



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Análise Morfológica e Filogeográfica em Jabutis Brasileiros (Testudines)

Tiago Lucena da Silva

DOUTORADO



**PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL**

2015

*Biologia
Estrutural*

Tiago Lucena da Silva

Análise Morfológica e Filogeográfica em Jabutis Brasileiros (Testudines)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Animal junto ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP/IBILCE.

Silva, Tiago Lucena da.

Análise Morfológica e Filogeográfica em Jabutis Brasileiros
(Testudines) Tiago Lucena da Silva - São José do Rio Preto: [s.n.], 2015.
186 f.: 30 il.; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Taxonomia. 2. Morfologia de Grupos recentes. 3. Testudines. 4.
Chelonoidis (Testudines) I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II.
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas. III. Análise Morfológica e Filogeográfica em Jabutis Brasileiros
(Testudines).

CDU -

Tiago Lucena da Silva

Análise Morfológica e Filogeográfica em Jabutis Brasileiros (Testudines)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Animal junto ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP/IBILCE.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos (Orientadora)
Professor Assistente Doutor
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP - São José do Rio Preto

Prof. Dr. André Luis da Silva Casas
Professor Adjunto
Universidade Federal do Acre - UFAC

Prof. Dr. Richard Carl Vogt
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA

Prof^a Dr^a Lilian Castiglioni
Professor Adjunto Doutor
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP

Prof. Dr. Luis Henrique Florindo
Professor Assistente Doutor
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 25 de Fevereiro de 2015

Este trabalho foi desenvolvido junto ao Centro de Estudos de Quelônios (CEQ), do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto, e junto ao Laboratório de Biologia Animal, do Instituto de Biodiversidade, Universidade Federal do Acre (UFAC), Câmpus Floresta, Cruzeiro do Sul - AC.

Dedico este trabalho:

A minha família, meus pais, Sandra Regina da Silva e Edson Lucena da Silva, e aos meus irmãos: Bruna Lucena da Silva, Lucas Lucena da Silva, Yasmim Lucena da Silva e Kalel Lucena da Silva, e ao meu sobrinho Kauan Vieira Lucena da Silva, por sempre incentivarem os meus estudos, por todo amor, carinho, compreensão e apoio.

Agradeço por acreditarem em mim, e, especialmente, pelo apoio nos momentos de desânimo, dificuldades e incertezas, e pela compreensão, mesmo no momento em que foi preciso me afastar para tão longe.

Agradecimentos

Aos meus pais, Sandra Regina da Silva e Edson Lucena da Silva, pela educação, ensinamentos, amor, carinho, amizade, confiança e exemplos de vida. Aos meus irmãos, Bruna Lucena da Silva, Lucas Lucena da Silva, Yasmim Lucena da Silva e Kafel Lucena da Silva, e ao meu sobrinho Kauan Vieira Lucena da Silva pelo carinho, respeito, apoio e incentivo.

Aos meus avós maternos, Aparecido Herculano da Silva e Edis Herculano da Silva (in memoriam) e a minha avó paterna, Elisabete Candida da Silva, por mesmo a distância sempre incentivarem meus estudos e principalmente pelo carinho e confiança.

À orientação da Professora Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos, pela amizade, oportunidades, confiança, paciência, ensinamentos, orientação e pela formação não só acadêmica e profissional, mas também pessoal. Por me acolher e me ensinar o caminho da pesquisa. Por me aconselhar no meu trabalho, pela paciência e pelos conhecimentos que me transmitiu. Muito obrigado, nunca esquecerei tudo o que fez por mim!

À família Bonini-Domingos, Luiz Henrique, Ana Luiza, Ana Carolina, Marcos, D. Nadir e Lucas, pela confiança, amizade e momentos de descontração.

Ao professor Dr. Luiz Dino Vizotto, pela participação constante neste projeto de pesquisa, pela grande amizade, por ser um grande exemplo profissional a ser seguido, e por estar sempre presente nos momentos difíceis da minha vida pessoal e profissional.

Ao Professores Doutores, André Luís da Silva Casas, Richard Carl Vogt, Lillian Castiglioni e Luis Henrique Florindo por se disponibilizarem a avaliar e contrubuir com esse trabalho e com minha formação profissional.

À Dra. Larissa Paola Rodrigues Venancio, pela valiosa contribuição ao longo de todas as etapas desse trabalho, e ao longo de toda minha vida acadêmica, sou grato pelos conselhos e ensinamentos, e principalmente, pela imensa amizade.

Ao amigo, Yuri Campanholo Grandinete pela inestimável ajuda e sugestões nas análises filogenéticas, muito obrigado.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), Danilo, Gisele, Paula, Renan, Luis Felipe, Belini, Lidiane, Willian, Jéssica, e a todos que passaram pelo laboratório, pelos inúmeros momentos de descontração, aprendizagem e amizade.

Aos amigos de Centro de Estudos de Quelônios (CEQ), Maria Isabel Afonso da Silva, Vanessa Leiko Oikawa Cardoso, Nathália Rossigali Alves da Costa, Vinicius Augusto Gobbe Moschetta, Tayrone Luis Coutro Pereira, Jessika Basílio Bacchi, Gabriela de Sousa Martins e Larissa Paola Rodrigues Venancio, pela ajuda constante ao longo do desenvolvimento desse trabalho, pela amizade, companheirismo e por sempre poder contar com vocês. O bom convívio que tivemos nesse período fez mais leve o peso das responsabilidades e cobranças que o programa de pós-graduação trás.

Aos amigos da Universidade Federal do Acre (UFAC), Leonardo, Denis, Hugo, Sonaira, Maria Isabel, Josileide, Romário, Fabrício,

Wiliam, Tatiane, Sérgio, Paulo, Reginaldo, Negri, André, Lucena, Douglas, Daniela, pelas conversas, trocas de experiência e momentos de descontração, que tornaram mais fáceis os dias nessa nova vida.

À equipe do Laboratório de Biologia Animal da Universidade Federal do Acre (UFAC), André, Douglas, Lucena, Máira, Marilene, Daliana, Rebeca, Tamires, Tayrine, Greiciane, Ana Cláudia, Helen, Bruna, Laura, Tiago, Ronaldo e Jeniffer, pelas trocas de experiências e aprendizados, por tudo que já conquistamos juntos, e por todo empenho em fazer ciência.

À instituição Ufac por permitir meu afastamento e incentivar a conclusão deste trabalho.

À todos os meus amigos que, direta ou indiretamente, auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, quer seja auxiliando na elaboração do mesmo, ou pela convivência, pela amizade, pelo companheirismo, pelos ensinamentos e por estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida.

E a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

À FAPESP e à FAPAC pela bolsa de estudos e auxílio à pesquisa.

À Deus pela vida e pelo caminho que pude percorrer.

Agradecimentos Institucionais

Agradeço imensamente a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho, por meio do fomento ao Mestrado (Processo nº 2009/04466-9), Doutorado (Processo nº 2010/19785-0), além do projeto de iniciação científica “Vocalização e preferência sexual na taxonomia de Testudinidae brasileiros” (Processo nº 2012/04937-4), associado a esta Tese, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (MCTI/CNPq nº 14/2012) Edital Universal Faixa C (475074/2012-2), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Acre (FAPAC) (Edital 005/2013).

*“No fim tudo dá certo, se não deu certo
é porque ainda não chegou ao fim”
(Fernando Sabino)*

*"Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais,
e, neste dia, um crime contra um animal será considerado
um crime contra a humanidade".
Leonardo da Vinci (1452-1519)*

*"Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de
gigantes" (Isaac Newton)*

*"Nada em Biologia faz sentido exceto à luz da Evolução"
(Theodosius Dobzhansky)*



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Análise Morfológica e Filogeográfica em Jabutis Brasileiros (Testudinidae)

Orientando: Tiago Lucena da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Animal junto ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP/IBILCE.

São José do Rio Preto

2015

SILVA, T.L. **Análise Morfológica e Filogeográfica em Jabutis Brasileiros (Testudinidae).** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto - SP, 186p., 2015.

