1.0000	1.000	0.2242	1.000	1.000	
14	CcP2F11	0.0000	0.0179	0.0077	0.963	0.0303	0.024	0.201	
15	CcP5C11	1.0000	1.0000	1.0000	SI	1.0000	1.000	SI	
16	CcP7C06	1.0000	1.0000	1.0000	1.000	SI	1.000	SI	
17	CcP7C08	1.0000	1.0000	1.0000	SI	1.0000	1.000	SI	
18	CcP7D04	0.7667	0.7595	0.4436	1.000	0.6727	0.412	0.601	
19	CcP7F06	0.9205	0.8614	0.7440	1.000	0.7909	0.721	0.600	
20	CcP7H10	0.9333	0.8687	1.0000	1.000	0.7503	1.000	No	
21	CcP8D06	0.7816	0.8615	0.1153	1.000	0.7457	0.215	1.000	

DETECÇÃO DE ALELOS NULOS - ERROS DE GENOTIPAGEM

Através do programa Microchecker, que estima se a diferença entre as frequências observadas e esperadas, de acordo com a simulação, é significativa, reconfirmou-se o excesso de homozigóticos para o *locus* CCP2F11 (Figura 4.16 e Figura 4.17). O programa associou este excesso à existência de alelos nulos. Assim, para não enviesar os resultados optou-se por removê-lo das análises posteriores. Portanto, após o controlo de qualidade dos dados o conjunto final é de 20 *loci* genotipados em 54 indivíduos.

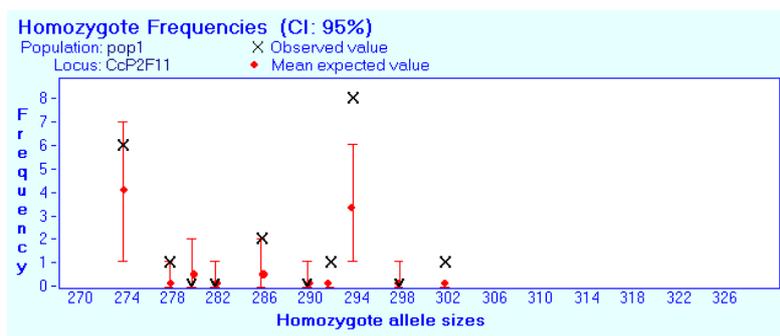


Figura 4.16 - Frequências esperadas (círculo vermelho) e observadas (cruz) de homozigóticos para cada alelo do *locus* CcP2F11.

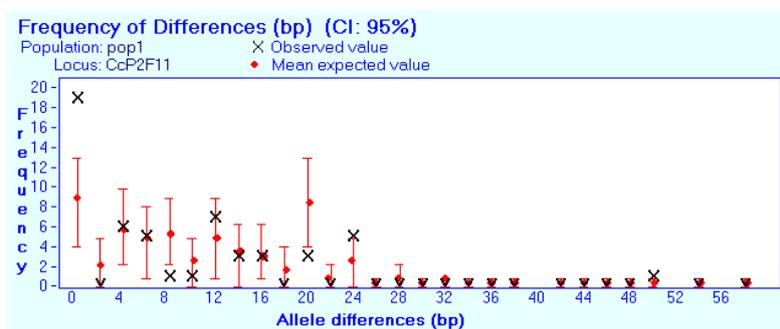


Figura 4.17 - Frequências esperadas (círculo vermelho) e observadas (cruz) de homozigóticos para cada número de diferenças entre os alelos do *locus* CcP2F11. Tratando-se de um *locus* dinucleotídeo, as diferenças são de dois em dois pares de bases (bp).

4.3.6 ESTIMATIVAS DE DIVERSIDADE GENÉTICA: RIQUEZA ALÉLICA, HETEROZIGOTIA ESPERADA E HETEROZIGOTIA OBSERVADA

As análises que se segue foram feitas para os 20 *loci* de 54 tartarugas *cabeçudas* genotipadas que se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação.

NÚMERO DE ALELOS E AMPLITUDE ALÉLICA

Os microssatélites estudados apresentaram baixo polimorfismo, variando de 2 (CcP5C11 e CcP7H10) a 27 (CcP8D06) alelos por *locus* e uma média de 9,7 alelos ($\pm 6,0$ DP) por *loci* para a população de fêmeas nidificantes na RMPPO. A título de comparação, na população do Sudeste dos EUA o número de alelos variaram de 4 (CcP7C06) a 24 (CcP8D06) e uma média de 12,9 ($\pm 5,5$ DP; Shamblin *et al.*, 2007; 2009). A única amostra recolhida em Xai-Xai, não apresentou alelos privados e por isso manteve-se nas análises feitas para a população da RMPPO.

Tabela 4.7 - Número de alelos para cada um dos 20 loci (RMPPO – todas as amostras; PO -Ponta do Ouro; PMal – Ponta Malongane; P Dob – Ponta Dobela; PMuc – Ponta Mucombo, Xai-Xai e EUA-SE – Sudeste dos Estados Unidos da América).

		1 População	2 Populações		5 Populações					EUA-SE*
Locus		RMPPO	PO PMal	PMuc e Xai-Xai	PO	PMal	P Dob	PMuc	Xai-Xai	
1	Cc1B03	12	11	8	4	11	4	7	2	13
2	Cc1F01	12	11	9	3	9	10	9	2	13
3	Cc1G02	12	12	7	4	11	9	7	1	14
4	Cc1G03	12	12	7	5	12	7	7	1	12
5	Cc2G10	13	13	8	5	11	8	8	2	21
6	Cc2H12	9	9	8	4	8	7	8	2	13
7	Cc5C08	11	11	7	3	9	8	5	2	13
8	Cc5F01	11	11	7	2	10	5	7	2	21
9	Cc5H07	11	11	9	5	10	5	8	2	11
10	Cc7B07	19	18	11	5	16	9	11	2	16
11	Cc7C04	6	6	4	3	6	4	4	2	14
12	Cc7G11	7	7	5	3	5	5	5	1	11
13	CcP1F09	4	4	2	3	4	2	2	2	9
15	CcP5C11	2	2	2	1	2	1	2	1	18
16	CcP7C06	4	2	4	1	2	2	4	1	4
17	CcP7C08	4	3	4	2	3	2	4	1	10
18	CcP7D04	10	10	7	4	9	7	6	2	14
19	CcP7F06	5	5	5	4	5	4	5	2	8
20	CcP7H10	2	2	2	2	2	2	2	1	6
21	CcP8D06	27	24	14	6	22	9	14	2	24
Média		9.7	9.2	6.5	3.5	8.4	5.5	6.3	1.7	12.9
Desvio padrão		6.0	5.6	3.1	1.4	5.0	2.8	3.0	0.5	5.5

*Os dados referentes à população EUA-SE são de Shamblin *et al.*, 2007 (*Loci* de 1 a 12) e de Shamblin *et al.*, 2009 (*Loci* de 13 a 21)

RIQUEZA ALÉLICA

Ao subdividir a população os valores da riqueza alélica são ligeiramente mais baixos do que em relação a uma população porque o número de amostras por cada grupo é muito reduzido (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 - Riqueza alélica (RMPP0 – todas as amostras; PO -Ponta do Ouro; PMal – Ponta Malongane; PDob –Ponta Dobela; PMuc –Ponta Mucombo e Xai-Xai)

	Locus	1 População	2 Populações		5 Populações				
		RMPP0	PO e PMal	PMuc e Xai-Xai	PO	PMal	PDob	PMuc	Xai-Xai
1	Cc1B03	12.00	7.25	8.00	1.87	1.85	1.78	1.90	2.00
2	Cc1F01	11.98	7.50	8.50	1.73	1.86	1.95	1.89	2.00
3	Cc1G02	11.98	8.39	6.80	1.80	1.88	1.92	1.88	1.00
4	Cc1G03	11.98	8.12	6.90	1.93	1.88	1.80	1.87	1.00
5	Cc2G10	12.96	8.11	7.60	1.93	1.87	1.93	1.85	2.00
6	Cc2H12	8.98	6.76	7.60	1.80	1.83	1.90	1.86	2.00
7	Cc5C08	10.94	7.27	6.80	1.60	1.85	1.89	1.80	2.00
8	Cc5F01	10.96	6.14	6.69	1.33	1.77	1.67	1.77	2.00
9	Cc5H07	10.98	6.95	8.58	1.93	1.85	1.85	1.86	2.00
10	Cc7B07	18.91	9.96	10.30	1.93	1.91	1.90	1.92	2.00
11	Cc7C04	6.00	3.90	4.00	1.80	1.63	1.71	1.77	2.00
12	Cc7G11	6.98	4.45	4.70	1.60	1.53	1.70	1.68	1.00
13	CcP1F09	4.00	2.71	2.00	1.73	1.55	1.50	1.33	2.00
15	CcP5C11	2.00	1.50	2.00	1.00	1.09	1.00	1.21	1.00
16	CcP7C06	3.96	1.50	3.70	1.00	1.03	1.26	1.31	1.00
17	CcP7C08	3.98	2.02	3.80	1.33	1.17	1.14	1.40	1.00
18	CcP7D04	9.94	5.96	6.70	1.80	1.74	1.86	1.77	2.00
19	CcP7F06	5.00	4.90	4.90	1.80	1.79	1.78	1.79	2.00
20	CcP7H10	2.00	2.00	2.00	1.33	1.40	1.44	1.43	1.00
21	CcP8D06	26.85	11.60	12.99	2.00	1.94	1.92	1.97	2.00
Média		9.62	5.85	6.23	1.66	1.67	1.70	1.71	1.65
Desvio padrão		5.96	2.90	2.87	0.30	0.29	0.28	0.24	0.49

*Os dados referentes à população EUA-SE são de Shamblin et al., 2007 (Loci de 1 a 12) e de Shamblin et al., 2009 (Loci de 13 a 21).

DIVERSIDADE GENÉTICA: HETEROZIGOTIA ESPERADA E HETEROZIGOTIA OBSERVADA

Os valores de heterozigotia esperada ou diversidade genética para a população da RMPPO variaram de 0.088 (CcP5C11) a 0.927 (CcP8D06) sendo a média de 0.675 (± 0.271 DP; Tabela 4.9). Para o Sudeste dos EUA variou de 0.620 (CcP5C11) a 0.940 (Cc2G10) sendo a média de 0.862 (± 0.092 DP; Shamblin *et al.*, 2007; 2009).

Tabela 4.9 - Diversidade genética: heterozigotia observada (Ho) e heterozigotia esperada (He) por locus. (RMPPO – todas as amostras; PO -Ponta do Ouro; PMal – Ponta Malongane; PDob –Ponta Dobela; PMuc –Ponta Mucombo e Xai-Xai e EUA-SE – Sudeste dos Estados Unidos da América).

Locus		1 População		2 Populações				EUA-SE*	
		RMPPO		PO e PMal		PMuc e Xai-Xai			
		Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He
1	Cc1B03	0.830	0.842	0.841	0.831	0.778	0.852	0.867	0.868
2	Cc1F01	0.907	0.857	0.909	0.853	0.900	0.825	0.933	0.904
3	Cc1G02	0.870	0.869	0.886	0.872	0.800	0.810	0.900	0.938
4	Cc1G03	0.815	0.868	0.841	0.862	0.700	0.835	0.933	0.911
5	Cc2G10	0.833	0.873	0.796	0.869	1.000	0.805	0.900	0.940
6	Cc2H12	0.889	0.828	0.886	0.830	0.900	0.795	0.967	0.880
7	Cc5C08	0.833	0.840	0.818	0.846	0.900	0.795	0.933	0.925
8	Cc5F01	0.648	0.749	0.636	0.749	0.700	0.730	0.933	0.930
9	Cc5H07	0.963	0.847	0.955	0.833	1.000	0.815	1.000	0.889
10	Cc7B07	0.833	0.902	0.818	0.902	0.900	0.865	0.963	0.917
11	Cc7C04	0.685	0.660	0.727	0.640	0.500	0.715	0.962	0.895
12	Cc7G11	0.519	0.586	0.500	0.557	0.600	0.630	0.869	0.874
13	CcP1F09	0.528	0.535	0.546	0.542	0.444	0.346	0.960	0.877
15	CcP5C11	0.093	0.088	0.068	0.066	0.200	0.180	0.390	0.620
16	CcP7C06	0.111	0.107	0.068	0.066	0.300	0.270	0.290	0.860
17	CcP7C08	0.222	0.203	0.182	0.167	0.400	0.345	0.150	0.650
18	CcP7D04	0.759	0.751	0.773	0.751	0.700	0.735	0.180	0.880
19	CcP7F06	0.852	0.787	0.841	0.788	0.900	0.750	0.980	0.830
20	CcP7H10	0.444	0.384	0.432	0.386	0.500	0.375	0.940	0.720
21	CcP8D06	0.944	0.927	0.955	0.923	0.900	0.910	0.080	0.940
Média		0.679	0.675	0.674	0.667	0.701	0.669	0.757	0.862
Desvio padrão		0.273	0.271	0.285	0.281	0.240	0.228	0.326	0.092

*Os dados referentes à população EUA-SE são de Shamblin et al., 2007 (Loci 1 a 12) e de Shamblin et al., 2009 (Loci 13 a 21)

As secções da Ponta Dobela e Ponta Mucombo apresentaram as médias mais elevadas de heterozigotia observada (Tabela 4.10). No entanto o mesmo não foi observado em relação à heterozigotia esperada. Os valores de heterozigotia observados para Xai-Xai não são relevantes pois apenas uma amostra amplificou.

Tabela 4.10 - Heterozigotia observada (Ho) e heterozigotia esperada (He) por locus considerando 5 grupos (RMPPPO – todas as amostras; PO -Ponta do Ouro; PMal –Ponta Malongane; PDob –Ponta Dobela; PMuc –Ponta Mucombo e Xai-Xai).

	PO		PMal		PDob		PMuc		Xai-Xai	
	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He
Cc1B03	1.000	0.722	0.882	0.840	0.571	0.725	0.750	0.844	1.000	0.500
Cc1F01	0.333	0.611	0.941	0.845	1.000	0.878	0.889	0.840	1.000	0.500
Cc1G02	0.667	0.667	0.882	0.863	1.000	0.857	0.889	0.827	0.000	0.000
Cc1G03	1.000	0.778	0.853	0.869	0.714	0.745	0.778	0.821	0.000	0.000
Cc2G10	1.000	0.778	0.765	0.860	0.857	0.867	1.000	0.803	1.000	0.500
Cc2H12	1.000	0.667	0.853	0.818	1.000	0.837	0.889	0.809	1.000	0.500
Cc5C08	0.667	0.500	0.835	0.824	0.857	0.827	0.889	0.753	1.000	0.500
Cc5F01	0.333	0.278	0.677	0.757	0.571	0.622	0.667	0.728	1.000	0.500
Cc5H07	1.000	0.778	0.941	0.834	1.000	0.786	1.000	0.815	1.000	0.500
Cc7B07	1.000	0.778	0.794	0.895	0.857	0.837	0.889	0.864	1.000	0.500
Cc7C04	0.667	0.667	0.706	0.623	0.857	0.663	0.444	0.722	1.000	0.500
Cc7G11	0.500	0.667	0.441	0.526	0.714	0.653	0.667	0.642	0.000	0.000
CcP1F09	1.000	0.611	0.471	0.542	0.714	0.459	0.375	0.305	1.000	0.500
CcP5C11	0.000	0.000	0.088	0.084	0.000	0.000	0.222	0.198	0.000	0.000
CcP7C06	0.000	0.000	0.029	0.029	0.286	0.245	0.333	0.296	0.000	0.000
CcP7C08	0.333	0.278	0.177	0.163	0.143	0.133	0.444	0.377	0.000	0.000
CcP7D04	0.667	0.667	0.735	0.728	1.000	0.796	0.667	0.728	1.000	0.500
CcP7F06	0.667	0.667	0.824	0.780	1.000	0.725	0.889	0.747	1.000	0.500
CcP7H10	0.333	0.278	0.412	0.389	0.571	0.408	0.556	0.401	0.000	0.000
CcP8D06	1.000	0.833	0.941	0.922	1.000	0.857	0.889	0.920	1.000	0.500
Média	0.658	0.561	0.662	0.659	0.736	0.646	0.706	0.672	0.650	0.325
Desvio padrão	0.344	0.255	0.291	0.282	0.301	0.261	0.236	0.223	0.489	0.245

4.3.7 ANÁLISE DA ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA

DISTÂNCIAS GENÉTICAS (FST)

A análise das distâncias genéticas entre duas populações artificiais não evidenciou uma estruturação significativa ($F_{ST}=0.45$; valor-P não significativo: “NS”). Ao comparar os cinco grupos também não se verificou a existência de estruturação (Tabela 4.11). O valor-P foi obtido após 200 permutações a 5% e evidencia que o resultado obtido não é significativo. Estes resultados sugerem que todas as tartarugas amostradas pertencem à mesma população genética que não está subestruturada.