Esse estudo avaliou dados sobre: biogeografia, vocalização, morfologia, citogenética, perfil de hemoglobinas e do marcador molecular *citocromo b* em jabutis brasileiros, no intuito de explorar o potencial taxonômico discriminativo das metodologias avaliadas. Duas espécies de jabutis são descritas para o Brasil, sendo elas, *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, entretanto, observou-se, inicialmente com base em caracteres morfológicos e de coloração, a existência de populações que não correspondiam ao padrão típico da espécie *C. carbonarius*, sendo classificados neste estudo como morfotipos 1 e 2. A hipótese proposta é que os morfotipos correspondam a espécies já diferenciadas, e que não devem ser consideradas como uma mesma unidade taxonômica que *C. carbonarius*. Foram avaliados jabutis depositados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e no Museu Paraense “Emílio Goeldi”, nos bosques municipais de São José do Rio Preto - SP e Araçatuba - SP e no Criadouro de Animais Silvestres e Exóticos “Reginaldo Uvo Leone” em Tabapuã - SP. Com base nos dados obtidos pela avaliação biogeográfica dos espécimes na literatura, observou-se que, a distribuição da espécie *C. carbonarius* está associado à região Nordeste do país, não havendo no entanto, espécimes depositados nas coleções visitadas. No Brasil, *C. denticulatus* ocorre em todos os estados da Amazônia Legal, além de apresentar registros isolados para o domínio da Floresta Atlântica, nos estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro, e para a região Centro-Oeste, nos estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Na região Nordeste, apresenta ocorrência no estado da Bahia. O morfotipo 1, apresenta distribuição geográfica mais abrangente que *C. carbonarius* e possivelmente é atribuído a ele, os relatos de distribuição associados a *C. carbonarius*, indicando associação equivocada do morfotipo 1 como uma mesma unidade taxonômica que *C. carbonarius*. O morfotipo 2 apresenta ocorrência restrita aos estados do Pará, Maranhão e Piauí. Esses dados indicam que parte da distribuição atribuída a *C. carbonarius*, se deve ao fato de todos os morfotipos serem considerados como uma única unidade taxonômica. Aspectos comportamentais, como a comunicação intraespecífica, podem se mostrar tão confiáveis quanto os dados morfológicos ou moleculares para inferir relações evolutivas. A análise das características físicas da vocalização [frequência fundamental (Hz), intervalo entre notas (s), duração de cada nota (s) e número de notas de cada vocalização] realizadas entre *C. carbonarius* e morfotipo 1, mostraram diferenças estatisticamente significantes em relação ao intervalo entre notas (s) $p=0,0000$; duração de cada nota (s) $p=0,0000$; (Hz) $p=0,0009$ e número de notas por vocalização $p=0,0002$ nos dois grupos estudados. Os experimentos de preferência sexual por estímulo sonoro não foram conclusivos com base na vocalização espécie específica, sendo que, apenas fêmeas de *C. carbonarius* demonstraram preferência por vocalizações de machos da mesma espécie, indicando possíveis mecanismos de isolamento reprodutivo. Para explorar a presença de caracteres morfológicos sexualmente dimórficos e de diferenças morfológicas entre *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e o morfotipo 1, os valores encontrados para as medidas registradas foram inicialmente submetidos à análise de estatística descritiva. Foram então realizadas duas análises: uma para cada grupo, comparando os sexos e uma para cada sexo, comparando os grupos. Para testar a variação interespecífica de tamanho e forma foi utilizada matriz de correlação para a análise de componentes principais (ACP). Após a ACP, realizou-se e análise de fatores, no intuito de elencar as características que possuíam mais de 0,75 de correlação na diferenciação entre os sexos. Os resultados obtidos se apresentaram condizentes

com a hipótese de que o morfotipo 1 corresponde a um novo táxon, pois difere do padrão da espécie em relação a morfologia, dimorfismo sexual e coloração. Em relação ao estudo da citogenética clássica, utilizada no intuito de diferenciar as espécies *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e o morfotipo 1 não apresentou dados consistentes que viabilizassem o uso da mesma como parâmetro taxonômico. A coloração convencional por Giemsa revelou um número diplóide $2n = 52$ cromossomos para todos os grupos avaliados. As técnicas de bandamento cromossômico apresentaram baixa reprodutibilidade e constância nos padrões obtidos, não demonstrando sensibilidade e resolução suficientes para permitir a diferenciação entre os grupos avaliados, refletindo o caráter conservado do cariótipo da família Testudinidae. Visando estabelecer o perfil hemoglobínico das espécies *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e o morfotipo 1, foram realizadas eletroforeses em pH ácido em gel de Agar fosfato e em pH alcalino em acetato de celulose, com o intuito de visualizar as frações de hemoglobina de cada espécie. A cromatografia líquida de alta performance permitiu observar as diferenças percentuais das frações de hemoglobinas, e as eletroforeses de cadeias polipeptídicas em pH ácido e alcalino, a composição das globinas de cada fração. As diferenças observadas no perfil cromatográfico entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1 em relação a *C. denticulatus*, valida a técnica como método adicional à elucidação de questões taxonômicas em Testudinidae. As semelhanças observadas entre os perfis de hemoglobina de *C. carbonarius* e o morfotipo 1 em relação a *C. denticulatus*, sugerem que a separação entre esses grupos é recente. O sequenciamento dos fragmentos de DNA relacionados ao gene do *citocromo b* permitiram observar certo grau de homogeneidade entre as amostras de *C. denticulatus* e as sequências disponíveis na literatura, indicando baixa variabilidade genética em relação a esse fragmento para essa espécie. Em relação a *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2, as amostras do presente estudo diferiram daquelas disponíveis nos bancos de dados, indicando estrutura genética variável, possivelmente devido ao fato de que não se consideram, na literatura, divisões taxonômicas dentro de *C. carbonarius*. A análise filogenética baseada nesses resultados, não apresentou sinal filogenético efetivo para a diferenciação de *C. carbonarius* e dos morfotipos 1 e 2, mas os diferenciou de *C. denticulatus*, indicando que a separação de *C. carbonarius* e dos morfotipos 1 e 2, se deu posteriormente à separação de *C. denticulatus* e *C. carbonarius*. A politomia observada para *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2 não é excludente à hipótese de que representam espécies distintas, uma vez que muitos problemas têm sido identificados no uso do gene *citocromo b* em análises filogenéticas. É possível que a inclusão de dados morfológicos, comportamentais e de perfil de hemoglobinas em uma matriz mista, com os dados moleculares, permita a separação dos morfotipos 1 e 2 como espécies monofiléticas. Para a realização dessa análise, será necessário a obtenção desses dados para grupos externos, o que permitirá análises filogenéticas mais robustas, que permitirão maior resolução taxonômica ao estudo. Em vista das diferenças no padrão de distribuição geográfica, vocalização e preferência sonora específica e morfologia encontradas no presente estudo, sugerimos que o morfotipo 1 deva ser considerado como uma nova espécie. Dados referentes ao real *status* conservacionista das populações naturais de jabutis devem ser revistos, uma vez que a pressão antrópica sobre estas é elevada em todo país. Não há planos de conservação ou recuperação das populações naturais por órgãos públicos ou privados para esse grupo. É muito provável que os jabutis já estejam em *status* de ameaça mais preocupante que o relatado na literatura.

Palavras Chave: Testudines, *Chelonoidis*, morfologia, biogeografia, comportamento, hemoglobina, citogenética, *citocromo b*.

SILVA, T.L. **Morphological and Phylogeographic analysis in Brazilian Tortoises (Testudinidae)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto - SP, 186p., 2015.