Tabela 4.11 - Distâncias genéticas entre cinco populações (PO- Ponta do Ouro, PMal - Ponta Malongane, PDob -Ponta Dobela, PMuc - Ponta Mucombo) calculadas a partir dos resultados de microsatélites (ADNn). O primeiro valor refere-se ao F_{ST} e por baixo o valor-P, evidenciando que nenhum dos valores foi estatisticamente significativo (NS). Xai-Xai não possui dados suficientes para a permitir o cálculo do F_{ST} e do nível de significância (NA, não aplicável).

	PMal	PDob	PMuc	Xai-Xai
PO	0,26500 NS	0,23000 NS	0,16500 NS	NA NA
PMal	-	0,21000 NS	0,14000 NS	NA NA
PDob	-	-	0,67500 NS	NA NA
PMuc	-	-	-	NA NA

ANÁLISE FACTORIAL DE CORRESPONDÊNCIA (AFC)

Através da AFC, cujos eixo X explica 4.57% e o eixo Y explica 4.26% da variabilidade observa-se que a população não está segregada em grupos (Figura 4.18). As amostras que estão ligeiramente afastadas do agrupamento principal não representam subgrupos e por isso muito provavelmente se o número de amostras aumentasse o agrupamento principal seria maior.

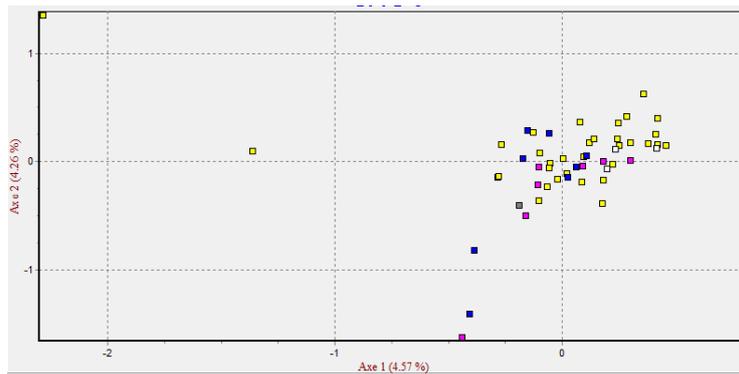


Figura 4.18 - Análise factorial por correspondência das populações de tartaruga cabeçuda da RMPPO. As tartarugas observadas na Ponta Malongane encontram-se representadas a amarelo, as da Ponta do Ouro a branco e da Ponta Mucombo a azul.

O MÉTODO DE AGRUPAMENTO BAYESIANO (STRUCTURE)

Para verificar se existe uma estruturação independente das praias de nidificação na Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro (RMPPO), ou seja excluindo a informação *a priori* sobre o local de amostragem, procedeu-se à estatística *ad hoc* Δk .

O melhor valor de k , inferido pelo método de Evanno para os três tipos de corridas efectuados – sem indicação de localização geográfica, com indicação de partição em 2 regiões e com indicação de partição em 5 regiões, foi de 2, 3 e 4, respectivamente (Figura 4.19).

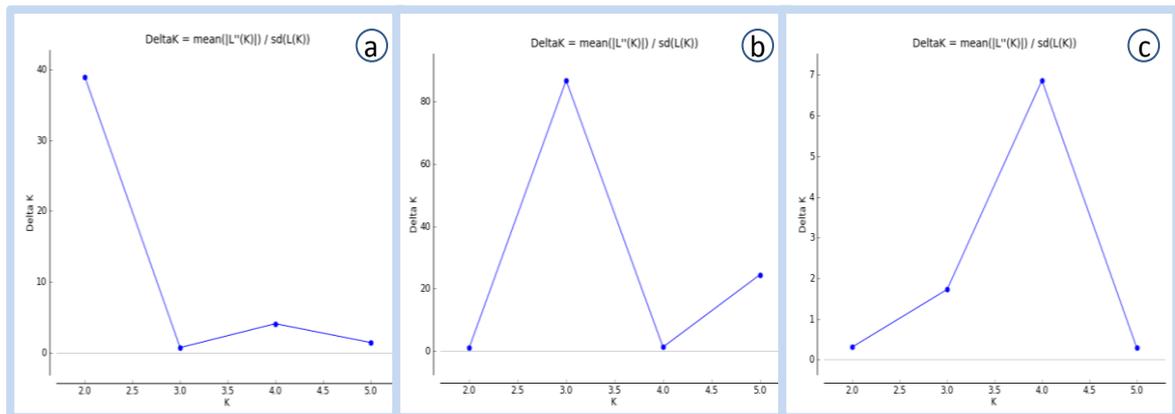


Figura 4.19 – Valor de k inferido pelo método de Evanno e indicação do melhor valor de k para a corrida: a) sem localização atribuída ($k=2$); b) com indicação de partição em 2 regiões ($k=3$) e c) com indicação de partição em 5 regiões ($k=4$).

Nas figuras em baixo é apresentado o resultado para o melhor k (excluindo k=1). No entanto, mesmo considerando a generalidade dos k testados, com ou sem informação geográfica, cada indivíduo foi atribuído a cada um dos grupos com igual probabilidade, o que indica ausência de estruturação populacional (Figura 4.20, Figura 4.21 e Figura 4.23). A única exceção foi observada para a sexta corrida para k=3 com indicação de partição em 2 regiões, em que os indivíduos 465 e 510 foram diferenciados (Figura 4.22). Finalmente, em todas as corridas, o melhor valor de *likelihood* do modelo foi obtido para k=1.

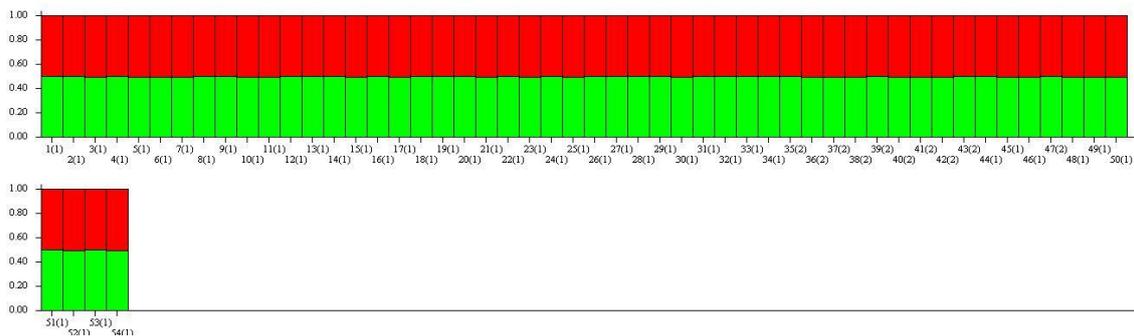


Figura 4.20 – Primeira corrida para K=2, sem localização atribuída. Cada coluna representa um indivíduo (valor médio de *likelihood* $\ln = -3539.5$; SD=79.0; SD=6.99).

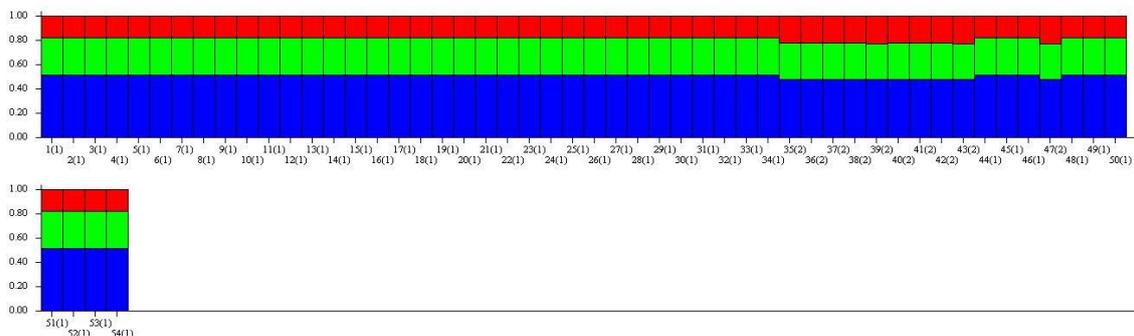


Figura 4.21 - Quinta corrida para K=3, com localização geográfica com indicação de partição em 2 regiões. Cada coluna representa um indivíduo (valor médio de *likelihood* $\ln = -3538.2$; SD=96.7).

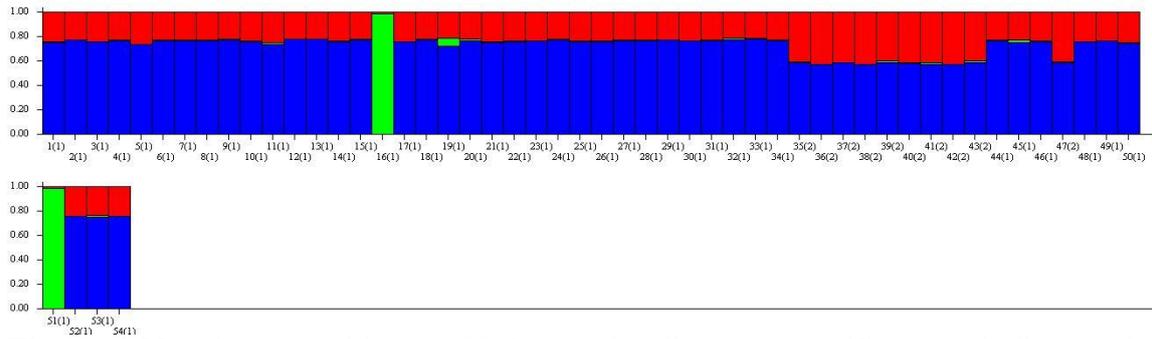


Figura 4.22 – Sexta corrida para $K=3$, com localização geográfica com indicação de partição em 2 regiões. Cada coluna representa um indivíduo (valor médio de *likelihood* $\ln = -3475.3$; $SD=218.3$).

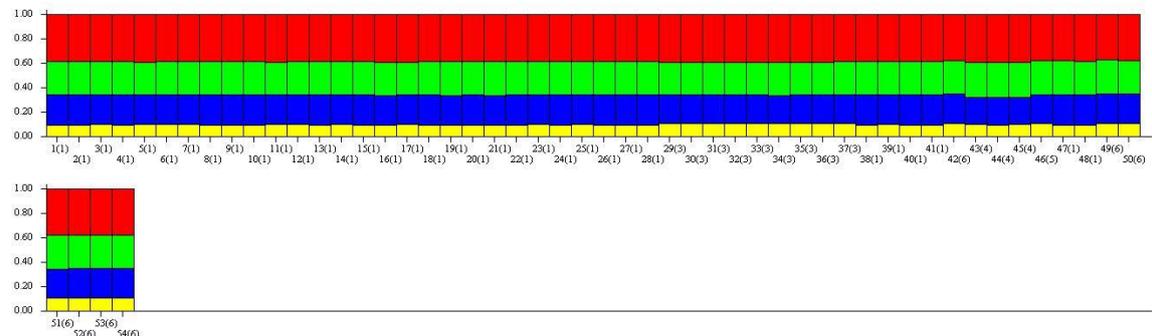


Figura 4.23 - Sétima corrida para $K=4$ com localização geográfica com indicação de partição em 5 regiões. Cada coluna representa um indivíduo (valor médio de *likelihood* $\ln = -3534.5$; $SD=164.8$).

4.3.8 ESTIMATIVA DO EFECTIVO POPULACIONAL

O programa LDNE definiu três situações com base em três frequências alélicas mínimas utilizadas (0.05, 0.02 e 0.01). A estimativa do efectivo populacional (N_e) através do método de LDNE variou de 276.3 para frequência alélica mínima de 0.01 (limites mínimo de 181.3 e máximo de 550, para o teste de Jackknife nos *loci*) a 334.4 para a frequência alélica de 0.05 (limites mínimo de 173.0 e máximo de 2474 para o teste paramétrico).

A estimativa do efectivo populacional, calculada através do programa ONeSAMP foi de 193.23 para a réplica 1 e de 703.9 para a réplica 2. Esta flutuação entre réplicas indica que os dados não são claros para a estimativa precisa do N_e .

Tabela 4.12 – Estimativa do efectivo populacional no programa LDNE através de três frequências mínimas e do programa OneSAMP.

		LDNE			OneSAMP	
Frequência alélica mínima		0.05	0.02	0.01	Réplica 1	Réplica 2
	Média harmónica do tamanho da amostra	53.8	53.8	53.8		
	Comparações independentes	4206	7545	11185		
	R ² Geral	0.0206 8	0.0204 5	0.0208 8		
	R ² Esperado por amostra	0.0196 9	0.0196 8	0.0196 8		
Paramétrico	Limite inferior	173.0	229.0	187.8		
	Limite superior	2474.0	2433.8	502.4		
Jackknife nos <i>Loci</i>	Limite inferior	157.4	214.3	181.3		
	Limite superior	∞	6883.0	550.0		
Computação bayesiana	Limite inferior				142.12	322
	Limite superior				395.12	3335
	N_e (estimativa do efectivo populacional)	334.4	428.6	276.3	193.23	703.9

4.3.9 EVENTOS DEMOGRÁFICOS: *BOTTLENECK*

A ocorrência de perturbação demográfica foi rejeitada para todos os parâmetros aplicados ($P > 0,05$) excepto ao considerar $p_1 = 0,95$ e a variância do TPM = 2,09 ($p = 0,03$; Tabela 4.13). Para este caso, dos 20 loci analisados, 7 apresentaram excesso de heterozigotia, dos quais 4 não apresentaram uma diferença significativa. Os restantes 13 loci apresentaram um défice de heterozigotia, dos quais 6 não apresentaram uma diferença significativa, constituindo um fraco sinal de redução demográfica (Tabela 4.14).

Tabela 4.13 - Teste de *bottleneck* com base no excesso de heterozigóticos para as tartarugas cabeçudas da RMPPPO. Os valores estão apresentados para o modelo de duas fases de mutação (TPM) para uma série de parâmetros.

Proporção de SMM no TPM	Pg	Variância do TPM	Probabilidade do teste de Wilcoxon (Teste excesso ou deficiência de heterozigotia para duas caudas) 95% de nível de confiança.
95%	0.5	2.09	0.03
95%	0.05	12	0.11
95%	0.5	70	0.29
90%	0.10	2.09	0.06
90%	0.10	2.5	0.06
78%	0.22	3.4	0.16
73%	0.27	4.4	0.37
68%	0.32	4.5	0.55
63%	0.37	5.04	0.59
58%	0.42	5.6	0.70
53%	0.47	6.13	0.92
48%	0.52	6.7	0.87
43%	0.57	12.9	0.41

Distribuição Normal em forma de L

SMM – Modelo de mutação por passos Pg= probabilidade de adição de várias unidades de repetição

Tabela 4.14 - Estatística para detectar as diferenças entre as heterozigotias calculadas de acordo como equilíbrio de Hardy-Weinberg (He) e pelo equilíbrio de mutação-deriva genética (HE) segundo o modelo de duas-fases (TPM=95 e variância do TPM=2.09) para os 20 microssatélites (n – tamanho da amostra de alelos); ko – número de alelos; S.D. – desvio padrão; DH – diferença entre He e HE).

TPM 95, Pg=0.5 e Variância do TPM 2.09							
locus	n	ko	He	HE	S.D.	DH/sd	Prob
Cc5H07	108	11	0.855	0.855	0.029	0.021	0.4470
CcP1F09	108	5	0.556	0.658	0.090	-1.122	0.1190
CcP5C11	108	2	0.089	0.230	0.167	-0.847	0.3160
Ccp7C06	108	4	0.107	0.574	0.120	-3.901	0.0020
CcP7C08	108	4	0.204	0.571	0.118	-3.117	0.0130
Ccp7D04	108	10	0.758	0.840	0.034	-2.431	0.0300
CcP7F06	108	5	0.795	0.664	0.085	1.536	0.0030
Cc1B03	108	13	0.856	0.881	0.023	-1.102	0.1350
Cc1F01	108	12	0.865	0.868	0.027	-0.133	0.3570
Cc2H12	108	9	0.836	0.817	0.041	0.461	0.3750
Cc5C08	108	11	0.848	0.855	0.030	-0.225	0.3320
Cc7B07	108	19	0.910	0.923	0.017	-0.754	0.1630
Cc7C04	108	6	0.666	0.717	0.075	-0.676	0.1920
Cc1G02	108	12	0.877	0.868	0.026	0.356	0.4380
Cc1G03	108	12	0.876	0.868	0.027	0.294	0.4800
Cc2G10	108	13	0.881	0.880	0.023	0.072	0.4760
Cc5F01	108	11	0.756	0.855	0.030	-3.281	0.0110
Cc7G11	108	7	0.591	0.758	0.057	-2.933	0.0120
CcP7H10	108	2	0.388	0.222	0.168	0.986	0.2400
Ccp8D06	108	27	0.935	0.950	0.013	-1.163	0.0400

4.4 DISCUSSÃO

4.4.1 DIVERSIDADE HAPLÓTÍPICA DO ADN MITOCONDRIAL NA RMPPO

Através da análise genética do ADN mitocondrial de 61 amostras de tartarugas cabeçadas, observou-se que a população da RMPPO é composta maioritariamente pelo haplótipo CC-A2.1 (>90%), tendo sido observado apenas um representante do haplótipo CC-I1 (1.64%).

O haplótipo CC-A2.1 está presente em várias populações que nidificam na região do mar Mediterrâneo, Atlântico e Índico Sul (Shamblin *et al.*, 2014). Para a região do Índico Sul, mais concretamente na área de nidificação de Kwazulu-Natal (África do Sul), o haplótipo CC-A2.1 foi o único a ser reportado (Shamblin *et al.*, 2014). Assim, tal como seria de se esperar (dado que as fêmeas nidificantes nesta região constituem uma única população; Capítulo 3), as fêmeas nidificantes na RMPPO também são maioritariamente representadas por este haplótipo.

O novo haplótipo encontrado no sul de Moçambique, o CC-I1, deriva de uma mutação pontual mais recente do haplótipo CC-A2.1. O haplótipo CC-I1 foi representado apenas pela tartaruga cabeçada MZ1248, que foi amostrada na Ponta Mucombo. Uma vez que esta tartaruga foi marcada na época 2011/12 e dado que a nidificação pode ter intervalos de 2 a 4 anos e a probabilidade de observação directa de uma tartaruga é baixa (Capítulo 3), é plausível que ainda não exista informação sobre a fidelidade desta tartaruga à praia de nidificação. No entanto, para a secção de Mucombo apenas foram recolhidas 9 amostras e por isso, a frequência relativa do haplótipo CC-I1 pode estar sub-representada.

Com base em análises do ADN mitocondrial em populações do sudeste dos EUA, Bowen & Karl (2007) referem que as frequências haplotípicas em populações nidificantes podem diferir significativamente numa escala de centenas de quilómetros. Isto justifica mais estudos para a região sul de Moçambique, sendo necessário incluir amostras de tartarugas nidificantes em Inhambane e Gaza, para se poder inferir sobre a frequência do haplótipo CC-I1 ou de novos haplótipos na população.

4.4.2 DISPERSÃO DO HAPLÓTIPO E POSSÍVEL EXPANSÃO DAS TARTARUGAS CABEÇUDAS NUM CONTEXTO EVOLUTIVO

O *natal homing* imperfeito foi observado numa pequena percentagem de tartarugas cabeçudas marcadas (LeBuff Jr, 1974), e considera-se que tenha sido essencial para permitir a expansão para novas regiões, dado que as condições ambientais dos ecossistemas, quer de áreas de alimentação como de praias de nidificação, sofrem modificações na escala de tempo geológico.

A baixa diversidade haplotípica encontrada na RMPPO e o facto de ambos os haplótipos pertencerem ao HGII e do CC-II não ter sido reportado noutra região, sugere que a população do sul do Oceano Índico resulta de uma colonização mais recente, em relação à primeira colonização do Mediterrâneo, e provavelmente proveniente do Atlântico.

Encalada e colaboradores (1998) sugerem que durante os períodos de máxima glacial do Pleistoceno, as linhagens das tartarugas cabeçudas poderiam ter sido mantidas em regiões de estabilidade climática em latitudes tropicais e equatoriais, e mais tarde com o aquecimento terem expandido.

As populações do Mediterrâneo apresentam maior diversidade de haplótipos pertencentes ao HGII, com dominância do haplótipo CC-A2.1 (>50%: Yilmaz *et al.*, 2011; Clusa *et al.*, 2013; Shamblin *et al.*, 2014), em comparação com as populações nidificantes do Atlântico e Índico. Assim, muito provavelmente as populações desta linhagem, são mais antigas no Mediterrâneo do que no Oceano Índico Sul. Bowen e colaboradores (2005) e Clusa e colaboradores (2013) sugeriram que a colonização do Mediterrâneo ocorreu pelo menos duas vezes. A colonização mais antiga, do precursor do haplótipo CC-A2.1, terá sido antes da última era glacial, há aproximadamente 65 mil anos, no Pleistoceno, e a segunda colonização no Holoceno, há aproximadamente 10 mil anos. De acordo com Clusa e colaboradores (2013) após a primeira colonização, a população ter-se-á refugiado na Líbia, onde actualmente existe a maior diversidade de haplótipos do HGII (maioritariamente o CC-A2.1), e expandido para outras áreas de nidificação do Mediterrâneo.

No entanto, não existem estudos que retratam qual foi o refúgio da população de tartarugas cabeçudas que terá posteriormente migrado para a região do sul de África. A população nidificante mais próximas desta região que apresentam o haplótipo CC-A2.1, que se tem conhecimento, são as da Ilha do Sal em Cabo Verde em que 4% da população possui o haplótipo CC-A2.1 e a maioria dos haplótipos pertence ao HGIIa (Monzón-Argüello, 2010).

Dada a tolerância térmica das tartarugas cabeçudas, o extremo sul de África pode não ter sido uma barreira continental para o fluxo génico entre o Oceano Índico e o Atlântico oriental, durante o final do Pleistoceno (Bowen *et al.*, 1992). Hughes (1974) reportaram a transferência ocasional de tartarugas cabeçudas entre os oceanos Índico e Atlântico por via do Cabo da Boa Esperança. Em relação às outras espécies de tartarugas marinhas, Bowen e colaboradores (2007) sugerem que a tartaruga de couro (*Dermochelys coriacea*), por ser uma espécie tolerante ao frio, não mostra partições evolutivas entre as populações do Indo-Pacífico e Atlântico, enquanto a tartaruga verde tropical (*Chelonia mydas*), a tartaruga bico-de-falcão (*Eretmochelys imbricata*), a tartaruga olivacea (*Lepidochelys olivacea*) e a tartaruga de kempí (*L. kempí*) apresentam separações ancestrais entre os oceanos.

A hipótese de passagem pelo Cabo da Esperança é suportada pela amenização do upwelling de Benguela entre o Plio-Pleistoceno (aproximadamente à 1.6 ma; Meyers *et al.*, 1983; Shannon, 1985 citado por Lessios *et al.*, 2001) e a maior intrusão de águas quentes da corrente das Agulhas no Atlântico durante o Pleistoceno (Bé & Duplessy 1976; Hutson 1980 citado por Lessios *et al.*, 2001). Enquanto durante o Plioceno (5.3 a 1.8 Ma), a corrente de Benguela era mais intensa e transportava águas superficiais frias (9°C) até à costa sudoeste na região de Durban (34° de latitude; Andrews & Cram, 1961 citado por Lessios *et al.*, 2001) constituindo uma barreira para as espécies tropicais e possivelmente para as espécies de clima temperado (Duncan *et al.*, 2006; Bourjea *et al.*, 2007).

Com base no tempo de coalescência a partir do ADNmt, Duchene (2012) estimou que a separação entre as linhagens dos haplótipos do Índico Norte/Pacífico (HGIIb) e do Atlântico/Mediterrâneo (HGI) ocorreu durante o Plioceno (4.1 Ma) com a ascensão do istmo do Panamá que fechou a “ligação tropical” entre o Atlântico e Indo-Pacífico

(Coates & Obando, 1996 citado por Castro *et al.*, 2007). Assim, é provável que os haplótipos do Pacífico tenham resultado de uma linhagem mais ancestral, que posteriormente colonizou a região de Omã, dada a maior proximidade do haplótipo de Omã (CC-A11.6) com os haplótipos do Pacífico (CCP) tal como sugerido por Shamblin *et al.*, 2014.

4.4.3 VARIABILIDADE ALÉLICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DO ADN NUCLEAR

As análises foram feitas para os 20 loci polimórficos de ADN nuclear (microsatélites) que se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação, e um total de 54 amostras, sendo considerado um número razoável para inferir a estruturação, o tamanho do efectivo populacional e a existência de uma redução demográfica (Luikart & Cornuet, 1998).

A variabilidade alélica média dos 20 loci foi de 9.95 alelos (± 6.00 DP) por locus (Tabela 4.7) e a heterozigotia esperada por loci foi de 0.675 (± 0.271 DP; Tabela 4.9). Estes 20 loci foram analisados por Shamblin *et al.* (2007; 2009), que reportaram uma variabilidade média de 12.9 alelos (± 5.5 DP) por locus e a heterozigotia esperada de 0.862 (± 0.092 DP). Estas diferenças no número de alelos e da heterozigotia esperada, evidencia que a população nidificante na RMPPO apresenta menor diversidade genética. A existência de alelos privados, podem ser um indicador de estruturação populacional entre a região de Moçambique e a do Sudeste dos Estados Unidos, mas não é possível fazer uma comparação directa entre as frequências e a amplitude alélica para analisar as similaridades, pois requer uma padronização de variáveis associadas à metodologia utilizada (Amos *et al.*, 2007).

4.4.4 AUSÊNCIA DE ESTRUTURAÇÃO NA RMPPO

Na região da RMPPO, numa extensão de 90 km, não se observou estruturação através dos microsatélites (F_{ST} não foi significativo) quer na composição alélica entre a região Sul e Norte da RMPPO (2 grupos), nem considerando cada secção de praia (5 grupos). O mesmo resultado foi obtido pela análise bayesiana feita no programa Structure. Tanto na análise não tendo em conta o local de amostragem como considerando 2 ou 5 locais

de amostragem (opção *loc prior*) o melhor k inferido pelo método de Evanno não mostrou estruturação aparente. Note-se que este método não permite atribuir o melhor k a $k=1$, que tendo em conta os resultados será o que melhor se deve adequar às tartarugas cabeçudas da região RMPPO. A mesma ausência de estruturação foi indicada pelos outros k em todas as corridas. A única exceção verificou-se nas corridas considerando a informação do local de amostragem para $k=2$. Nestas corridas, dois indivíduos da região entre a Ponta Malongane e a Ponta Dabela (T465) e entre a Ponta Dabela e a Ponta Mucombo (T510) foram indicados como podendo ser geneticamente diferentes (Figura 4.22). No entanto, dada a inconsistência deste resultado tendo em conta a restante análise efectuada, é difícil neste momento avaliar a sua significância. Análises futuras com uma amostragem mais alargada da costa Africana deverão esclarecer se poderá haver alguma contribuição de outras populações geneticamente diferenciadas para a população da região RMPPO. É no entanto claro que não existe diferenciação genética entre as tartarugas nidificantes nas diferentes secções de praia ou entre as partes norte e sul da região RMPPO, tal como indicado pelo ADN mitocondrial.

Na região do Oceano Índico não existem estudos disponíveis de análise do ADN nuclear de tartarugas cabeçudas. No entanto, os padrões migratórios e sobreposição das áreas de alimentação das tartarugas cabeçudas observada em estudos de telemetria não permitem descartar a possibilidade de conectividade entre as populações nidificantes do Sul de África, Madagáscar e de Omã.

As tartarugas cabeçudas adultas que nidificam na região Sudoeste do Oceano Índico, entre Outubro a Março, dirigem-se para norte através do Canal de Moçambique (Papi *et al.*, 1997; Luschi *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2014b) até encontrarem um local de alimentação disponível (Hughes, com. pess.). Estas rotas migratórias pós-nidificação para as áreas de alimentação têm sido mais facilmente estudadas por telemetria, a aplicação de marcadores com transmissor satélite, e ocasionalmente por recaptura de tartarugas com marcadores (Rees *et al.*, 2010).

Luschi e colaboradores (2003) reportaram que duas das tartarugas cabeçudas provenientes da área de nidificação da África do Sul, que foram marcadas por telemetria e recolocadas na costa oriental de Madagáscar, apresentaram uma rota pós-nidificação atípica, em que após migrarem até à região da Somália posteriormente desviaram para

Este, tendo num dos casos, uma das tartarugas navegado pela Corrente de Monção do Sudoeste (SMC; ver Figura 2.2) e alcançado a região do Sri Lanka. As tartarugas cabeçudas adultas fêmeas que nidificam em Omã, entre Abril e Setembro, permanecem na região, fazendo migrações até ao Iémen, mas uma das tartarugas migrou até ao Golfo de Kutch, próximo do Paquistão (Rees *et al.*, 2010). Estes estudos evidenciam a capacidade altamente migratória das tartarugas cabeçudas, que torna biologicamente possível que estas fêmeas possam acasalar com machos de outras regiões.

Alguns estudos reportaram casos de fluxo génico mediado pelos machos entre populações consideradas distintas através do ADN mitocondrial, como por exemplo entre as populações nidificantes no Sudeste dos Estados Unidos e Brasil (Bowen *et al.*, 2005), Mediterrâneo (Carreras *et al.*, 2007; Yilmaz *et al.*, 2011). A existência de fluxo génico mediado pelos machos também foi reportado para outras espécies de tartarugas marinhas, como por exemplo para as tartarugas verde entre o Atlântico e o Mediterrâneo e entre o Índico e o Pacífico (Roberts *et al.*, 2004) e para as tartarugas gigante no Atlântico (Dutton *et al.*, 2013). A interpretação biológica destes resultados foi de que os machos reprodutores tendem para um *natal homing* moderado e não para o acasalamento aleatório com fêmeas de diferentes origens, mas não exclui a possibilidade de os machos poderem mediar o fluxo génico entre áreas de nidificação (Awise, 2007).