This study evaluated associated data on biogeography, vocalization, morphology, cytogenetics, hemoglobin and molecular profile using *cytochrome b*, from Brazilian tortoises in order to explore the discriminative potential of the evaluated taxonomic techniques. In Brazil, two species of tortoises are described, *C. carbonarius* and *C. denticulatus*, however, some animals initially recognized based on morphological characters and coloring did not correspond to the typical pattern of *C. carbonarius*, being classified as morphotypes 1 and 2. The proposed hypothesis in this study is that the morphotypes are already differentiated species and should not be considered as a single taxonomic unit with *C. carbonarius*. Tortoises from the National Institute for Amazonian Research (INPA), "Emilio Goeldi" Museum - PA, municipal zoos of São José do Rio Preto - SP and Araçatuba - SP and "Reginaldo Uvo Leone" breeding farm for Wild and Exotic Animals in Tabapuã - SP, were analyzed. Based on the data obtained by biogeographic evaluation of specimens in the literature, it was found that the distribution of *C. carbonarius* is associated with the Northeast region, with no animals deposited in the visited collections. In Brazil, *C. denticulatus* occurs in all states of the Amazonia Legal besides presenting isolated individual records for the domain of the Atlantic Forest in the states of Espírito Santo and Rio de Janeiro, and in the Midwest region in the states of Goiás, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul. In the Northeast region, it occurs in the state of Bahia. The morphotype 1 has a wider geographical distribution than *C. carbonarius*, and it is possibly attributed to several reports distribution associated with *C. carbonarius*, indicating erroneous association of morphotype 1 as a single taxonomic unit with *C. carbonarius*. The morphotype 2 was observed only in the states of Pará, Maranhão and Piauí. These data indicate that part of the allocated distribution of *C. carbonarius* is related with the fact that all morphotypes are considered as a single taxonomic unit. Behavioral aspects such as intraspecific communication may prove as reliable as morphological or molecular data to infer evolutionary relationships. The analysis of the physical characteristics of vocalization [fundamental frequency (Hz), the interval between notes (s), duration of each note (s) and number of notes from each vocalization] conducted between *C. carbonarius* and morphotype 1, showed statistically significant differences relative to the interval between notes (s) $p = 0.0000$; duration of each note (s) $p = 0.0000$; (Hz) $p = 0.0009$ and number of notes by vocalization $p = 0.0002$ in both groups. The preference experiments by sound stimulus were inconclusive about the species-specific vocalization preference, only females of *C. carbonarius* showed intraspecific vocalization preference, indicating possible reproductive isolation mechanisms. To explore the presence of sexual dimorphism and morphological differences between *C. denticulatus*, *C. carbonarius* and the morphotype 1, the values obtained for the recorded measures were subjected to analysis of descriptive statistics. Two analysis were then performed: one for each group, comparing the sexes and the other for each sex, comparing the groups. To test the interspecific variation in size and shape, it was used a correlation matrix for the principal component analysis (PCA). After PCA, we used factor analysis in order to rank the features that had more than 0.75 of correlation in the differentiation between the sexes. The results are consistent with the hypothesis that morphotype 1 corresponds to a new species, since it differs from the morphology, coloring and sexual dimorphism of the species pattern. The classical cytogenetics, used in order to differentiate *C. denticulatus*, *C. carbonarius* and the morphotype 1, showed no consistent data

that would enable its use as taxonomic parameter. Conventional Giemsa staining revealed a diploid number $2n = 52$ of chromosomes for all the evaluated groups. The chromosomal banding techniques had low reproducibility and constancy in the obtained patterns, showing no sufficient sensibility or resolution in order to allow differentiation between these groups, reflecting the conserved characteristics of the karyotype in Testudinidae. In order to establish a hemoglobin profile for *C. denticulatus*, *C. carbonarius* and morphotype 1 and visualize the hemoglobin fractions of each group, acid and alkaline electrophoreses were carried out. The high-performance liquid chromatography enabled us to observe the percentage differences of hemoglobin fractions, and the electrophoresis of polypeptide chains in acid and alkaline pH allowed us to observe the globin composition of each fraction. The observed differences in the chromatographic profile between *C. carbonarius* and the morphotype 1 with respect to *C. denticulatus*, validate the technique as additional method to elucidate taxonomic issues in Testudinidae. The similarities observed between the hemoglobin profile between *C. carbonarius* and morphotype 1 suggest that the separation between these groups is recent. The alignment of mitochondrial DNA *cytochrome b* fragments allowed us to observe a certain degree of homogeneity among *C. denticulatus* samples and sequences available in the literature, indicating low genetic variability in relation to this fragment for this species. *C. carbonarius* and morphotypes 1 and 2 samples differ from those available in the databases, indicating a variable genetic structure, possibly due to the fact that it does not consider taxonomic divisions within *C. carbonarius*. Phylogenetic analysis did not provide effective phylogenetic signal for differentiating *C. carbonarius* and morphotypes 1 and 2, but it differed *C. denticulatus*, indicating that the separation of *C. carbonarius* and morphotypes 1 and 2 is more recent than the separation of *C. denticulatus* and *C. carbonarius*. The polytomy observed for *C. carbonarius* and morphotypes 1 and 2 are not exclusionary to the hypothesis that they represent different species, since many problems have been identified using *cytochrome b* in phylogenetic analysis. It is possible that the inclusion of morphological, behavioral and hemoglobin profile data in a mixed matrix with the molecular data allow us to separate the morphotypes 1 and 2 as monophyletic species. To perform this analysis, we need to obtain such data for external groups, which will allow a more robust phylogenetic analysis, allowing greater taxonomic resolution to the study. In view of the differences in the biogeographical pattern, vocalization, specific-sound preference and morphology found in this study, we suggest that the morphotype 1 should be considered a new species. Data relating to conservation status of the natural populations of tortoises should be reviewed, since the human pressure on it is high across the country. There is no conservation plans or recovery of natural populations by public or private organizations for the group. It is very likely that these tortoises are already in a more worrying threat status than the one reported in the literature.

Keywords: *Chelonoidis*, morphology, biogeography, behavior, hemoglobin, *cytochrome b*.

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS TESTUDINES	18
1.2. <i>CHELONOIDIS CARBONARIUS</i> E <i>CHELONOIDIS DENTICULATUS</i>	22
1.3. BIOGEOGRAFIA.....	22
1.4. COMPORTAMENTO E VOCALIZAÇÃO	24
1.5. DIFERENCIAÇÃO MORFOLÓGICA ENTRE <i>C. CARBONARIUS</i> E <i>C. DENTICULATUS</i>	26
1.6. CITOGENÉTICA	29
1.7. PERFIL DE HEMOGLOBINAS	29
1.8. MARCADORES MOLECULARES	30
1.9. FILOGEOGRAFIA	34
2. OBJETIVO GERAL	37
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	39
4. CAPÍTULO 1. BIOGEOGRAFIA DOS TESTUDINIDAE BRASILEIROS	41
5. CAPÍTULO 2. VOCALIZAÇÃO E PREFERÊNCIA SEXUAL EM TESTUDINIDAE.....	60
6. CAPÍTULO 3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DIMORFISMO SEXUAL EM TESTUDINIDAE	76
7. CAPÍTULO 4. ESTUDO CITOGENÉTICO EM JABUTIS BRASILEIROS (TESTUDINIDAE).....	107
8. CAPÍTULO 5. PERFIL HEMOGLOBÍNICO COMO PARÂMETRO DE ANÁLISE TAXONÔMICA EM TESTUDINIDAE BRASILEIROS	122
9. CAPÍTULO 6. ANÁLISE MOLECULAR DE UM FRAGMENTO DO GENE <i>CITOCROMO B</i> EM TESTUDINIDAE BRASILEIROS.....	133
10. DISCUSSÃO GERAL.....	149
11. REFERÊNCIAS	161
12. APÊNDICE A. ALINHAMENTO DO FRAGMENTO DE 227 PARES DE BASE DO GENE MITOCONDRIAL <i>CITOCROMO B</i>.	183

Introdução Geral

1. Introdução Geral

1.1. Características Gerais dos Testudines

A origem dos répteis é datada em registros fósseis da Era Paleozóica. Esses animais dominaram a Terra durante o período Jurássico até o Cretáceo, há cerca de 125 milhões de anos, e a maioria das espécies foram extintas há aproximadamente 60 milhões de anos (GOULART, 2004).