Desta forma, torna-se relevante estudar a variabilidade genética dos microssatélites e possíveis fluxos génicos entre as regiões do Sul de África, Madagáscar, Omã e Austrália e analisar a possível dependência para a estabilidade das populações. A dependência populacional de uma região em relação à outra pode hipoteticamente resultar, por exemplo, em desequilíbrios da proporção de fêmeas para machos que pode variar de acordo com as características da área de nidificação (i.e. temperatura da areia) ou da pressão antropogénica. Para o efeito, deverão ser incluídas análises genéticas de machos dentro da RMPPO e de tartarugas (fêmeas e machos) de outras áreas de nidificação (Omã e Oeste da Austrália) para inferir sobre o potencial fluxo génico e fidelidade dos machos à área de acasalamento. Bonfil *et al.* (2005) estudou a conectividade entre as populações de tubarões brancos (*Carcharodon carcharias*) da África do Sul e Austrália e verificou que as fêmeas realizam migrações transoceânicas, permitindo o fluxo génico

apesar de também possuírem estruturação, pelo ADN mitocondrial, associada ao *natal homing*. Contudo, não existe nenhum estudo que evidencie migrações de tartarugas cabeçudas entre o Sul de África e a Austrália.

Portanto, a complexidade dos padrões migratórios das tartarugas marinhas, a sobreposição de áreas de alimentação, e a possibilidade das tartarugas marinhas fêmeas poderem armazenar esperma durante um período considerável e conseqüentemente não necessitar de acasalar durante os intervalos entre posturas da mesma época (Gist & Congdon, 1998), dificultam a aplicação do conceito população, isto é de um conjunto de indivíduos que ao se reproduzirem sexuadamente, compartilham um fundo genético.

4.4.5 ESTIMATIVA DO EFECTIVO POPULACIONAL

A estimativa do efectivo populacional (N_e) das fêmeas nidificantes com o método de LDNE variou de 276,3 (frequência alélica mínima de 0,01) para 428,6 (frequência alélica mínima de 0,02) e para o método aplicado pelo programa ONeSAMP foi de 193 e os limites entre 142 a 395.

Assim, a estimativa do N_e apresenta um valor mais baixo do que o possível censo populacional inferidos com base nos indicadores de monitoria, como o número de emergências, tartarugas marcadas e recapturadas por época, que permitiram estimar a nidificação entre 290 a 648 tartarugas cabeçudas por época na RMPPO (ver discussão do capítulo 3). O tamanho efectivo populacional estimado foi inferior a 500, frequentemente referido como sendo o valor mínimo para a persistência da variação genética a longo termo (Franklin & Frankham, 1998). O reduzido N_e e a diversidade genética (H_e) menor do que a reportada para a população do Sudeste dos Estados Unidos, sugerem que a população de tartaruga cabeçuda nidificante na RMPPO poderá estar susceptível a mudanças ambientais ou ameaças de origem antropogénica.

No entanto, é importante ressaltar que estes valores, tanto do N_e como dos censos de monitoria, não retratam toda a população de tartarugas cabeçudas da região do Índico Sul. Assim, provavelmente ao expandir a área de amostragem poderão ser observados outros alelos mais raros. As técnicas de inferência do N_e são relativamente recentes e actualmente não foram encontrados nenhum estudo que quantifique o N_e , e relacione com o censo populacional em tartarugas cabeçudas, mas sim para tartarugas bico-de-

falcão (Phillips, 2014), tartarugas gigante (Rivalan 2006) e tartaruga de carapaça achatada (Theissenger 2009).

Foram utilizados vários parâmetros para detectar a presença de redução demográfica recente, dado o desconhecimento sobre o modelo de mutação dos *loci* utilizados. Apenas num dos cenários foi detectada a possibilidade de redução demográfica recente e provavelmente deve-se a um erro tipo I (detecção de redução demográfica enquanto não ocorreu). Assim, os resultados indicam que a população da RMPPO aparentemente não sofreu uma redução demográfica recente.

Os estudos em tartarugas bico-de-falcão (Phillips *et al.*, 2014), tartarugas gigantes (Rivalan *et al.*, 2006), tartaruga de carapaça achatada (Theissinger *et al.*, 2009) também não detectaram redução demográfica recente, mas o estudo demográfico da população nidificante de tartaruga oliváceas no México detectou redução demográfica recente (Rodríguez-Zárate *et al.*, 2013). Uma perspectiva conservadora ressalta que o longo tempo de geração (Scott *et al.*, 2012) pode actuar como um tampão em relação à perda de diversidade genética após uma redução demográfica (Theissinger *et al.*, 2009; Phillips *et al.*, 2014). No entanto, o fluxo génico mediado pelos machos (Theissinger *et al.*, 2009; Phillips *et al.*, 2014), imigrantes de outras populações (Rivalan *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2014) também podem contribuir para a manutenção do N_e , e consequentemente a não detecção de redução demográfica recente.

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES

A estruturação global inferida pelo ADN mitocondrial está exclusivamente associada à evolução e expansão dos genes de linhagem materna e ao fenómeno de *natal homing*. As exigências de habitat das tartarugas cabeçudas, réptil marinho poiquilotérmico, indicam que a história evolutiva das colónias de nidificação está relacionada com a história climática e geológica da região. Assim, sugere-se que a colonização das praias de nidificação no sul de África terá sido recente, durante o Pleistoceno, após a colonização do Atlântico e Mediterrâneo.

A baixa diversidade haplotípica, baixa diversidade genética (heterozigotia esperada), o reduzido tamanho populacional efectivo e o baixo número de fêmeas nidificantes por época e a ausência de um sinal forte de redução demográfica recente, reflecte que esta população não deve ter sido relativamente grande, ou heterogénea e que provavelmente sofreu reduções demográficas no passado, mas que não foram suficientemente acentuadas para serem detectadas pelo programa Bottleneck.

A inexistência de diferenciação genética entre as praias de nidificação evidenciam que se trata de uma única população e não exclui a possibilidade de haver conectividade com outras populações de tartarugas cabeçudas. No entanto, a possível conectividade interoceânica entre as populações de tartaruga cabeçuda do Índico não significa que se a população do sul de África fosse extinta haveria de ser reposta a médio e longo prazo dado a elevada fidelidade à área de nidificação.

CAPÍTULO 6. RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS ESTUDOS

Este é o primeiro estudo disponível sobre a estrutura populacional na Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro (RMPPPO), e o primeiro estudo da região do oeste do Oceano Índico que inclui a análise de ADN nuclear. Assim, o facto de não se ter detectado diferenciação genética entre as secções de praia, e entre o Norte e Sul da RMPPPO significa que os limites da população nidificante devem ser alargados. Portanto, futuros estudos deverão incluir análises de amostras recolhidas noutras áreas de Moçambique (Inhaca, Xai-Xai, Bilene, Inhambane e Bazaruto) e colaborações internacionais para outras regiões (eg. Madagáscar, Omã e Austrália).

A coordenação com o sector das pescas poderá ser interessante para permitir a logística de recolha de amostras de tartarugas capturadas acidentalmente. A inclusão destas amostras será de extremo valor, dado que poderá incluir potenciais machos reprodutores e desta forma permitir analisar se são machos provenientes de outras populações (através do ADN mitocondrial) e o potencial fluxo génico (através do ADN nuclear), caso se trate de machos adultos.

Um esforço deverá ser feito para aumentar a série temporal de dados de marcação e recaptura das fêmeas nidificante, pois as tartarugas cabeçudas têm um ciclo de vida longo e reprodução tardia, de modo a possibilitar a estimativa do tamanho populacional através da utilização de programas como o MARK. Ainda, o aumento do esforço de monitoria dos ninhos é importante para permitir estudar o sucesso de eclosão, relação com eventos meteorológicos e melhorar as inferências sobre a proporção de machos e fêmeas.

Este estudo recomenda que o programa de monitoria e conservação continue a ser implementado na RMPPPO, uma vez que se trata de uma única população, sem subestruturação e com um haplótipo exclusivo, e apresenta um tamanho populacional baixo.

O esforço de conservação deve ser incentivado pelos promissores resultados dos programas de monitoria e conservação no sul de África, que indicam um aumento do número de ninhos de tartarugas cabeçudas na região, e poderá significar a recuperação da população a longo prazo.

Estas informações permitirão caracterizar melhor os comportamentos e biologia das tartarugas cabeçudas e inferir sobre a resiliência a mudanças ambientais e as tendências de crescimento/redução da população a longo prazo.

CAPÍTULO 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu-Grobois, F. A., Horrocks, J., Formia, A., LeRoux, R., Velez-Zuazo, X., Dutton, P., Soares, L., Meylan, P. & Browne, D. (2006). New mtDNA d-loop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution of mixed stock analysis. In "Presentation at the 26th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, Crete, Greece, 2-8 April, 2006".
- ACCSTR (2014a). "Loggerhead mtDNA Sequences (380 bp). Loggerhead (*Caretta caretta*) mitochondrial DNA control region sequences: Atlantic and Mediterranean." University of Florida.
- ACCSTR (2014b). "Loggerhead mtDNA Long Sequences (~800 bp). Loggerhead (*Caretta caretta*) mitochondrial DNA control region sequences: Atlantic and Mediterranean." University of Florida.
- Allard, M. W., Miyamoto, M. M., Bjørndal, K. A., Bolten, A. B. & Bowen, B. (1994). Support for Natal Homing in Green Turtles from Mitochondrial DNA Sequences *Copeia* **1**, 34-41.
- Allendorf, F. W. (2008). Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology & Evolution* **23**, 327-337.
- Amos, W., Hoffman, J., Frodsham, A., Zhang, L., Best, S. & Hill, A. (2007). Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes* **7**, 10-14.
- Anastácio, R., Santos, C., Lopes, C., Moreira, H., Souto, L., Ferrão, J., Garnier, J. & Pereira, M. J. (2014). Reproductive biology and genetic diversity of the green turtle (*Chelonia mydas*) in Vamizi island, Mozambique. *SpringerPlus*, 3:540
- Avise, J. C., Bowen, B. W., Lamb, T., Meylan, A. B. & Bermingham, E. (1992). Mitochondrial DNA Evolution at a Turtle's Pace: Evidence for Low Genetic Variability and Reduced Microevolutionary Rate in the Testudines. *Molecular Biology and Evolution* **9**, 457-473.
- Avise, J. C. (2007). "Conservation genetics of marine turtles—ten years later. Pp. 295-314 in: *Frontiers in Wildlife Science: Linking Ecological Theory and Management Applications*, D. Hewitt and T. Fulbright (eds.). CRC Press ", Boca Raton, FL.
- Backeberg, B. C., Johannessen, J. A., Bertino, L. & Reason, C. J. (2008). The greater Agulhas Current system: An integrated study of its mesoscale variability. *Journal of Operational Oceanography* **1**(1), 29-44.
- Balazs, G. H. & Ross, E. (1974). Observations on the preemergence behavior of the green turtle. *Copeia*, 986-988.
- Baldwin, R., Hughes, G. R. & Prince, R. I. T. (2003). "Loggerhead turtles in the Indian Ocean. In Bolten AB and Witherington BE (EDs)," Smithsonian Books, Washington.
- Bandeira, S., Bolnick, D. & Barbosa, F. (2007). "Flores Nativas do Sul de Moçambique. 1a Edição." Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.

- Bandelt, H. J., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular and Evolution* **16**, 37-48.
- Bantock, T. M., Robert, P., Prys-Jones & Lee, P. L. M. (2008). New and improved molecular sexing methods for museum bird specimens. *Genetics and Molecular Biology* **36**, 129-133.
- Barton, B. T. & Roth, J. D. (2008). Implications of intraguild predation for sea turtle nest protection. *Biological Conservation* **141**, 2139-2145.
- Bjerner, M. & Johansson, J. (2001). Economic and environmental impacts of nature-based tourism. A case study in Ponta do Ouro, Mozambique. Göteborg, School of Economics and Commercial Law, Göteborg University.
- Bjorndal, K. A., Meylan, A. B. & Turner, B. J. (1983). Sea turtles nesting at Melbourne Beach, Florida, I. Size, growth and reproductive biology. *Biological Conservation* **26**, 65-77.
- Bjorndal, K. A., Bolten, A. B. & Helen R. Martins (2000). Somatic growth model of juvenile loggerhead sea turtles *Caretta caretta*: duration of pelagic stage. *Marine Ecology Progress Series* **202**, 265-272.
- Bjorndal, K. A. (2003). Roles of Loggerhead Sea Turtles in Marine Ecosystems: reconstructing the past. In "The biology of sea turtles" (P. L. Lutz, J. A. Musick & J. Wyneken, eds.). CRC Press, USA.
- Bjorndal, K. A., Bolten, A. B., Moreira, L., Bellini, C. & Marcovaldi, M. Â. (2006). Population structure and diversity of Brazilian green turtle rookeries based on mitochondrial DNA sequences. *Journal Information* **5**, 262-268.
- Bjorndal, K. A., Reich, K. J. & Bolten, A. B. (2010). Effect of repeated tissue sampling on growth rates of juvenile loggerhead turtles *Caretta caretta*. *Diseases of aquatic organisms* **88**, 271-273.
- Blamires, S., Guinea, M., Kennett, R., Webb, A., Duff, G., Guinea, M. & Hill, G. (1998). Implications of nest site selection on egg predation at the sea turtle rookery at Fog Bay. Marine turtle conservation and management in Northern Australia. R. Kennet, A. Webb, G. Duff, ML Guinea, and G. Hill (eds.). Centre for Indigenous Natural and Cultural Resource Management and Centre for Tropical Wetlands Management, Northern Territory Univ., Darwin, Northern Territory, Australia. pp. 20-24.
- Bollmer, J., Irwin, M., Rieder, J. & Parker, P. (1999). Multiple paternity in loggerhead turtle clutches. *Copeia*, 475-478.
- Bolten, A. B. (2003). "Variation in sea turtle life history patterns: neritic vs. oceanic developmental stages," En: The Biology of Sea Turtles (eds. Lutz PL, Musick JA, Wyneken J), p. 243-257, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Bonfil, R., Meáer, M., Scholl, M. C., Johnson, R., O'Brien, S., Oosthuizen, H., Swanson, S., Kotze, D. & Paterson, M. (2005). Transoceanic migration, spatial dynamics, and population linkages of white sharks. *Science* **310**, 100-103.
- Boonzaaier, M. K. (2011). The effect of incubation temperature on hatching success and hatchling sex ratios of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in KwaZulu-Natal, South Africa. *Unpublished Thesis: Nelson Mandela Metropolitan University* **111**.

- Bourjea (2008). Sea turtle bycatch in West Indian Ocean - review, recommendations and research priorities. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science* **7**, 137-150.
- Bourjea, J., Lapègue, S., Gagnevin, L., Broderick, D., Mortimer, J. A., Ciccione, S. & al, e. (2007). Phylogeography of the green turtle, *Chelonia mydas* in the Southwest Indian Ocean. *Molecular Ecology* **16**, 175-186.
- Bowen, B., Clark, A., Abreu-Grobois, F., Chaves, A., Reichart, H. & Ferl, R. (1998). Global phylogeography of the ridley sea turtles (*Lepidochelys spp.*) as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genetica* **101**, 179–189.
- Bowen, B. & Karl, S. A. (2007). Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology* **16**, 4886-4907.
- Bowen, B. W., Meylan, A. B., Ross, J. P., Limpus, C. J., Balazs, G. H. & Avise, J. C. (1992). Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution* **46**, 865-881.
- Bowen, B. W., Avise, J. C., Richardson, J. I., Meylan, A. B., Margaritoulis, D. & Hopkins-Murphy, S. R. (1993). Population structure of CC in Northwestern Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Conservation Biology* **7**, 834-844.
- Bowen, B. W. & Avise, J. C. (1994). Tracking marine turtles through time. *Natural History* **103**, 36-43.
- Bowen, B. W., Kamezaki, N., Limpus, C. J., Hughes, G. R., Meylan, A. B. & Avise, J. C. (1994). Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. *Evolution*, 1820–1828.
- Bowen, B. W., Abreu-Grobois, F. A., Balazs, G. H., Kamezaki, N., Limpus, C. J. & Ferl, R. J. (1995). Trans-Pacific migrations of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) demonstrated with mitochondrial DNA markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **92**, 3731-3734.
- Bowen, B. W. & Karl, S. (1996). Population structure, phylogeography, and molecular evolution. En: *The biology of sea turtles* (eds. Lutz PL, Musick JA), p. 29-50, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Bowen, B. W. (2003). What is a loggerhead turtle? The genetic perspective. En: *Loggerhead Sea Turtles* (eds. Bolten AB, Witherington BE), p. 7-27, Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Bowen, B. W., Bass, A. L., Chow, S. M., Bostrom, M., Bjorndal, K. A., Bolten, A. B., Okuyama, T., Bolker, B. M., Epperly, S., Lacasella, E., Shaver, D., Dodd, M., SR, H.-M., JA, M., M, S., K, R.-B., W, T., WN, W. & Dutton, P. H. (2004). Natal homing in juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology* **13**, 3797-3808.
- Bowen, B. W., Bass, A., Soares, L. & Toonen, R. (2005). Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology* **14**, 2389-2402.
- Boyle, FitzSimmons, N. N., Limpus, C. J., Kelez, S., Velez-Zuazo, X. & Waycott, M. (2009). Evidence for transoceanic migrations by loggerhead sea turtles in southern Pacific Ocean. *Proceedings of the Royal Society B* **276**, 1993–1999.

- Brookfield, J. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* **5**, 453-455.
- Brown, W. M., George, M. & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **76**, 1967-1971.
- Bugoni, L., Krause, L. g. & Virginia Petry, M. (2001). Marine debris and human impacts on sea turtles in southern Brazil. *Marine pollution bulletin* **42**, 1330-1334.
- Bustard, H. R. (1967). Mechanism of nocturnal emergence from the nest in green turtle hatchlings. *Nature* **214**, 317.
- Caldwell, D. (1959). The loggerhead turtles of Cape Romain, South Carolina. *Bulletin of the Florida Museum of Natural History, Biological Sciences* **4**, 319-348.
- Carr, A. & Stancyk, S. (1975). Observations on the ecology and survival outlook of the hawksbill turtle. *Biological Conservation* **8**, 161-172.
- Carr, A. (1986). Rips, FADS and little loggerheads. *Bioscience* **36**, 92-100.
- Carreras, C., Pascual, M., Cardona, L., Aguilar, A., Margaritoulis, D., Rees, A., Turkozan, O., Levy, Y., Gasith, A., Aureggi, M. & Khalil, M. (2007). The genetic structure of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in the Mediterranean as revealed by nuclear and mitochondrial DNA and its conservation implications. *conservation genetics* **8**, 761-775.
- Casale, P., Freggi, D., Basso, R. & Argano, R. (2005). Size at male maturity, sexing methods and adult sex ratio in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Italian waters investigated through tail measurements. *The Herpetological Journal* **15**, 145-148.
- Casale, P., Lazar, B., Pont, S., Tomas, J., Zizzo, N., Alegre, F., Badillo, J., Di Summa, A., Freggi, D. & Lackovic, G. (2006). Sex ratios of juvenile loggerhead sea turtles *Caretta caretta* in the Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series* **324**, 281-285.
- Casale, P., Conte, N., Freggi, D., Cioni, C. & Argano, A. R. (2011). Age and growth determination by skeletochronology in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from the Mediterranean Sea. *Scientia Marina* **75**, 197-595.
- Castro, A., Stewart, B., Wilson, S., Hueter, R., Meekan, M., Motta, P., Bowen, B. & Karl, S. (2007). Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Molecular Ecology* **16**, 5183-5192.
- Castro, J., Bouza, C., Presa, P., Pino-Querido, A., Riaza, A., Ferreira, I., Sánchez, L. & Martínez, P. (2004). Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture* **242**, 119-135.
- CEPF (2010). "Ecosystem Profile Maputaland-Pondoland-Albany biodiversity hotspot." South African National Biodiversity Institute.
- Chakraborty, R., Andrade, M. d., Daiger, S. P. & Budowle, B. (1992). Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of human genetics* **56**, 45-57.
- Cliff, G. & Dudley, S. F. J. (1991). Sharks caught in the protective gill nets off Natal, South Africa. 4. The bull shark *Carcharhinus leucas* Valenciennes. *African Journal of Marine Science* **10**, 253-270.

- Conant, T. A., Dutton, P. H., Eguchi, T., Epperly, S. P., Fahy, C. C., Godfrey, M. H., MacPhearson, S. L., Possardt, E. E., Schroeder, B. A., Seminoff, J. A., Snover, M. L., Upton, C. M. & Witherington, B. E. (2009). Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*) 2009 Status Review Under the U.S. Endangered Species Act. Report of the Loggerhead Biological Review Team to the National Marine Fisheries Service, August 2009. pp. 1–222.
- Conceição, M. B. d., Levy, J., Marins, L. & Marcovaldi, M. (1990). Electrophoretic characterization of a hybrid between *Eretmochelys imbricata* and *Caretta caretta* (Cheloniidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **97**, 275-278.
- Conner, J. & Crews, D. (1980). Sperm transfer and storage in the lizard, *Anolis carolinensis*. *Journal of Morphology* **163**, 331-348.
- Cornuet, J. M. & Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.
- COSEWIC (2010). Assessment and status report on the loggerhead sea turtle in Canada.
- Costa, A. (2007). Status and Management of marine turtles in Quirimbas National park. 12pp. Maputo, Report submitted to PNQ-MITUR.
- Cuamba, P., Chenene, M. L., Mahumane, G., Quissico, D. Z., Lovseth, J. & O'Keefe, P. (2006). A solar energy resources assessment in Mozambique. *Journal of Energy in Southern Africa* **17**, 75-85.
- Curtis, C., Stewart, B. S. & Karl, S. A. (2007). Sexing pinnipeds with ZFX and ZFY loci. *Journal Heredity* **98**, 280-285.
- Dakin, E. & Avise, J. C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**, 904-909.
- Dalleau, M., Benhamou, S., Sudre, J., Ciccione, S. & Bourjea, J. (2014). The spatial ecology of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in the Indian Ocean sheds light on the “lost years” mystery. *Marine Biology*.
- Davenport, J. (1997). Temperature and the life-history strategies of sea turtles. *Journal of Thermal Biology* **22**, 479-488.
- De Ruijter, W. P. M., Ridderinkhof, H., Lutjeharms, J. R. E., Schouten, M. W. & Veth, C. (2002). Observations of the flow in the Mozambique Channel. *Geophysical Research Letters* **29**, 1401–1403.
- De Ruijter, W. P. M., Van Aken, H. M., Beier, E. J., Lutjeharms, J. R. E., Matano, R. P. & Schouten, M. W. (2004). Eddies and dipoles around South Madagascar: Formation, pathways and large-scale impact. *Deep-Sea Research I* **51**, 383-400.
- Di Rienzo, A., Peterson, A., Garza, J., Valdes, A., Slatkin, M. & Freimer, N. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 3166-3170.
- DNAC (2011). "Plano de Maneio da Reserva Marinha Parcial da Ponta do Ouro. Primeira Edição." MITUR, Maputo.

- Dodd, C. K. J. (1988). "Synopsis of the biological data on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* (Linnaeus 1758)," Rep. No. 88 (14). U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report
- Donlan, C. J., Wingfield, D. K., Crowder, L. B. & Wilcox, C. (2010). Using expert opinion surveys to rank threats to endangered species: a case study with sea turtles. *Conservation Biology* **24**, 1586-1595.
- Drosopoulou, E., Tsiamis, G., Mavropoulou, M., Vittas, S., Katselidis, K. A., Schofield, G., Palaiologou, D., Sartsidis, T., Bourtzis, K. & Pantis, J. (2012). The complete mitochondrial genome of the loggerhead turtle *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae): genome description and phylogenetic considerations. *Mitochondrial DNA* **23**, 1–12.
- Duchene, S. (2012). Marine turtle mitogenome phylogenetics and evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **65**, 241-250.
- Duncan, K., Martin, P., Bowen, B. & DE CouetHG (2006). Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular Ecology* **15**, 2239-2251.
- Dutton, P. H., Suzanne E. Roden, Kelly R. Stewart, Erin LaCasella, Manjula Tiwari, Angela Formia, Carlos, J. & Thomé, e. a. (2013). Population stock structure of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) in the Atlantic revealed using mtDNA and microsatellite markers. *conservation genetics* **14**, 625–636.
- Earl, D. A. (2012). Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources* **4**, 359-361.
- Eckert, K. L., Bjorndal, K. A., Abreu-Grobois, F. A. & Donnelly, M. (1999). "Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles."
- Eckert, S. & Martins, H. (1989). Transatlantic travel by juvenile loggerhead turtle. *Marine Turtle Newsletter* **45**, 15.
- Encalada, S., Lahanas, P., Bjorndal, K., Bolten, A., Miyamoto, M. & Bowen, B. (1996). Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Molecular Ecology* **5**, 473–483.
- Encalada, S., Bjorndal, K., Bolten, A., Zurita, J., Schroeder, B., Possardt, E., Sears, C. & Bowen, B. (1998). Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Marine Biology* **130**, 567–575.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.
- Ewert, M. A. (1979). The embryo and its egg: development and natural history. *Smith VII*.
- Ewing, H. (1943). Continued fertility in female box turtles following mating. *Copeia*, 112-114.
- Fang, F. & Morrow, R. (2003). Evolution, movement and decay of warm-core Leeuwin Current eddies. *Deep-Sea Research II* **50**, 2245-2261.

- Fergusson, I. K., Compagno, L. J. V. & Marks, M. A. (2000). Predation by white sharks *Carcharodon carcharias* (Chondrichthyes: Lamnidae) upon chelonians, with new records from the Mediterranean Sea and a first record of the ocean sunfish *Mola mola* (Osteichthyes: Molidae) as stomach contents. *Environmental Biology of Fishes* **58**, 447-453.
- Fernandes, R. S., Williams, J., Louro, C. M. M. & Pereira, M. A. M. (2014). "Monitoria, marcação e conservação de tartarugas marinhas em Moçambique: relatório anual 2013/14." CTV, Maputo.
- Fertl, D. & Fulling, G. (2007). Interactions between marine mammals and turtles. *Marine Turtle Newsletter* **115**, 4-8.
- Fisher, R. (1930). "The genetical theory of natural selection. Reedição de 1958.," Dover, Nueva York.
- Fitzsimmons, N. (1998). Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology* **7**, 575-584.
- Fitzsimmons, N. N., Moritz, C., Limpus, C. J., Miller, J., Parmenter, C. & Prince, R. (1996). Comparative genetic structure of green, loggerhead, and flatback populations in Australia based on variable mtDNA and nDNA regions. In "Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics", pp. 25-32. NOAA Technical memorandum NMFS-SEFSC-396, Washington.
- FitzSimmons, N. N., Moritz, C., Limpus, C., Pope, L. & Prince, R. (1997). Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow. *Genetics* **147**, 1843-1854.
- Floeter, S., Rocha, L., Robertson, D., Joyeux, J., Smith-Vaniz, W., Wirtz, P., Edwards, A., Barreiros, J. P., Ferreira, C. & Gasparini, J. L. (2008). Atlantic reef fish biogeography and evolution. *Journal of Biogeography* **35**, 22-47.
- Formia, A., Godley, B., Dontaine, J.-F. & Bruford, M. (2006). Mitochondrial DNA diversity and phylogeography of endangered green turtle (*Chelonia mydas*) populations in Africa. *conservation genetics* **7**, 353-369.
- Frankham, R., Lees, K. & Montgomery, M. E. (1999). Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? *Animal Conservation* **2**, 255-260.
- Franklin, I. R. & Frankham, R. (1998). How large must populations be to retain evolutionary potential? *Animal Conservation* **1**, 69-70.
- Frazer, N. B. & Ehrhart, L. M. (1983). Relating straight-line to over-the-curve measurements for loggerheads. *Marine Turtle Newsletter* **24**, 4-5.
- Frazier, J. (2003). Prehistoric and ancient historic interactions between humans and marine turtles. *The biology of sea turtles* **2**, 1-38.
- Gagneux, P., Boesch, C. & Woodruff, D. (1997). Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology* **6**, 861-868.
- Garcia de Leon, F., Canonne, M., Quillet, E., Bonhomme, F. & Chatain, B. (1998). The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **159**, 303-316.

- Garofalo, L., Mingozi, T., Micó, A. & Novelletto, A. (2009). Loggerhead turtle (*Caretta caretta*) matriline in the Mediterranean: further evidence of genetic diversity and connectivity. *Marine Biology* **156**, 2085-2095.
- Garza, J. C. & Williamson, E. G. (2001). Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* **10**, 305-318.
- Geis, A., Barichivich, A., Wibbels, W. J., Coyne, T., Landry, M., Owens, A. M. & Margaritoulis, D. (2005). Predicted sex ratio of juvenile Kemp's Ridley sea turtles captured near Steinhatchee, Florida. *Copeia*, 393-398.
- Gist, D. H. & Jones, J. M. (1989). Sperm storage within the oviduct of turtles. *Journal of Morphology* **199**, 379-384.
- Gist, D. H. & Congdon, J. D. (1998). Oviductal sperm storage as a reproductive tactic of turtles. *The Journal of experimental zoology* **282**, 526-534.
- Godfrey, M. H. & Barreto, R. (1995). Beach vegetation and seafinding orientation of turtle hatchlings. *Biological Conservation* **74**, 29-32.
- Godley, B. J., Broderick, A. C., Glen, F. & Hays, G. C. (2003). Post-nesting movements and submergence patterns of loggerhead marine turtles in the Mediterranean assessed by satellite tracking. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **287**, 119-134.
- Goldstein, D. B. & Clark, A. G. (1995). Microsatellite variation in North American populations of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research* **23**, 3882-3886.
- Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *The Journal of Heredity* **86(6)**, 1-2.
- Gove, D. & Magane, S. (1996). The status of sea turtle conservation in Mozambique. In Status of Sea Turtle Conservation in the Western Indian Ocean. In Status of Sea Turtle Conservation in the Western Indian Ocean (eds S.L. Humpfrey & R.V. Salm), pp 89–94. Regional Seas Reports and Studies, No 165. IUCN/UN Environment Programme, Nairobi, Kenya.
- Gregory, L. & Schmid, J. (2001). Stress responses and sexing of wild Kemp's ridley sea turtles (*Lepidochelys kempii*) in the Northeastern Gulf of Mexico. *General and Comparative Endocrinology* **124**, 66-74.
- Guissamulo, A. & Cockcroft, V. G. (2004). Ecology and population estimates of Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*) in Maputo Bay, Mozambique. *Aquatic Mammals* **30**, 104-102.
- Gyuris, E. (1993). Factors that control the emergence of green turtle hatchlings from the nest. *Wildlife Research* **20**, 345-353.
- Haldane, J. (1932). The causes of evolution, Harper Brothers, New York, 252 p.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hamann (2010). Global research priorities for sea turtles - informing management and conservation in 21st century.
- Hardy, G. H. (1908). Mendelian proportions in a mixed population. *Science* **28**, 49-50.