Os Testudines e os demais amniotas são classificados em relação ao padrão de fenestração temporal em Diapsida, Sinapsida e Anapsida. Os Diapsidas possuem duas aberturas temporais no crânio e são representados pelos Lepidosauromorpha (lagartos, serpentes, tuataras e anfisbenas) e pelos Archosauromorpha (crocodilianos e aves). Os Sinapsida apresentam uma abertura temporal lateral tendo como representantes os Pelycosaurias e Therapsidas, ambos extintos, e os mamíferos atuais; os Anapsidas são representados pelos répteis que não possuem fossa temporal, os Chelonia ou Testudomorpha (POUGH et al., 2002; POUGH et al., 2003).

Os Testudines tiveram sua origem durante o período Jurássico há cerca de 200 - 146 milhões de anos, ou Cretáceo há 146 - 66 milhões de anos e atualmente são representados por poucas famílias. Esse grupo é de grande importância em estudos genéticos e taxonômicos por possuir história filogenética única, pois mantêm diversas características altamente conservadas ao longo de sua evolução, sendo desta forma, importantes candidatos para ações de conservação (SHAFTER, 2009).

Os répteis têm sofrido significativa redução no número de espécies no decorrer da sua história evolutiva, sendo que das 16 ordens existentes no passado, apenas quatro são encontradas nos dias atuais: Crocodylia, com 23 espécies de jacarés, crocodilos, aligátors e gaviais; Rhynchocephalia, com duas espécies de tuataras, Squamata, formada por 2940 espécies de serpentes, 4675 espécies de lagartos, 160 espécies de anfisbenas e Testudines, constituída por 335 espécies de jabutis, cágados e tartarugas (ERNEST; BARBOUR, 1989; GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; STORER et al., 2000; GOULART, 2004; RIDLEY, 2006; IVES; SPINKS; SHAFFER, 2008; SHAFTER, 2009, TTWG, 2014).

Se considerarmos as espécies recentemente extintas, e a limitação de informações sobre o grupo, aproximadamente 60% de todos os quelônios atuais estão em risco de extinção. Essa porcentagem de espécies ameaçadas tem aumentado significativamente nos últimos anos. Em 2007, por exemplo, essa porcentagem era de 47,6% (TTWG, 2007). Tais dados apontam os quelônios como o grupo de vertebrado mais ameaçado do planeta, superando aves, mamíferos, peixes cartilaginosos, ósseos e anfíbios (TTWG, 2014).

A principal característica dos quelônios é a carapaça que reveste seu corpo, formado pela fusão das costelas, vértebras torácicas, lombares, sacrais e alguns ossos da cintura pélvica e torácica. A carapaça é a porção convexa ou dorsal, e o plastrão corresponde à porção ventral, plana ou côncava. Esses animais ocupam diferentes habitats com representantes exclusivamente terrestres, como os jabutis (Testudines); espécies que vivem em ambientes fluviais e lacustres, como os cágados (Chelidae); exclusivamente marinhas como as tartarugas (Cheloniidae), e ainda, aquelas que vivem em ambiente terrestre e de água doce, como a *Rhynoclemmys punctularia* (Aperema) (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; GOULART, 2004; ZUG, 1993). Os ossos da carapaça são geralmente recobertos por escudos córneos de origem epidérmica que não coincidem, em número e posição, com os ossos subjacentes, tornando assim, essa estrutura extremamente resistente a choques mecânicos (POUGH et al., 1993).

Os répteis são adaptados à vida no meio terrestre, sendo a maioria ectotérmicos e heterotérmicos apresentam modificações que evitam a desidratação, como pele escamosa, aumento no comprimento do intestino grosso, fecundação interna, ovos com casca calcária e membranas embrionárias (âmnio, córion e alantóide) (ERNEST; BARBOUR, 1989; STORER et al., 2000; GOULART, 2004). O sistema porta renal desvia parte da circulação diretamente para os rins, que tem origem metanéfrica e estão localizados caudal e ventralmente em relação à carapaça e, posteriormente, ao acetábulo. A excreção é uma mistura de uréia e ácido úrico (GARCIA-NAVARRO; MADER, 1996; PACHALY, 1994).

O pulmão é bem desenvolvido em relação ao de outros répteis, e localiza-se bilateralmente. Por não possuírem diafragma e apresentarem os arcos intercostais fundidos, o ar é bombeado para os pulmões por movimentos buco faríngeos. A expulsão do ar é auxiliada pela contração da musculatura das cinturas peitoral e pélvica, que movimentam as

vísceras comprimindo os pulmões. Em algumas espécies aquáticas a respiração é auxiliada por meio da vascularização da mucosa cloacal e pela cavidade oronasal, onde também eventualmente, ocorre excreção de produtos nitrogenados (GOULART, 2004; JACKSON et al., 2004; STORER et al., 2000). O coração é tricavitário, dois átrios e um ventrículo divididos por um septo mediano, proporcionando, em situações específicas, como em hipóxia, mistura parcial entre o sangue arterial e venoso, conferindo melhor taxa respiratória e termorregulação (ERNEST; BARBOUR, 1989; GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; GOULART, 2004; POUGH et al., 2003).

A maxila e a mandíbula apresentam um bico córneo, a cavidade oral comunica-se com a cavidade nasal através da fenda palatina. O pescoço é formado por oito vértebras cervicais recobertas por forte musculatura, que propicia, em algumas espécies, a retração da cabeça, quando ameaçados (GOULART, 2004; STORER et al., 2000).

A ordem Testudines é dividida em duas subordens: Cryptodira (*cripto*: escondido; *dire*: pescoço), que retraem o pescoço verticalmente, e está representada por três superfamílias: Testudinoidea, Trionychoidea e Chelonioidea, que incluem tartarugas, cágados e jabutis. São encontrados em sua maioria no hemisfério Sul, com espécies terrestres e aquáticas na América do Sul, terrestres na África e sem representantes na Austrália e na Antártida; e Pleurodira (*pleuro*: lado; *dire*: pescoço), que retraem o pescoço horizontalmente, e está dividida em duas famílias: Chelidae e Pelomedusidae, encontradas apenas no hemisfério Sul (GOULART, 2004; POUGH et al., 2003; ZUG, 1993).

Aproximadamente 20% das espécies de quelônios existentes ocorrem na América do Sul, sendo representados por oito famílias (SOUZA, 2004). Os quelônios habitam os mais diversos ecossistemas aquáticos e terrestres, de oceanos a rios e lagos, de desertos a florestas tropicais (ERNEST; BARBOUR, 1989; ZUG, 1993). A família Testudinidae é representada exclusivamente por espécies terrestres, incluindo mais de 200 formas fósseis e aproximadamente 40 espécies viventes (AUFFENBERG, 1974; POUGH et al., 2001).

A ordem Testudines é constituída por 14 famílias e aproximadamente 335 espécies viventes (IVES; SPINKS; SHAFFER, 2008; SHAFTER, 2009, TTWG, 2014).

Análises moleculares para inferência das relações filogenéticas entre os quelônios têm sido utilizadas de forma complementar às hipóteses baseadas apenas em morfologia, e os

resultados levaram ao desenvolvimento de novas abordagens taxonomias. CRAWFORD et al. (2014) realizaram a primeira filogenia de Testudines em escala genômica, sequenciando 2381 elementos ultra conservados, representando um *loci* de 1.718.154 pares de bases. Nessa amostragem, os autores incluíram táxons de todas as 14 famílias, e mais seis grupos externos, e utilizaram métodos de máxima verossimilhança e *bayesiano*, associados, obtendo filogenia com clados bem suportados, e topologia consistente com dados morfológicos e paleogeográficos. A árvore filogenética da Ordem Testudines segundo essas análises, está representada na Figura 1.

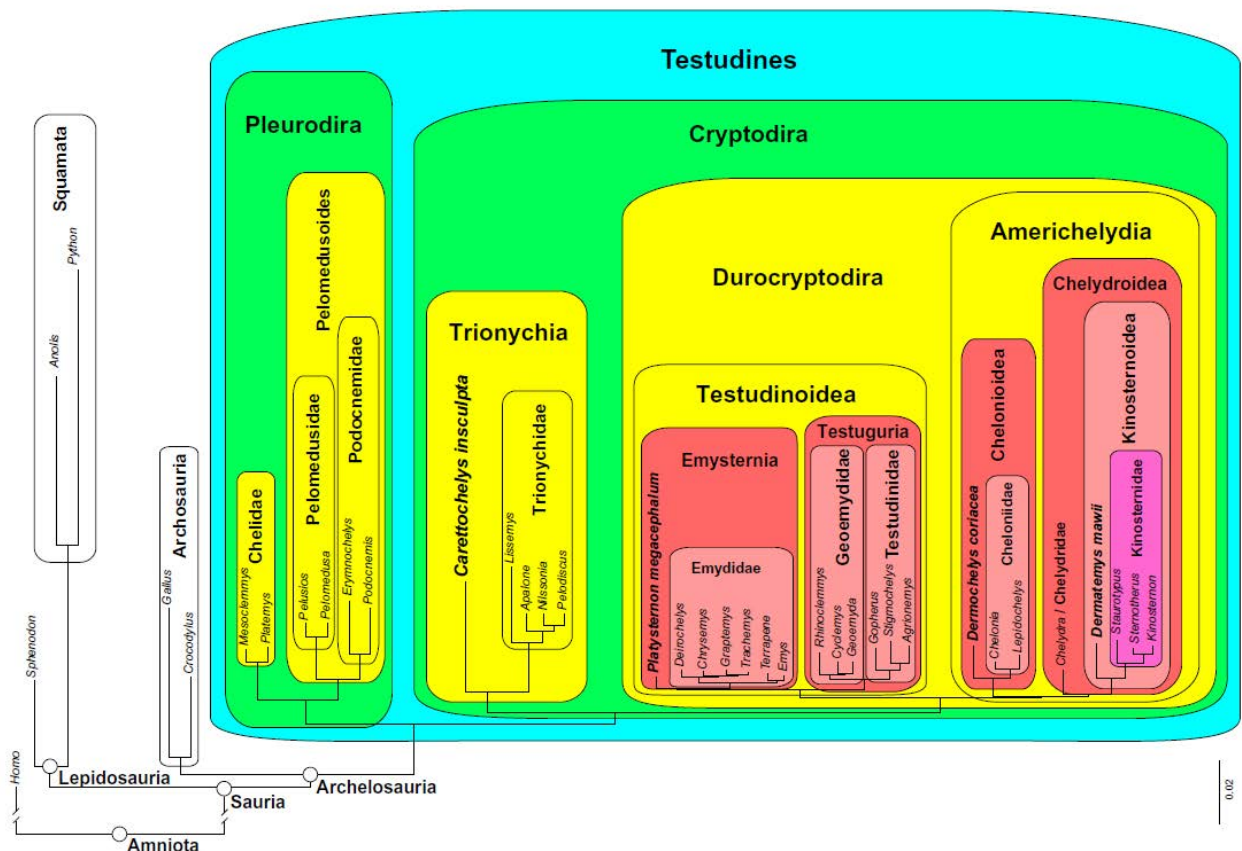


Figura 1. Hipótese filogenética dos Testudines baseada em centenas de táxons e modelos de construção filogenéticos mistos. Todos os clados estão suportados por porcentagens de probabilidade de *bootstrap* de 100. A barra está em unidades de substituições por local (CRAWFORD et al., 2014).

1.2. *Chelonoidis carbonarius* e *Chelonoidis denticulatus*

O gênero *Chelonoidis* (FITZINGER, 1835) é representado por quatro espécies da América do Sul, sendo estas: *C. carbonarius*, *C. denticulatus*, *C. chilensis* e *C. nigrurus*, sendo a última exclusiva das Ilhas de Galápagos. O gênero *Chelonoidis* foi inicialmente considerado um subgênero de *Geochelone* (FITZINGER, 1856), mas uma análise filogenética dos Testudines, que representa a mais abrangente amostragem taxonômica para esse grupo, defende a elevação de *Chelonoidis* para o status de gênero (LE et al., 2006).

O gênero *Chelonoidis* é atualmente tratado como feminino, entretanto, as regras de nomenclatura zoológica ditam que o gênero adequado ao nome genérico *Chelonoidis* é masculino. Nesse caso, *Chelonoidis* deve ser tratado no âmbito do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, artigo 30.1.4.2, a menos que o seu autor, quando, estabeleceu o nome, afirmou ser feminino ou tratou-o como tal. Como Fitzinger (1835) não afirmou que o gênero *Chelonoidis* era feminino, e não o tratou como tal na descrição do mesmo, deve-se considerar o gênero como masculino. Dessa forma, mudanças nas terminações dos nomes específicos foram realizadas (OLSON; DAVID, 2014).

1.3. Biogeografia

A distribuição geográfica de uma espécie é resultado da interação de um complexo conjunto de fatores e processos. A ausência de uma espécie em determinada região pode estar relacionada à sua incapacidade de dispersão, à preferência por outros tipos de ambientes, à sua exclusão devido à interação com outros organismos, ou à intolerância a características físicas e químicas do ambiente (KREBS, 1994).

Informações sobre a distribuição geográfica de espécies com ampla ocorrência, como é o caso dos jabutis *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, muitas vezes apontam deficiências na amostragem em regiões isoladas e ainda pouco estudadas, e comumente apresentam referências dúbias, pois consideram válidos, registros de animais provenientes de outras regiões e liberados em ambientes naturais pela população local. Poucas representações das distribuições geográficas destas duas espécies de Testudinidae foram publicadas (IVERSON,

1986; MOSKOVITS, 1985; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; VANZOLINI, 1994), ressaltando incertezas no que se refere à real distribuição das espécies. Além disso, os registros de distribuição geográfica, disponíveis atualmente na literatura, não correlacionam os dados geográficos com os padrões genéticos, moleculares ou morfológicos, dificultando a correta caracterização das populações.

A melhor caracterização da distribuição geográfica das espécies se dá por meio do aumento do número de registros, pois permite a exploração de fatores relacionados a padrões biogeográficos. Pritchard e Trebbau (1984) discutem algumas diferenças relacionadas ao uso de habitat pelas duas espécies de jabutis, porém não fazem nenhuma abordagem quantitativa visando identificar fatores relacionados aos distintos padrões de distribuição geográfica dessas espécies.

A espécie *C. denticulatus* é frequente em florestas tropicais, enquanto que *C. carbonarius* é encontrada em uma gama mais ampla de ambientes, incluindo áreas de cerrado e vegetação florestal. Entretanto, em várias localidades, essas espécies ocorrem em simpatria, especialmente em regiões de transição entre florestas e cerrado (AUFFENBERG, 1965; JEROZOLIMSKI, 2005; MEDEM et al., 1979; MOSKOVITS, 1998; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; ZUG, 1993).

A espécie *C. carbonarius* (SPIX, 1824), popularmente conhecida como jabuti-piranga ou jabuti-de-patas-vermelhas, é um animal terrestre encontrado em regiões de cerrado na Venezuela, Colômbia, Suriname, Guianas, Guiana Francesa, Bolívia, Paraguai, Argentina, Caribe, nas ilhas Venezuelanas Margarita e Los Tertigos e, no Brasil, nos estados do Pará, Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia, Goiás, Mato Grosso e Roraima. Estes animais apresentam forte carapaça convexa, de cor cinza à marrom ou preta, com desenhos simétricos, vermelhos ou amarelados. Seu plastrão apresenta a mesma coloração escura, com forma côncava nos machos (ERNEST; BARBOUR, 1989; PRITCHARD, 1979; PRITCHARD; TREBBAU, 1984;).