- Hare, M. P., Nunney, L., Schwartz, M. K., Ruzzante, D. E. & Burford, M. (2011). Understanding and estimating effective population size for practical application in marine species management. *Conservation Biology* **25**, 438-449.
- Harr, B., Zangerl, B., Brem, G. & Schlotterer, C. (1998). Conservation of locus specific microsatellite variability across species: a comparison of two *Drosophila* sibling species *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Molecular Biology Evolution* **15**, 176-184.
- Harry, J. & Briscoe, D. (1988). Multiple paternity in the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Journal of heredity* **79**, 96-99.
- Hatase, H., Takai, N., Matsuzawa, Y., Sakamoto, W., Omuta, K., Goto, K., Arai, N. & Fujiwara, T. (2002). Size-related differences in feeding habitat use of adult female loggerhead turtles *Caretta caretta* around Japan determined by stable isotope analyses and satellite telemetry. *Marine Ecology Progress Series* **23**, 273-281.
- Hatton, J. (1995). A status quo assessment of the coastal zone, Mozambique, Phase 1: Ponta do Ouro-Xai-Xai. IUCN, Maputo.
- Hawkes, L. A., Brodrick, A. C., Godfrey, M. H. & Godley, B. J. (2009). Climate change and marine turtles. *Endangered Species Research* **7**, 137-154.
- Hays, G. C., Speakman, J. R. & Hayes, J. P. (1992). The pattern of emergence by loggerhead turtle (*Caretta caretta*) hatchlings on Cephalonia, Greece. *Herpetologica*, 396-401.
- Hays, G. C., Broderick AC, Godley, B. J., Lovell, P., Martin, C., McConnell, B. J. & Richardson, S. (2002). Biphasal long-distance migration in green turtles. *Animal Behaviour* **64**, 895-898.
- Hays, G. C. (2010). Ontogenetic development of migration - lagrangian drift trajectories suggest a new paradigm for sea turtles. **7**, 1319-1327.
- Heithaus (2005). Biology of sea turtles under risk from tiger sharks at foraging ground.
- Heithaus, M. R., Frid, A. & Dill, L. M. (2002). Shark-inflicted injury frequencies, escape ability, and habitat use of green and loggerhead turtles. *Marine Biology* **140**, 229-236.
- Hirayama, R. (1998). Oldest known sea turtle. *Nature* **392**, 705-708.
- Hirth (1980). Some Aspects of the Nesting Behavior and Reproductive Biology of Sea Turtles. *Oxford Journals Science & Mathematics Integrative and Comparative Biology* **20**, 507-523.
- Hoekert, W., Neufeglise, H., Schouten, A. & Menken, S. (2002). Multiple paternity and female-biased mutation at a microsatellite locus in the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Heredity* **89**, 107-113.
- Houghton, J. & Hays, G. (2001). Asynchronous emergence by loggerhead turtle (*Caretta caretta*) hatchlings. *Naturwissenschaften* **88**, 133-136.
- Hughes, G., Bass, A. & Mentis, M. (1967). Further studies on marine turtles in Tongaland, I. *The Lammergeyer* **7**, 5-54.
- Hughes, G. R. (1971). Preliminary report on the sea turtles and dugongs of Mozambique. *Veterinária de Moçambique* **4**, 43-84.

- Hughes, G. R. (1974). "The sea turtles of south-east Africa. II The biology of the Tongaland loggerhead turtle *Caretta caretta* L. with comments on the leatherback turtle *Dermochelys coriacea* L. and the green turtle *Chelonia mydas* in the study region. Investigational Report 36." Oceanographic Research Institute, Durban.
- IUCN (2014). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. www.iucnredlist.org.
www.iucnredlist.org. Acedido a 29 November de 2014.
- Jarne, P. & Lagoda, P. (1996). Microsatellites: from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, 424-429.
- Jensen, M., Abreu-Grobois, F. A., Frydenberg, J. & Loeschcke, V. (2006). Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. non-arribada olive ridley sea turtle rookeries. *Molecular Ecology* **15**, 2567-2575.
- Jribi, I., Hamza, A., Saied, A. & Quergui, A. (2013). Sex ratio estimations of loggerhead marine turtle hatchlings by incubation duration and nest temperature at Sirte beaches (Libya). *Scientia Marina* **77**, 617-624.
- Jun-yi, L. (1982). Sperm retention in the lizard *Chamaeleo hoehnelii*. *Copeia*, 488-489.
- Kapurusinghe, T. (2006). Status and conservation of marine turtles in Sri Lanka. In: K. Shanker & B. C. Choudhury (Eds), Marine turtles of the Indian Subcontinent. Hyderabad.
- Kashi, Y. & Soller, M. (1999). Function roles of microsatellites and minisatellites. In Microsatellite: evolution and applications (Goldstein, D.B. & Schlotter, C. eds.). *Oxford Univ. Press, Oxford, U.K.*
- Katselidis, K. & Dimopoulos, D. (2000). The impact of tourist development on loggerhead nesting activity at Daphni beach, Zakynthos, Greece. In "Eighteenth International Sea Turtle Symposium", pp. 76.
- Kruglyak, S., Durrett, R. T., Schug, M. D. & Aquadro, C. F. (1998). Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **95**, 10774-10778.
- Kwok, S., Kellogg, D., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C. & Sninsky, J. (1990). Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research* **18**, 999-1005.
- Laurent, L., Casale, P., Bradai, M. N., Godley, B. J., Gerosa, G., Broderick, A. C., Schroth, W., Schierwater, B., Levy, A. M., Freggi, D., Abd El-Mawla, E. M., Hadoud, D. A., Gomati, H. E., Domingo, M., Hadjichristophorou, M., Kornaraky, L., Demirayak, F. & Gautier, C. H. (1998). Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery bycatch: a case study in the Mediterranean. *Molecular Ecology* **7**, 1529-1542.
- Leberg, P. L. (2002). Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology* **11**, 2445-2449.
- LeBuff Jr, C. R. (1974). Unusual nesting relocation in the loggerhead turtle, *Caretta caretta*. *Herpetologica*, 29-31.
- Lee, P. (2008). Molecular ecology of marine turtles: New approaches and future directions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **356**, 25-42.

- Lee, P. L. M. & Hays, G. C. (2004). Polyandry in a marine turtle: females make the best of a bad job. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **101**, 6530–6535.
- Lessios, H. A. (2008). The great American schism: divergence of marine organisms after the rise of the Central American Isthmus. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **39**, 63-91.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v. 5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451-1452.
- Limpus, C. J. (1985). A study of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, in eastern Australia. Ph.D. Dissertation, University of Queensland, St Lucia, Australia.
- Limpus, C. J. (1992). Estimation of tag loss in marine turtle research. *Wildlife Research* **19**, 457-469.
- Lohmann, K. J. (1991). Magnetic orientation by hatchling loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Journal of Experimental Biology* **155**.
- Lohmann, K. J. & Lohmann, C. M. F. (1994). Detecting of magnetic field inclination angle by sea turtles: a possible mechanism for determining latitude. *Journal of Experimental Biology* **194**, 23-32.
- Lohmann, K. J., Swartz, A. W. & Lohmann, C. M. F. (1995). Perception of ocean wave direction by sea turtles. *Journal of Experimental Biology* **198**, 1079-1085.
- Lohmann, K. J. (1996). Detection of magnetic field intensity by sea turtles. *Nature* **380**, 59-61.
- Louro, C. M. M., Pereira, M. A. & Costa, A. C. D. (2006). "Report on the Conservation Status of Marine Turtles in Mozambique.." Ministerio para a Coordenação da Ação Ambiental, Maputo, Mozambique.
- Louro, C. M. M., Videira, E. J. S., Pereira, M. A. M. & Fernandes, R. S. (2012). "Monitoria, marcação e conservação de tartarugas marinhas em Moçambique: relatório anual 2011/12." CTV/AICM, Maputo.
- Louro, C. M. M. & Fernandes, R. S. (2013). "Monitoria, marcação e conservação de tartarugas marinhas em Moçambique: relatório anual 2012/13." CTV, Maputo.
- Luikart, G. & Cornuet, J. M. (1998). Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* **12**, 228-237.
- Luschi, P., Hays, G. C., Seppia, C. D., Marsch, R. & Papi, F. (1998). The navigational feats of green sea turtles migrating from Ascension Island investigated by satellite telemetry. *Proceedings of the Royal Society B* **265**, 2279–2284.
- Luschi, P., Hughes, G., Mencacci, R., De Bernardi, E., Sale, A., Broker, R., Bouwer, M. & Papi, F. (2003). Satellite tracking of migrating loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) displaced in the open sea. *Marine Biology* **143**, 793-801.
- Luschii, P., Lutjeharm, J. R. E., Lambardi, R., Mencacci, R., Hughes, G. R. & Hays, G. C. (2006). A review of migratory behaviour of sea turtles off southeastern Africa. *South African Journal of Science* **102**, 51-58.

- Lutcavage, M. E., Plotkin, P., Witherington, B. E. & Lutz, P. L. (1997). Human impacts on sea turtle survival. In "Biology of Sea Turtles " (M. J. (eds. Lutz PL, ed.), pp. 387-409. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Lutjerhams, J. R. E., Biastoch, A., der Werf, P. M. v., Ridderinkhof, H. & de Ruijter, W. P. M. (2012). On the discontinuous nature of the Mozambique Current. *South African Journal of Science* **108**.
- Lutjerharm, J. R. E. (2006). "The Agulhas Current.," Berlin.
- Magane, S. & João, J. (2002). Local community involvement in monitoring and protection of sea turtles, Loggerhead (*Caretta caretta*) and Leatherback (*Dermochyles coriacea*) in Maputo Special Reserve, Mozambique. In "22nd Annual Symposium on Biology and Conservation of Sea Turtle", pp. 7, Miami.
- Magnusson, W. E. (1979). Production of an embryo by an *Acrochordus javanicus* isolated for seven years. *Copeia*, 744-745.
- Mansfield, K. & Putman, N. (2013). Oceanic Habits and Habitats. In: Wyneken J, Lohmann KJ, Musick JA, editors. In "Biology of Sea Turtles Volume III", pp. 189-211. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Margaritoulis, D. (2005). Nesting activity and reproductive output of loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, over 19 seasons (1984–2002) at Laganas Bay, Zakynthos, Greece: the largest rookery in the Mediterranean. *Chelonian Conservation and Biology* **4**, 916-929.
- Massinga, A. & Hatton, J. (1996). "Status of the Coastal Zone of Mozambique, ". In: Lundin, C. G. & O. Lindén (eds). Proceedings of the National Workshop on Integrated Coastal Zone Management in Mozambique. Inhaca Island and Maputo, Mozambique. 5-10 May 1996. 7-64 pp. MICOA/UEM/ Sida/The World Bank.
- Matsumoto, T., Yukawa, W., Nozari, Y., Nakashige, R., Shinya, M., Makino, S., Yagura, M., Ikuta, T., Imanishi, T., Inoko, H., Tamiya, G. & Gojobori, T. (2004). Novel algorithm for automated genotyping of microsatellites. *Nucleic Acids Research* **32**, 6069-6077.
- Maxwell, J. A., Motara, M. A. & Frank, G. H. (1988). A micro-environmental study of the effect of temperature on the sex ratios of the loggerhead turtle, *Caretta caretta*, from Tongaland, Natal. *S. Afr. Tydskr. Dierk* **23(4)**.
- McClellan, C. M. & Read, A. J. (2007). Complexity and variation in loggerhead sea turtle life history. *Biology Letters* **3**, 1-4.
- McGehee, M. A. (1979). Factors affecting the hatching success of loggerhead sea turtle eggs (*Caretta caretta caretta*). Master's Thesis, University of Central Florida, Orlando.
- Melo-Ferreira, J., Vilela, J., Fonseca, M. M., da Fonseca, R. R., Boursot, P. & Alves, P. C. (2014). The elusive nature of adaptive mitochondrial DNA evolution of an arctic lineage prone to frequent introgression. *Genome biology and evolution* **6**, 886-896.
- Menotti-Raymond, M. A. & O'Brien, S. (1995). Evolutionary conservation of ten microsatellites loci in four species of Felidae. *Journal of heredity* **86**, 319-322.
- Meylan (1982). Sea turtle migration-evidence from tag returns. In: Bjorndal KA (ed) Biology and conservation of sea turtles. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, pp 91±100.

- Miller, J. D. (1997). Reproduction in sea turtles. En: The biology of sea turtles. (eds. Lutz PL, Musick JA), p. 51-81, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Miller, J. D., Limpus, C. J. & Godfrey, M. H. (2003). "Nest site selection, oviposition, eggs, development, hatching, and emergence of loggerhead turtles."
- MolecularStation (2009). <http://www.molecularstation.com/pcr/>. Acedido em 2013.
- Monzón-Argüello, C. (2010). Estructura genética poblacional de las tortugas marinas en la Macaronesia Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria.
- Moore, M. & Ball, R. (2002). Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. *Molecular Ecology* **11**, 281-288.
- Moore, M. K., Bemiss, J. A., Rice, S. M., Quattro, J. M. & Woodley, C. M. (2003). Use of restriction fragment length polymorphisms to identify sea turtle eggs and cooked meats to species. *conservation genetics* **4**, 95-103.
- Moran, K., Bjorndal, K. & Bolten, A. (1999). Effects of the thermal environment on the temporal pattern of emergence of hatchling loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *Marine Ecology Progress Series* **189**, 251-261.
- Moritz, C. (1994). Defining 'evolutionary significant units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* **9**.
- Mortimer, J. A. (1990). The influence of beach sand characteristics on the nesting behavior and clutch survival of green turtles (*Chelonia mydas*). *Copeia*, 802-817.
- Mortimer, J. A. (2000). "Sea turtle conservation programmes: factors determining success or failure."
- Mrosovsky, N. (1968). Nocturnal emergence of hatchling sea turtles: control by thermal inhibition of activity. *Nature* **220**, 1338 - 1339.
- Mrosovsky, N. & Pieau, C. (1991). Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia-Reptilia* **12**, 169-179.
- Mrosovsky, N., Baptistotte, C. & Godfrey, M. H. (1999). Validation of incubation duration as an index of the sex ratio of hatchling sea turtles. *Canadian Journal of Zoology* **77**, 831-835.
- Mrosovsky, N., Kamel, S., Diez, C. & Van Dam, R. (2009). Methods of estimating natural sex ratios of sea turtles from incubation temperatures and laboratory data. *Endangered Species Research* **8**, 147-155.
- Muando, S. (2012). Influência do tráfego marítimo e natalidade sobre o comportamento dos golfinhos *Tursiops aduncus* (Ehrenberg 1832) na Ponta do Ouro, Sul de Moçambique, Universidade Eduardo Mondlane.
- Naro-Maciel, E. (2007). Testing Dispersal Hypotheses in Foraging Green Sea Turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. *Journal of heredity* **98**, 29-39.
- Naro-Maciel, E., Minh, L., 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**, 659-662.

- Nei, M., Maruyama, T. & Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 1-10.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. New York, NY: Columbia University Press.
- Nel, R. (2010). Sea turtles of KwaZulu-Natal: Data report for the 2009/10 season. *Durban: NMMU for Ezemvelo KZN Wildlife*.
- Nel, R., Punt, A. & Hughes, G. (2013). Are Coastal Protected Areas Always Effective in Achieving Population Recovery for Nesting Sea Turtles? *PLoS One* **8(5)**: e63525. .
- NMFS & NOAA (2009). Loggerhead Sea Turtle Range [disponível online http://www.nmfs.noaa.gov/pr/pdfs/rangemaps/loggerhead_turtle.pdf](http://www.nmfs.noaa.gov/pr/pdfs/rangemaps/loggerhead_turtle.pdf) acessado em Novembro de 2014.
- Norman, J. A., Moritz, C. & Limpus, C. J. (1994). Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. *Molecular Ecology* **3**, 363-373.
- Oliveira, E., Pádua, J., Zucchi, M., Vencovsky, R. & Vieira, M. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* **29**, 294-307.
- Olsson, M., Shine, R., Madsen, T., Gullberg, A. & Tegelström, H. (1996). Sperm selection by females. *Nature* **383**, 585-585.
- Oring, L. W., Fleischer, R. C., Reed, J. M. & Marsden, K. E. (1992). Cuckoldry through stored sperm in the sequentially polyandrous spotted sandpiper. *Nature* **359**, 631-633.
- Owens, D. W., Wibbels, T., Comuzzie, D., Rostal, D. & Limpus., C. (1989). Sea turtle reproductive chronology: The model and the questions. In S. A. Eckert, K. L. Eckert, and T. H. Richardson (compilers). *Proceedings of the ninth annual workshop on sea turtle biology and conservation*, 135-137. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-232.
- Papi, F., Luschi, P., Crosio, E. & Hughes, G. R. (1997). Satellite tracking experiments on the navigational ability and migratory behaviour of the loggerhead turtle *Caretta caretta*. *Marine Biology* **129**, 215-220.
- Papi, F., Luschi, P., Akesson, S., Capogrossi, S. & Hays, G. C. (2000). Open-sea migration of magnetically disturbed sea turtles. *Journal of Experimental Biology* **203**, 3435-3443.
- Payseur, B. A., Jing, P. & Haasl, R. J. (2011). A genomic portrait of human microsatellite variation. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 303-312.
- Pearse, D. E. & Avise, J. C. (2001). Turtle mating systems: behavior, sperm storage, and genetic paternity. *Journal of heredity* **92**, 206-211.
- Pereira, M. A. M. (2003). Recreational SCUBA diving and reef conservation in southern Mozambique. . MSc thesis, University of Natal, Durban.
- Pereira, M. A. M., Videira, E. J. S. & Abrantes, K. G. S. (2004). Peixes associados a recifes e zonas litorais do sul de Moçambique. *Jornal de Investigação e Advocacia Ambiental* **1**, 1-7.