A espécie *C. denticulatus* (LINNAEUS, 1766), popularmente conhecida como jabuti-tinga ou jabuti-de-patas-amarelas, possui a cabeça e patas amarelas e a escama nasal preta. Os machos são maiores que as fêmeas, podendo atingir até 70 cm de comprimento e as fêmeas até 40 cm, sendo o peso médio da espécie entre oito e 18 kg. A espécie representa o

maior quelônio terrestre da América do Sul, podendo ser encontrado em florestas densas, tropicais e subtropicais, do Sudeste da Venezuela, passando pelas planícies da Guiana, e para o Brasil, onde habitam toda bacia Amazônica, ocupando áreas da porção oriental do Equador e Colômbia, Norte oriental do Peru e Norte e Sudeste da Bolívia (PRITCHARD; TREBBAU, 1984). No Brasil, ocorrem em pontos restritos da região Nordeste, na bacia do Rio Mearim, no Maranhão, e próximo à foz do Rio São Francisco; na região Centro-Oeste está presente junto às nascentes do Rio Tocantins. Em Goiás, ocorre na bacia do Rio Paraguai, nas bordas do Pantanal matogrossense, e na região Sudeste, ocorre em pontos da Mata Atlântica, próximos à costa, entre a Bahia e o Rio de Janeiro (PRITCHARD; TREBBAU, 1984).

Desta forma, estudos sobre distribuição geográfica desses animais têm sido amplamente utilizados para descrever eventos históricos, como fragmentação de habitats ou expansão da área de distribuição de espécies e populações, eventos de migração, processos vicariantes, unidades de significância evolutiva ou extinção de linhagens gênicas, assim como outros processos que afetam a estrutura das populações ou que geram especiação em um contexto espacial e temporal (HARDY et al., 2002).

1.4. Comportamento e Vocalização

O período reprodutivo dos Testudinidae é influenciado pelas estações do ano e ocorre, geralmente, a partir do mês de outubro. O período de desova, se dá entre os meses de fevereiro e março, podendo variar em cada região devido aos fatores climáticos. As posturas são realizadas, preferencialmente, após o período de chuvas, pois facilita a abertura do ninho (HIGHFIELD, 1996). As fêmeas enterram os ovos em locais com baixa umidade e boa incidência de raios solares, não necessariamente em uma única postura. Os ovos ficam incubados por cerca de quatro meses, podendo variar em função da constância da temperatura de incubação, que geralmente é de 28°C. Os filhotes começam a se alimentar por volta de um mês de idade, e durante esse período nutrem-se com a reserva vitelínica que mantêm no abdômen ao saírem do ovo, pois geralmente ainda estão enterrados. Na natureza os Testudines alimentam-se de frutas, flores, folhas, gramíneas e restos de animais, e

frequentemente, filhotes incluem fezes de indivíduos adultos na alimentação, processo que auxilia a composição de sua flora intestinal (HIGHFIELD, 1996).

A maioria das espécies de quelônios apresenta maturidade tardia, porém, a grande longevidade associada à alta taxa de sobrevivência de indivíduos adultos e a aparente ausência de senilidade fisiológica ou anatômica, permite que apresentem períodos reprodutivos prolongados (CONGDON et al., 1993; GIBBONS, 1987). Medem et al (1979) relatam que a maturidade sexual em *C. denticulatus* e *C. carbonarius* é atingida aproximadamente aos cinco anos de idade. Os machos geralmente alcançam maturidade sexual antes das fêmeas, e há relatos na literatura, de uma fêmea de *C. denticulatus* que depositou ovos pela primeira vez apenas aos 11 anos de idade (JEROZOLIMSKI, 2005). Castaño-Mora e Lugo-Rugeles (1981) obtiveram para cada uma das 12 fêmeas de *C. carbonarius* e das sete fêmeas de *C. denticulatus*, mantidas em cativeiro na Colômbia, a média de 11 ovos produzidos em cada um dos dois períodos reprodutivos consecutivos que amostraram. Entretanto, em populações silvestres, sugere-se que a produção média de ovos por fêmea adulta seja menor, uma vez que a proporção de fêmeas fecundadas a cada estação reprodutiva é menor (JEROZOLIMSKI, 2005).

Jabutis apresentam sistema promíscuo de acasalamento, as fêmeas copulam com diversos machos no mesmo período reprodutivo sem, no entanto, receber benefícios diretos, como cuidados parentais ou acesso a um determinado território (ERNST; BARBOUR 1989; KUCHLING 1999; WEAVER, 1970). Os comportamentos de corte e de cópula de jabutis são baseados em um sistema que envolve sinais visuais, táteis, olfativos e acústicos. Nesse contexto, machos com bom desempenho durante a corte, apresentam maior sucesso de cópula (GALEOTTI, 2005a, SACCHI et al., 2003).

Até meados da década de 70, acreditava-se que a vocalização dos quelônios era produzida involuntariamente, e que não possuía função biológica (MROSOVSKY, 1972; WEAVER, 1970). A vocalização associada à cópula é, em muitas espécies de quelônios, o único momento em que há vocalização (ERNST; BARBOUR, 1989), porém, pouco se sabe sobre sua função e produção (BERRY; SHINE, 1980; OLSSON; MADSEN, 1998; SWINGLAND; STUBBS, 1985). Sacchi et al. (2003) em estudo com *Testudo marginata* (SCHOEPFF, 1793) demonstraram que as características da vocalização são indicativas da

qualidade fisiológica do macho, pois estas estão relacionadas com o sucesso de cópula, o peso, o tamanho corporal e refletem o valor adaptativo.

Galeotti (2005b), em estudo com *Testudo hermanni*, afirma que a vocalização é um sinal dependente da condição fisiológica, e que reflete o valor adaptativo do macho, podendo representar, em algumas espécies de Testudinidae, um sinal que influencia a escolha do parceiro pelas fêmeas.

A vocalização durante a cópula nas espécies brasileiras de jabutis difere significativamente, sendo que a frequência fundamental, o mais baixo e forte componente da série harmônica (conjunto de ondas de uma mesma nota composto pela frequência fundamental e de todos os múltiplos inteiros desta frequência), neste gênero pode variar de 110 Hz em *C. carbonarius* até 230 Hz em *C. denticulatus* (GALEOTTI et al., 2005a). Assim sendo, a vocalização pode representar um sinal espécie-específico, possibilitando às fêmeas rejeitar parceiros de espécies simpátricas, considerando que os jabutis machos são reprodutores indiscriminados (BALLASINA, 1995 apud GALEOTTI et al., 2004).

Deve-se considerar também que, fêmeas de jabutis podem reconhecer parceiros em potencial por meio de sinais olfativos, táteis e visuais, além de comportamentos específicos de cópula, tais como *displays* comportamentais e interações agressivas, que têm o intuito de subjugar fisicamente a fêmea (WILLEMSSEN; HAILEY, 2003). Entretanto, a vocalização durante a cópula pode representar um dado adicional, capaz de informar sobre a qualidade do emitente para o receptor, e possivelmente apresentar valor taxonômico, por meio de padrões sonoros espécie específicos (GALEOTTI, 2004).

1.5. Diferenciação Morfológica entre *C. carbonarius* e *C. denticulatus*

A forma, tamanho, coloração, número e disposição dos escudos que compõem o casco são características importantes para a identificação genérica e específica dos Testudines (MEDEM 1976; MOLINA; ROCHA, 1996; PRITCHARD; TREBBAU, 1984). As espécies *C. carbonarius* e *C. denticulatus* assemelham-se em certos aspectos, tais como: tamanho corporal, forma da carapaça e plastrão, dieta e comportamento. Geralmente podem ser

identificadas no campo por meio da coloração das patas e pelas características morfológicas descritas na literatura, tais como o tamanho e a presença de escudo gular ultrapassando o rebordo da carapaça em *C. denticulatus* (CASTANÕ-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; MOSKOVITS, 1998; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; WILLIAMS, 1960). O padrão dos escudos que compõem o casco dos quelônios de uma mesma espécie é bastante uniforme (PRITCHARD, 1979), mas variações nesse padrão foram descritas e analisadas para um grande número de espécies, incluindo as espécies objeto do presente estudo (PRITCHARD, 1979; SIQUEIRA et al., 2004; ZANGERL; JOHNSON, 1957).

Em 1965, Auffenberg descreveu a espécie *Geochelone hesternae*, uma tartaruga fóssil do Mioceno encontrada na Colômbia, que apresentava características morfológicas intermediárias entre *C. carbonarius* e *C. denticulatus*. Esta espécie é considerada ancestral de *C. carbonarius* e *C. denticulatus*, cuja separação teria ocorrido com o desenvolvimento de cerrados e prados periféricos à bacia Amazônica, no Pleioceno ou Pleistoceno, com as espécies se tornando distintas, por isolamento geográfico, ficando *C. denticulatus* restrita a florestas tropicais e *C. carbonarius* a cerrados e campos abertos.

Poucos marcadores morfológicos, descritos na literatura, para a diferenciação das espécies *C. carbonarius* e *C. denticulatus* apresentam eficiência para a distinção dos grupos. Destes, destacam-se aqueles localizados na região cefálica, carapaça, plastrão e coloração. São relatados na literatura padrões morfológicos variados em *C. carbonarius*, sugerindo a presença de morfotipos de *C. carbonarius*, mas que atualmente, são considerados como um único táxon (SIQUEIRA et al., 2004).

A caracterização morfológica das espécies brasileiras do gênero *Chelonoidis* vêm sendo questionada desde que Williams (1960) examinou um grande número de espécimes, afirmando que as características distintas entre elas deveriam ser revistas. O autor relatou dificuldades na identificação dos indivíduos encontrados em museus ou na natureza, tendo em vista que alguns espécimes de *C. carbonarius* apresentavam tamanhos e coloração distintos do padrão da espécie, possivelmente associado com a presença de morfotipos (PRITCHARD, 1979).

O dimorfismo sexual está presente em inúmeras espécies e em quase todos os grupos de vertebrados, e diferenças entre os sexos em uma espécie tem, há muito tempo, gerado

interesse de estudo por parte de ecólogos evolucionistas (BUTLER et al., 2000). Uma das formas de dimorfismo sexual é o tamanho, no qual machos e fêmeas não permanecem com o mesmo tamanho, quando adultos. Darwin (1874) propôs que a evolução do dimorfismo sexual poderia ser resultado de pressões de seleção sexo-específicas, como por exemplo, disputas por fêmeas, onde machos maiores seriam favorecidos (BERRY; SHINE, 1980; TRIVERS, 1972; WIKELSKI; TRILLMICH, 1997). Por outro lado, em espécies em que as fêmeas escolhem seus parceiros sexuais, o tamanho corpóreo ou outras características selecionadas pelas mesmas seriam favorecidos, e geralmente, nesses casos, o tamanho corpóreo das fêmeas é maior em relação ao dos machos, favorecendo maior número de descendentes (BERRY; SHINE, 1980).

Os dois exemplos supra citados, de pressões de seleção sexual, que interferem na relação de tamanho entre os sexos, podem ser exemplificados com espécies de quelônios, terrestres e aquáticos, respectivamente. Espécies de quelônios terrestres, geralmente, possuem machos com maior porte em relação às fêmeas, já espécies aquáticas apresentam padrão inverso (BERRY; SHINE, 1980). Outro tipo de pressão que pode favorecer a evolução do dimorfismo sexual em tamanho nos quelônios é a dispersão dos machos. Nesse contexto, pressões ambientais que limitem a locomoção das espécies podem levar a maior defesa territorial, favorecendo dessa forma machos maiores (GHISELIN, 1974).

Darwin propôs que a seleção natural levaria à maior dimensão do corpo em fêmeas, pois o tamanho do corpo está positivamente correlacionado à fecundidade, entretanto autores têm sugerido que, uma série de fatores ecológicos e comportamentais podem contribuir para a origem e manutenção de dimorfismo sexual, incluindo aquela relacionada à diferença no tamanho entre os sexos (SHINE, 1989; VINCENT; HERREL, 2007). O habitat ocupado pela espécie pode influenciar diretamente no padrão de dimorfismo em relação ao tamanho, assim como a interação entre predadores e disponibilidade de alimentos, que poderia levar a padrões de dimorfismo distintos do esperado, segundo a teoria de Darwin (BUTLER et al., 2000).

O Dimorfismo sexual pode ser filogeneticamente conservado, ou ser recém-evoluído em resposta a pressões de seleção ativas (VINCENT; HERREL, 2007). Dessa forma, sua

utilização em contextos taxonômicos pode fornecer evidências adicionais em relação a diferenças no tipo de habitat ocupado por quelônios.

1.6. Citogenética

Uma das possibilidades de elucidar as diferenças entre espécies se dá por meio do estudo dos cromossomos, com base no cariótipo e em padrões de bandamentos cromossômicos. No entanto, existem poucos dados na literatura sobre estudos citogenéticos em Testudines brasileiros, a maioria concentra-se em representantes da família Chelidae da América do Sul, Austrália e África (BULL; LEGLER, 1980; MC BEE et al., 1985).

Marcadores citogenéticos constituem uma ferramenta importante em estudos citotaxonomicos, pois permitem caracterizar espécies e populações, incluindo não somente número cromossômico e fórmula cariotípica, mas também sistemas de cromossomos sexuais diferenciados, cromossomos supra numerários, número e localização das regiões organizadoras de nucléolos (RON), distribuição da heterocromatina constitutiva, bandamento G, impregnação por íons prata e coloração por fluorocromos base-específicos (ALMEIDA-TOLEDO, 1998; GUERRA, 2004; SUMNER, 1972).

É importante ressaltar que no estudo dos cromossomos de répteis, dados de bandamento cromossômico clássico e molecular ainda não desempenham papel relevante na literatura, devido às dificuldades em se obter bons índices mitóticos e problemas na padronização das técnicas (GUERRA, 2004).

1.7. Perfil de Hemoglobinas

Entre os vertebrados, a hemoglobina tem sido amplamente utilizada em estudos de evolução e adaptação molecular, pois diferenças nas propriedades moleculares de proteínas conservadas, como a hemoglobina, são consideradas reflexos de adaptações biológicas, com aplicações taxonômicas (PETRUZZELLI et al., 1996; SULLIVAN; RIGGS, 1967).

A hemoglobina é uma proteína presente nas células vermelhas do sangue e é responsável pela captação, transporte e liberação de oxigênio dos órgãos, até os tecidos, e

liberação parcial do gás carbônico. Nos quelônios, o oxigênio é captado no pulmão, porém, outras regiões anatômicas atuam na hematose, tais como a oro faringe e a cloaca. Répteis e aves possuem como um dos componentes principais da hemoglobina, as cadeias α D, o que confere a esses animais, alta afinidade ao oxigênio, pois as características de afinidade dessas cadeias assemelham-se às de hemoglobinas fetais em mamíferos (STRYER, 1992; TORSONI; OGO, 1995). Hemoglobinas são proteínas homólogas com heterogeneidade marcada, muitas vezes relacionada à filogenia. Desta forma, espécies evolutivamente próximas apresentam semelhanças no perfil desta proteína, sendo utilizada como indicador de relações filogenéticas e como marcador de ancestralidade em vertebrados (DESSAUER et al., 1957).

Algumas metodologias para análise de hemoglobinas têm aplicação em estudos taxonômicos. Uma delas é a eletroforese, com função de qualificação e quantificação de frações de hemoglobinas, e cujos resultados baseiam-se na interpretação das diferenças em mobilidade. Essas diferenças devem-se às alterações de carga elétrica causadas por substituições de aminoácidos nas cadeias formadoras da molécula (MELO et al., 2003). O posicionamento das cargas, na migração eletroforética, sugere controle e eficiência biológica como ajuste para o transporte de oxigênio, favorecendo a sobrevivência da espécie por meio do aumento de sua plasticidade fenotípica (SULLIVAN; RIGGS, 1967; TORSONI et al., 2002). Apesar da ampla utilização da técnica, esta é ainda incipiente na literatura para fins taxonômicos e sistemáticos. Variações nas propriedades de hemoglobinas de diferentes animais têm sido relatadas, o que sugere que tais estudos podem ser utilizados como dados adicionais para a elucidação de problemas taxonômicos em Testudines (BONINI-DOMINGOS et al., 2007; GRATZER; ALLISON, 1960; MELO, 2003; SULLIVAN; RIGGS, 1967).