- Pereira, M. A. M., Videira, E. J. S. & Narane, D. A. (2009). "Monitoring, tagging and conservation of marine turtles in Mozambique: 2008/09 annual report." AICM/GTT, Maputo.
- Pereira, M. A. M., Videira, E. J. S., Narane, D. A. & Louro, C. M. M. (2010). "Monitoring, tagging and conservation of marine turtles in Mozambique: 2009/10 annual report." AICM/GTT, Maputo.
- Pereira, M. A. M., Gonçalves, P. M. B., Videira, E. J. S., Louro, C. M. M. & Fernandes, R. S. (2013). Sand temperature influence on loggerhead (*Caretta caretta*) and leatherback (*Dermochelys coriacea*) hatchlings sex ratio in the Ponta do Ouro Partial Marine Reserve, southern Mozambique. (W. t. S. Symposium, ed.).
- Pereira, M. A. M. & Fernandes, R. S. (2014). "Monitoring of reef communities in the Ponta do Ouro Partial Marine Reserve: 2014." CTV, Maputo.
- Pereira, M. A. M., Fernandes, R. S., Videira, E. J. S., Louro, C. M. M. & Gonçalves, P. M. B. (2014a). Celebrating 20 years of marine turtle tagging and monitoring in southern Mozambique.
- Pereira, M. A. M., Videira, E. J. S., Gonçalves, P. M. B. & Fernandes, R. S. (2014b). Post-nesting migration of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Southern Mozambique. *African Sea Turtle Newsletter* **1**, 48-51.
- Petit, R. J., El Mousadik, A. & Pons, O. (1998). Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* **12**, 844-855.
- Phillips, K. P., Mortimer, J. A., Jolliffe, K. G., Jorgensen, T. H. & Richardson, D. S. (2014). Molecular techniques reveal cryptic life history and demographic processes of a critically endangered marine turtle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **455**, 29-37.
- Pilcher, N. J. & Saad, M. A. (2000). Sea turtles of Socotra. Report to the Senckenberg Research Institute, Frankfurt a.M., 15 pp.
- Piry, S., Luikart, G. & Cornuet, J.-M. (1999). Bottleneck: a program for detecting recent effective population size reductions from allele frequencies data. *Journal of heredity* **90**, 502-503.
- Pitman, R. L. & Dutton, P. H. (2004). Killer whale predation on a leatherback turtle in the northeast Pacific. *Pacific Science* **58**, 497-498.
- Prince, R. (1994). Shark Bay World Heritage Area: an important loggerhead nesting site. *Marine Turtle Newsletter* **67**, 5-6.
- Pritchard, P. C. H. (1996). Evolution, phylogeny and current status. In: Lutz, P.L., Musick, J.A. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Florida, pp. 1-28.
- Pritchard, J. K., Wena, X. & Falush, D. (2009). Documentation for structure software: Version 2.3.
- Quartly, G. D. & Srokosz, M. A. (2004). Eddies in the southern Mozambique Channel. *Deep-Sea Research II* **51**, 69-83.
- Quartly, G. D., Buck, J. J. H., Srokosz, M. A. & Coward, A. C. (2006). Eddies around Madagascar – the retroreflection re-considered. *Journal of Marine Systems* **63**, 115-129.

- Rakotonirina, B. (2001). Sea turtles in Madagascar. p. 38-39. In: S. Ciccione, D. Roos & J.-Y. Le Gall (Eds), Knowledge and conservation of sea turtles in the South-west Indian Ocean. Proceedings of a workshop held at Saint-Leu, Île de la Réunion, November-December 1999, Études et Colloques du CEDTM. – IFREMER, La Réunion.
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995). Genepop (Version 1.2). Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity* **43**, 223-225.
- Rees, A. & Margaritoulis, D. (2004). Beach temperatures, incubation durations and estimated hatchling sex ratio for loggerhead sea turtle nests in southern Kyparissia Bay, Greece. *Testudo* **6**, 23-36.
- Rees, A. F., Saady, S. A., Broderick, A. C., Coyne, M. S., Papathanasopoulou, N. & Godley, B. J. (2010). Behavioural polymorphism in one of the world's largest populations of loggerhead sea turtles *Caretta caretta*. *Marine Ecology Progress Series* **418**, 201-212.
- Reich, K., Bjorndal KA, Frick, M., Witherington BE, Johnson C & AB, B. (2010). Polymodal foraging in adult female loggerheads (*Caretta caretta*). *Marine Biology* **157**, 113-121.
- Reis, E. C., Soares, L. S., Vargas, S. M., Santos, F. R., Young, R. J., Bjorndal, K. A., Bolten, A. B. & Lôbo-Hajdu, G. (2010). Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. *conservation genetics* **11**, 1467-1477.
- Rivalan, P., Dutton, P., Baudry, E., Roden, S. & Girondot, M. (2006). Demographic scenario inferred from genetic data in leatherback turtles nesting in French Guiana and Suriname. *Biological Conservation* **130**, 1-9.
- Roark, A. M., Bjorndal, K. A. & Bolten, A. B. (2009). Compensatory responses to food restriction in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*). *Ecology* **90**, 2524-2534.
- 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 Society of America* **166**, 1857-1870.
- Robertson, W., Schleyer, M., Fielding, P., Tomalin, B., Beckley, L., Fennessy, S., Van der Elst, R., Bandeira, S., Macia, A. & Gove, D. (1996). Inshore marine resources and associated opportunities for development of the coast of Southern Mozambique: Ponta do Ouro to Cabo de Santa Maria. *Unpublished Report*.
- Rodríguez-Zárate, C. J., Rocha-Olivares, A. & Beheregaray, L. B. (2013). Genetic signature of a recent metapopulation bottleneck in the olive ridley turtle (*Lepidochelys olivacea*) after intensive commercial exploitation in Mexico. *Biological Conservation* **168** 10-18.
- Ross & Barwani (1982). Review of sea turtles in the Arabian area. p. 373-383. In: K. A. Bjorndal (Ed.), Biology and Conservation of Sea Turtles. Washington D.
- Sætre, R. & Silva, R. d. P. (1979). "The Marine Fish Resources of Mozambique. Reports on survey with the R/V Dr Fridtjof Nansen.." Institute of marine Research, Bergen, Maputo.
- Saetre, R. & da Silva, A. J. (1982). "Water mass and circulation of the Mozambique Channel." Instituto de Desenvolvimento Pesqueiro, Maputo.

- Santibanez-Koref, M. F., Gang, R. & Hancock, J. M. (2001). A relationship between lengths of microsatellites and nearby substitution rates in mammalian genomes. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 2119-2123.
- Schiller, A., Oke, P. R., Brassington, G., Entel, M., Fiedler, R., Griffin, D. A. & Mansbridge, J. (2008). Eddy-resolving ocean circulation in the Asian–Australian region inferred from an ocean reanalysis effort. *Progress in Oceanography* **76**, 334-365.
- Schlotterer, C. & Tauz, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* **20**, 211-215.
- Schott, F. & McCreary, J. P. (2001). The monsoon circulation of the Indian Ocean. *Progress in Oceanography* **51** 1-123.
- Schott, F. A., Xie, S. P. & McCreary, P. J. (2009). Indian Ocean circulation and climate variability. *Reviews of Geophysics* **47**, 1-46.
- Schouten, M., De Ruijter, W. & Van Leeuwen, P. (2002). Upstream control of Agulhas ring shedding. *Journal of Geophysical Research* **107**, 3109.
- Schouten, M., De Ruijter, W., Van Leeuwen, P. & Ridderinkhof, H. (2003). Eddies and variability in the Mozambique Channel. *Deep-Sea Research II Part II* **50**, 1987-2003.
- Schroeder, B., Foley, A. & Bagley, D. (2003). Nesting patterns, reproductive migrations, and adult foraging areas of loggerhead turtles. In: *Loggerhead Sea Turtles* (eds. Bolten AB, Witherington BE), p. 114-124, Smithsonian Books, Washington, D.C.
- Schroth, W., Streit, B. & Schierwater, B. (1996). Evolutionary handicap for turtles. *Nature* **384**, 521-522
- Scott, R., Marsh, R. & Hays, G. C. (2012). Life in the really slow lane: loggerhead sea turtles mature late relative to other reptiles. *Functional Ecology* **26**, 227-235.
- Selkoe, K. A. & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**, 615-629.
- Sénegas, J. B., Hochscheid, S., Groul, J.-M., Lagarrigue, B. & Bentivegna, F. (2009). Discovery of the northernmost loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) nest. *Marine Biodiversity Records* **2**, 1-4.
- Sete, C., Ruby, J. & Dove, V. (2002). "Seasonal variation of tides, currents, salinity and temperature along the coast of Mozambique." Unesco OdinAfrica.
- Shamblin, Faircloth, B., Dodd, M., Wood-Jones, A., Castleberry, S., Carroll, J. & Nairn, C. (2007). Tetranucleotide microsatellites from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology Notes* **7**, 784-787.
- Shamblin, B., Bolten, A., Abreu-Grobois, F., Bjørndal, K., Cardona, L., Carreras, C., Clusa, M., Monzón-Arguello, C., Nairn, C. J., Nielsen, J. T., Nel, R., Soares, L. S., Stewart, K. R., Vilaça, S. T., Turkozan, O., Yilmaz, C. & Dutton, P. H. (2014). Geographic Patterns of Genetic Variation in a Broadly Distributed Marine Vertebrate: New Insights into Loggerhead Turtle Stock Structure from Expanded Mitochondrial DNA Sequences. *PLoS One* **9**, e85956
- Shamblin, B. M., Dodd, M. G., Bagley, D. A., Ehrhart, L. M., Tucker, A. D., Johnson, C., Carthy, R. R., Scarpino, R. A., McMichael, E. & Addison, D. S. (2011). Genetic

structure of the southeastern United States loggerhead turtle nesting aggregation: evidence of additional structure within the peninsular Florida recovery unit. *Marine Biology* **158**, 571-587.

- Shamblin, B. M., Bolten, A. B., Bjorndal, 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. (2012). Expanded mitochondrial control region sequences increase resolution of stock structure among North Atlantic loggerhead turtle rookeries. *Marine Ecology Progress Series* **469**, 145-160.
- Shanker, K., Choudhury, B. C. & Andrews, H. V. (2003). Sea turtle conservation: beach management and hatchery programmes. A COI-UNDP Project Manual. Centre for Herpetology/Madras Crocodile Bank Trust. Mamallapuram, Tamil Nadu, India.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**, 457-462.
- Slatkin, M. (2008). Linkage disequilibrium [mdash] understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet* **9**, 477-485.
- Spotila, J. R., Standora, E. A., Morreale, S. J. & Ruiz, G. J. (1987). Temperature dependent sex determination in the green turtle (*Chelonia mydas*): effects on the sex ratio on a natural nesting beach. *Herpetologica*, 74-81.
- Standora, E. A. & Spotila, J. R. (1985). Temperature dependent sex determination in sea turtles. *Copeia*, 711-722.
- Stramma, L. & Lutjeharms, J. R. E. (1997). The flow field of the subtropical gyre of the South Indian Ocean. *Journal of Geophysical Research* **102**, 5513-5530.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L. P. & Bouvet, J. (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* **24**, 3189-3194.
- Tallmon, D. A., Koyuk, A., Luikart, G. & Beaumont, M. A. (2008). Computer programs: ONeSAMP: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation. *Molecular Ecology Resources* **8**, 299-301.
- Tautz, D. & Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* **12**, 4127-4138.
- Ternon, J. F., Bach, P., Barlow, R., Huggett, J., Jaquemet, S., Marsac, F., Ménard, F., Penven, P., Potier, M. & Roberts, M. J. (2013). The Mozambique Channel: From physics to upper trophic levels. *Deep-Sea Research II* **100**, 1-9.
- Theissinger, K., FitzSimmons, N., Limpus, C., Parmenter, C. & Phillott, A. (2009). Mating system, multiple paternity and effective population size in the endemic flatback turtle (*Natator depressus*) in Australia. *conservation genetics* **10**, 329-346.
- Thorbjarnarson, J., Lagueux, C., Bolze, D., Klemens, M. & Meylan, A. (2000). Human use of turtles: a worldwide perspective. *Turtle conservation*, 33-84.
- Tiwari, M. & Bjorndal, K. A. (2000). Variation in morphology and reproduction in loggerheads, *Caretta caretta*, nesting in the United States, Brazil, and Greece. *Herpetologica* **56**, 343-356.

- Tucek, J., Nel, R., Girondot, M. & Hughes, G. (2014). Age-size relationship at reproduction of South African female loggerhead turtles *Caretta caretta*. *Endangered Species Research* **23**, 167-175.
- USFWS-NOAA (2011). Endangered and Threatened Species; Determination of Nine Distinct Population Segments of Loggerhead Sea Turtles as Endangered or Threatened. *Federal Register* **184**, 58868-58952.
- Valenzuela, N., Adams, D. C., Bowden, E. & Gauger, A. C. (2004). Geometric Morphometric Sex Estimation for Hatchling Turtles: A Powerful Alternative for Detecting Subtle Sexual Shape Dimorphism. *Copeia* **4** 735-742.
- Valenzuela, N. & Adams, D. C. A. (2011). Chromosome number and sex determination coevolve in turtles. *Evolution* **65**, 1808–1813.
- Van Buskirk, J. & Crowder, L. B. (1994). Life-History Variation in Marine Turtles. *Copeia* **1**, 66-81.
- Van Oosterhout, C. V., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. & Shipley, P. (2004). Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.
- Velez-Zuazo, X., Ramos, W. D., van Dam, R. P., Diez, C. E., Abreu-Grobois, A. & Mcmillan, W. O. (2008). Dispersal, recruitment and migratory behaviour in a hawksbill sea turtle aggregation. *Molecular Ecology* **17**, 839-853.
- Videira, E. J., Pereira, M. A., Louro, C. M. & Narane, D. A. (2008). "Monitoria, marcação e conservação de tartarugas marinhas em Moçambique: dados históricos e relatório anual 2007/08.." AICM/CTV, Maputo.
- Videira, E. J. S., Pereira, M. A. M. & Louro, C. M. M. (2011). "Monitoria, marcação e conservação em Moçambique: relatório anual 2010/11." AICM/GTT, Maputo.
- Wallace, B. P., DiMatteo, A. D., Hurley, B. J., Finkbeiner, E. M., Bolten, A. B., Chaloupka, M. Y., Hutchinson, B. J., Abreu-Grobois, F. A., Amorocho, D., Bjorndal, K. A., Bourjea, J., Bowen, B. W., as, R. B. o. D., Casale, P., Choudhury, B. C., Costa, A., Dutton, P. H., Fallabrino, A., Girard, A., Marc Girondot, Godfrey, M. H., Hamann, M., López-Mendilaharsu, M., Marcovaldi, M. A., Mortimer, J. A., Musick, J. A., Nel, R., Pilcher, N. J., Seminoff, J. A., Troe'ng, S., Witherington, B. & Mast, R. B. (2010). Regional Management Units for Marine Turtles: A Novel Framework for Prioritizing Conservation and Research across Multiple Scales. *PLoS One* **5** e15465.
- Wallace, B. P., DiMatteo, A. D., Bolten, A. B., Chaloupka, M. Y., Hutchinson, B. J., Abreu-Grobois, F. A., Mortimer, J. A., Seminoff, J. A., Amorocho, D. & Bjorndal, K. A. (2011). Global conservation priorities for marine turtles. *PLoS One* **6**, e24510.
- Wang, J. (2009). A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. *Molecular Ecology* **18**, 2148-2164.
- Waples, R. S. (1989). A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics* **121**, 379-391.
- Waples, R. S. (2006). A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci*. *conservation genetics* **7**, 167-184.

- Waples, R. S. & Do, C. (2008). LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* **8**, 753-756.
- Watanabe, K. K., Hatase, H., Kinoshita, M., Omuta, K., Bando, T., Kamezaki, N., Sato, K., Matsuzawa, Y., Goto, K. & Nakashima, Y. (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.
- Wattier, R., Engel, C., SAUMITOU-LAPRADE, P. & Valero, M. (1998). Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* **7**, 1569-1573.
- Weber, J. L., Kitek, A. E., May, P. E., Polymeropoulos, M. H. & Ledbetter, S. (1990). Dinucleotide repeat polymorphism at the DXS453, DXS454 and DXS458 loci. *Nucleic Acids Research* **18**, 4037.
- Weems, R. (1988). Paleocene turtles from the Aquia and Brightseat formations, with a discussion of their bearing on sea turtle evolution and phylogeny. *Proceedings of the Biological Society of Washington* **101**, 109-145.
- Weinberg, W. (1908). Über vererbungsgesetze beim menschen. *Molecular and General Genetics MGG* **1**, 440-460.
- White, G. C. & Burnham, K. P. (1999). Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird study* **46**, S120-S139.
- Whitmore, C. P. & Dutton, P. H. (1985). Infertility, embryonic mortality and nest-site selection in leatherback and green sea turtles in Suriname. *Biological Conservation* **34**, 251-272.
- Wibbels, T., Owens, D. W., Limpus, C. J., Reed, P. C. & Amoss Jr., M. S. (1990). Seasonal changes in serum gonadal steroids associated with migration, mating, and nesting in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *General and Comparative Endocrinology* **79**, 154-164.
- Willems, T. F., Gymrek, M., Highnam, G., Mittelman, D. & Erlich, Y. (2014). The Landscape of Human STR Variation. *Genome Research* **24**, 1894-1904.
- Witherington, B. E., Bjorndal, K. A. & McCabe, C. M. (1990). Temporal pattern of nocturnal emergence of loggerhead turtle hatchlings from natural nests. *Copeia*, 1165-1168.
- Witherington, B. E. (1999). Reducing threats to nesting habitat. *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication* **4**, 179-183.
- Witzell, W. N. (1987). Selective predation on large cheloniid sea turtles by tiger sharks (*Galeocerdo cuvier*). *Japanese Journal Herpetology* **12**, 22-29.
- Wright (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics* **15**, 323-354.
- Wright (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**, 395-420.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **28**, 139-156.

- Wyneken, J. & Salmon, M. (1992). Frenzy and postfrenzy swimming activity in loggerhead, green, and leatherback hatchling sea turtles. *Copeia*, 478-484.
- Wyneken, J., Epperly, S. P., Crowder, L. B., Vaughan, J. & Esper, K. B. (2007). Determining sex in posthatchling loggerhead sea turtles using multiple gonadal and accessory duct characteristics. *Herpetologica* **63**, 19-30.
- Yilmaz, C., Turkozan, O. & Bardakci, F. (2011). Genetic structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) populations in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology* **39**, 266-276.
- Yntema, C. & Mrosovsky, N. (1980). Sexual differentiation in hatchling loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. *Herpetologica* **63**, 19-30.
- Yntema, C. & Mrosovsky, N. (1982). Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. *Canadian Journal of Zoology* **60**, 1012-1016.
- Zangerl, R. (1980). Patterns of phylogenetic differentiation in the toxochelyid and cheloniid sea turtles. *American Zoologist* **20**, 585-596.
- Zbinden, J. A., Margaritoulis, D. & Arlettaz, R. (2006). Metabolic heating in Mediterranean loggerhead sea turtle clutches. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **334**, 151-157.
- Zbinden, J. A., Davy, C., Margaritoulis, D. & Arlettaz, R. (2007). Large spatial variation and female bias in the estimated sex ratio of loggerhead sea turtle hatchlings of a Mediterranean rookery. *Endangered Species Research* **3**, 305-312.

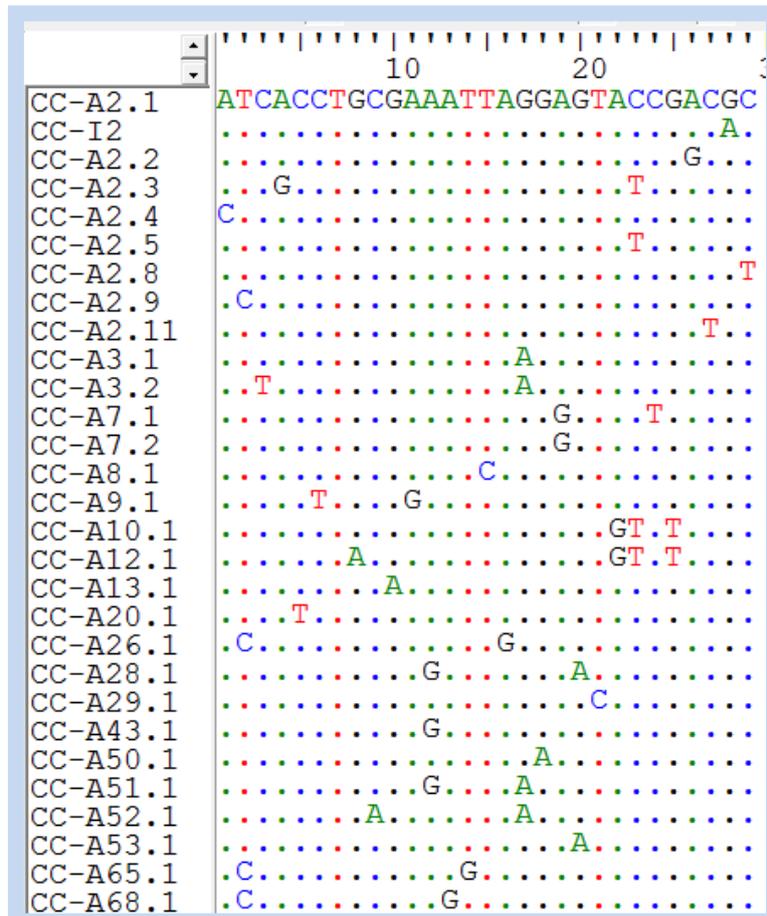
ANEXOS

Anexo 1 Referência no Genbank, dos haplótipos de tartaruga cabeçuda (*Caretta caretta*) usados no presente estudo.

Haplótipo	Referência Genbank	Referência
CC-A1.1	EU179436	Monzon-Arguello <i>et al.</i> (2010)
CC-A1.2	EU179437	Shamblin (2012)
CC-A1.3	EU179438	Monzon-Arguello <i>et al.</i> (2010)
CC-A1.4	EU179439	Monzon-Arguello <i>et al.</i> (2010)
CC-A1.5	EU483081	Monzon-Arguello <i>et al.</i> (2010)
CC-A1.6	FM244620	Garofalo <i>et al.</i> (2013)
CC-A1.7	KC310493	Shamblin <i>et al.</i> (2014)
CC-A1.8	KC310494	Shamblin <i>et al.</i> (2014)
CC-A1.9	KF021625	Stiebens <i>et al.</i> (2013)
CC-A2.1	EU179445	Monzon-Arguello <i>et al.</i> (2010)
CC-A2.2	EU179446	Shamblin (2012)
CC-A2.3	EU179447	Shamblin (2012)
CC-A2.4	EU179448	Shamblin (2012)
CC-A2.5	EU179449	Shamblin (2012)
CC-A2.8	FM200217	Clusa (2013)
CC-A2.9	GQ344479	Saied <i>et al.</i> (2012) e Garofalo <i>et al.</i> (2013)
CC-A2.11	JQ340911	Shamblin (2012)
CC-A3.1	EU179455	Shamblin (2012)
CC-A3.2	HM179461	Yilmaz <i>et al.</i> (2011)
CC-A4.1	KF840723	Shamblin <i>et al.</i> (2014)
CC-A4.2	KF840725	Shamblin <i>et al.</i> (2014)
CC-A5.1	EU179459	Shamblin (2012)
CC-A6.1	JQ350705	Yilmaz <i>et al.</i> (2012)
CC-A7.1	EU179460	Shamblin (2012)
CC-A7.2	EU179461	Shamblin (2012)
CC-A8.1	EU179462	Shamblin (2012)
CC-A9.1	EU179463	Shamblin (2012)
CC-A10.1	EU179440	Shamblin (2012)
CC-A10.4	JQ350706	Yilmaz <i>et al.</i> (2012)
CC-A11.2	FJ817091	Monzon-Arguello <i>et al.</i> (2010)
CC-A11.3	JF922016	Shamblin (2012)
CC-A11.5	JQ082299	Shamblin (2012)
CC-A11.6	KF770994	B. Shamblin <i>et al.</i> (2014)
CC-A12.1	JF922017	Shamblin (2012)
CC-A13.1	EU179442	Shamblin (2012)
CC-A14.1	EU179443	Shamblin (2012)
CC-A17.1	EU483082	Monzon-Arguello <i>et al.</i> (2010)
CC-A17.2	EU483083	Monzon-Arguello <i>et al.</i> (2010)
CC-A20.1	EU179452	Shamblin (2012)
CC-A24.1	KF840726	Shamblin <i>et al.</i> (2014)
CC-A21.1	EU179453	Shamblin (2012)
CC-A26.1	HQ728521	Saied <i>et al.</i> (2012)
CC-A27.1	EU179454	Shamblin (2012)
CC-A28.1	FM955539	Garofalo <i>et al.</i> (2013)

CC-A29.1	JF837821	Clusa (2013)
CC-A32.1	JF837822	Clusa (2013)
CC-A36.1	EU179456	Shamblin (2012)
CC-A36.2	JF922018	Shamblin (2012)
CC-A41.1	EU179458	Shamblin (2012)
CC-A42.1	JF922019	Shamblin (2012)
CC-A43.1	HQ908657	Shamblin (2012)
CC-A47.1	EU483084	Monzon-Arguello <i>et al.</i> (2010)
CC-A50.1	JF837823	Clusa (2013)
CC-A51.1	HQ908658	Shamblin (2012)
CC-A52.1	HM366724	Yilmaz <i>et al.</i> (2012)
CC-A53.1	HM179462	Yilmaz <i>et al.</i> (2012)
CC-A59.1	JF922014	Shamblin (2012)
CC-A60.1	JF922015	Shamblin (2012)
CC-A65.1	JF837824	Clusa (2013)
CC-A68.1	JN039304	Saied <i>et al.</i> (2012)
CC-A69.1	KF021626	Stiebens <i>et al.</i> (2013)
CCP1 ou CC-A34	EF0033112	Boyle & Waycott (unpublished)
CCP2	AB548644	Watanabe <i>et al.</i> (2011)
CCP5 ou CC-A33	EF0033113.1	Boyle & Waycott (unpublished)

Anexo 2 -Alinhamento feito no programa Bioedit de 29 haplótipos do haplogrupo II com 29 sítios polimórficos de sequências com um mínimo de 758 pares de bases. Uma vez que eliminou-se os sítios não polimórficos os números não reflectem a posição do nucleótido.



Anexo 3 -Alinhamento feito no programa Bioedit de 79 haplótipos com 81 sítios polimórficos de sequências com um mínimo de 659 pares de bases. Uma vez que eliminou-se os sítios não polimórficos os números não reflectem a posição do nucleótido.

	10	20	30	40	50	60	70	80
CC-A1.1	ACGCATGTTAGTATCAGAAATAAAATCCCGCAGCCTCAGGCCATGC	AGATAAC	CCGTAAAGAGAGGAAGTCGTGG					
CC-A1.2							A	A
CC-A1.3							T	A
CC-A1.4							T	A
CC-A1.5							T	A
CC-A1.6							T	A
CC-A1.7					N		T	AA
CC-A1.8							T	A
CC-A1.9							T	A
CC-A2.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A2.2	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A2.3	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A2.4	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A2.5	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A2.6	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A2.7	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	TC	CRA	
CC-A2.8	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A2.9	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A2.10	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	T	CRA	
CC-A2.11	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	CT	CRA	
CC-A3.1	TA CACCG	G	TA AT T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A3.2	TA CACCG	G	TA AT T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A4.1	T		A				T	AA
CC-A4.2	T		A				T	AA
CC-A5.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A6.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A7.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	GG GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A7.2	TA CACCG	G	TA T T A T G	GG GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A8.1	TA CACCG	G	A	T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA
CC-A9.1	TA CAC G	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A10.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	T	CRA	
CC-A10.3	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A10.4	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A11.1			A				T	A
CC-A11.2			A				T	A
CC-A11.3			A				T	A
CC-A11.4			A				T	A
CC-A11.5			A				T	A
CC-A12.1	TA CACC	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A13.1	TA CACCGA	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A14.1	A		A				T	AA
CC-A15.1			A				T	AA
CC-A17.1			A				T	AA
CC-A17.2	TA CACCG	A G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A18.1	TA ACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A20.1			A				T	AA
CC-A21.1	T		A				T	AA
CC-A24.1	A CACCG	G	T T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A26.1			T				T	AA
CC-A27.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A28.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A29.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A7.2	TA CACCG	G	TA T T A T G	GG GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A8.1	TA CACCG	G	A	T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA
CC-A9.1	TA CAC G	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A10.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A10.3	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A10.4	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A11.1			A				T	AA
CC-A11.2			A				T	AA
CC-A11.3			A				T	AA
CC-A11.4			A				T	AA
CC-A11.5			A				T	AA
CC-A12.1	TA CACC	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A13.1	TA CACCGA	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A14.1	A		A				T	AA
CC-A15.1			A				T	AA
CC-A17.1			A				T	AA
CC-A17.2	TA CACCG	A G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A18.1	TA ACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A20.1			A				T	AA
CC-A21.1	T		A				T	AA
CC-A24.1	A CACCG	G	T T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A26.1			T				T	AA
CC-A27.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A28.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A29.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A31.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A32.1	TA CACCG	G	TA AT T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A36.1	TA CACCG	G	TA AT T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A36.2	TA CACCG	G	TA AT T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A41.1			A				T	AA
CC-A42.1	TA CAC G	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A43.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A44.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A47.1			A				T	AA
CC-A49.1	TA CAC G	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A50.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A51.1	TA CACCG	G	TA AT T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A52.1	TA CACCG	G	TA AT T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A53.1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A59.1			A				T	AA
CC-A60.1	TA CACCG	C	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A61.1	TA CACC	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A62.1			A				T	AA
CC-A63.1	TA CACCG	G	T T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A64.1	A CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A65.1	A CAC G	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A66.1	A CAC G	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A67.1	A CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A68.1	A CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
CC-A69.1	A CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
T485Mz-CC-I1	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	
T492Mz	TA CACCG	G	TA T T A T G	G GC GTGCAAGT	GGAGAGAAG	C	CRA	

Anexo 4 - Alinhamento feito no programa Bioedit de 23 haplótipos com 49 sítios polimórficos de sequências com um mínimo de 477 pares de bases. Uma vez que eliminou-se os sítios não polimórficos os números não reflectem a posição do nucleótido.