1.8. Marcadores Moleculares

A Floresta Tropical Amazônica foi fragmentada em meados do Pleistoceno, abrindo um corredor central de colonização em habitats de floresta seca ou cerrado, sugerindo que flutuações climáticas e de vegetação desempenharam importante papel na formação da

biodiversidade da América do Sul, nas regiões mais próximas aos trópicos (VARGAS-RAMÍREZ; MARAN; FRITZ, 2010).

A Floresta Amazônica contínua permitiu o fluxo gênico entre os espécimes de *C. denticulatus*, estabelecendo populações geneticamente homogêneas. Já, a espécie *C. carbonarius*, por preferir áreas abertas, como, por exemplo, de cerrado, evoluiu por processo vicariante, resultando em grupos com estrutura genética distinta. Essa diversidade foi moldada pela dispersão ocorrida após a redução nas florestas tropicais e subsequente vicariância causada pela reexpansão florestal, levando à fragmentação de populações em ilhas de caatinga. Tais fatos sugerem forte correlação entre o habitat e diferenciação filogeográfica nessas espécies (VARGAS-RAMÍREZ; MARAN; FRITZ, 2010).

Observações semelhantes foram encontrados para *Crotalus durissus*, por Quijada-Mascareñas et al. (2007) e Wüster et al. (2005), e são compatíveis com as flutuações na distribuição da floresta tropical Amazônica.

Estudos em genética populacional de *C. carbonarius* e *C. denticulatus* relatam haplótipos de DNA mitocondrial de *C. denticulatus* em quatro indivíduos de *C. carbonarius*, com padrão de coloração e tamanho diferentes do padrão da espécie. Essas características sugerem a presença dos haplótipos como resultado de polimorfismo ancestral mantido na população, durante a separação destas espécies, ou indício de um possível evento de hibridação, não confirmado (JEROZOLIMSKI, 2005; FARIAS et al., 2007). Eventos de hibridação introgressiva são oriundos de cruzamentos interespecíficos repetidos ou mesmo contínuos, com infiltração de genes de uma espécie em outra, em decorrência da ausência de mecanismos de isolamento reprodutivo. A ocorrência destes eventos é maior em áreas de simpatria ou parapatría do que em áreas de alopatria (JEROZOLIMSKI, 2005; TAYLOR; MCPHAIL, 2000) e, particularmente, em locais onde uma espécie está se expandindo em direção a novas áreas (BALLARD; WHITLOCK, 2004; JEROZOLIMSKI, 2005). Esse processo pode estar associado a problemas ecológicos, como por exemplo, em *C. carbonarius*, que, devido à substituição de seu habitat natural (cerrado) por monoculturas e pastagens, expandiu sua área de ocorrência para locais mais próximos às áreas florestadas. Essa expansão possibilitou que entrasse em simpatria com *C. denticulatus* (ALLENDORF et al., 2001; LE et al., 2006). Entretanto, eventos de hibridação comprovados entre as espécies

são raros, indicando que parte da variabilidade observada na literatura se deve a diferenças populacionais, e não a eventos de hibridação.

As espécies *C. carbonarius* e *C. denticulatus* são consideradas ameaçadas, segundo o *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES), podendo vir à extinção caso o comércio ilegal e a perda de habitat não sejam controlados. Em adição, a espécie *C. denticulatus* é também considerada vulnerável pela lista vermelha da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), indicando risco de extinção na natureza caso o tráfico e consumo dos animais por populações indígenas ou ribeirinhas, não seja reduzido (IUCN, 2014).

Métodos de estudo moleculares são eficazes para reconstrução filogenética e têm sido empregados em abordagens evolutivas, tais como nos estudos de fluxo gênico, especiação, sistemática e estrutura de populações (AVISE, 1994). A mitocôndria, com seu genoma próprio e fracamente envolvido com o genoma nuclear (ATTARDI, 1985), mostra evolução de algumas regiões de 1 a 10 vezes mais rápida do que a do DNA nuclear (NEDBAL; FLYNN, 1998). Essa característica permite sua utilização como marcador molecular em estudos de microevolução (AVISE, 2000). O tamanho reduzido, a ocorrência de múltiplas cópias dentro das células e o fácil isolamento são apenas algumas das vantagens para o uso do genoma mitocondrial em estudos filogenéticos. Destaca-se também, a herança materna com ausência ou frequência mínima de recombinação, tornando mais diretas as reconstruções filogenéticas, e a extensiva variação intraespecífica, geralmente relacionada às simples substituições de bases com algumas, geralmente pequenas, inserções ou deleções (AVISE et al., 1987).

Os componentes básicos do genoma mitocondrial dos vertebrados são: genes de 22 RNA transportadores (tRNA), 13 genes codificadores de proteínas (geralmente envolvidas com transporte de elétrons e fosforilação oxidativa), dois genes de RNA ribossomais (rRNA), uma ou duas grandes regiões não-codificadoras, ausência de íntrons e presença de pequenos espaçadores intergênicos, geralmente menores que 10 pares de base (QUINN, 1997).

O gene *citocromo b* é o único codificado pelo mtDNA, e está envolvido com o transporte de elétrons na cadeia respiratória (KVIST, 2000). O *citocromo b* é codificado por um gene que varia de 381 a 1143 pares de base, e é considerado mais conservado do que a

região controle do genoma mitocondrial. Alguns autores consideram que as substituições sinônimas nos treze genes codificadores de proteínas do mtDNA evoluam a uma taxa tão rápida quanto a taxa de evolução da região controle (MOORE; DEFILIPPIS, 1997). A grande maioria das substituições de nucleotídeos do *citocromo b* é sinônima, e Kocher e colaboradores (1989), destacam diversos aminoácidos, e em especial quatro, que são essenciais para função deste gene, e que não variam em organismos tão distantes quanto o homem, roedores, aves e peixes, representando uma região altamente conservada (FARIAS et al., 2001).

O *citocromo b* é considerado um excelente marcador, amplamente utilizado em análises de filogenias moleculares e é provavelmente o gene mitocondrial melhor conhecido em relação à estrutura e função de seu produto protéico (ESPOSTI et al., 1993). Seu uso se justifica pela presença de regiões conservadas e variáveis, as quais contem sinais que podem ser utilizados em análises filogenéticas em diferentes níveis. No entanto, muitos problemas têm sido identificados no uso do gene *citocromo b* em análises filogenéticas, dentre os quais está a composição de bases, a taxa de variação entre linhagens, a saturação na terceira base do códon e a limitada variação nas primeiras e segundas bases do códon, resultando em pouca informação para problemas evolutivos, e poucos sítios informativos na terceira posição do códon no nível populacional (MEYER, 1994). No entanto, um grande número de trabalhos com animais tem usado o DNA mitocondrial para avaliar populações ou relações em baixos níveis taxonômicos (LOVEJOY; De ARAÚJO, 2000; MEYER, 1993; ROCHA-OLIVARES et al., 1999; TSIGENOPOULOS; BERREBI, 2000).

Ao contrário da região controle, sequências do *citocromo b*, por sua conservação e raras inserções ou deleções, são facilmente alinháveis, mesmo entre espécies às vezes muito distantes. Com o advento da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* ou PCR) (SAIKI et al., 1988) e o aumento da disponibilidade de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para mtDNA (KOCHER et al., 1989; TTWG, 2007b), o sequenciamento tem sido cada vez mais a técnica predominante nesses estudos, permitindo acesso à variação genética no nível do DNA de forma rápida e direta. Atualmente, encontra-se grande volume de dados na literatura e em bancos de dados, facilitando a comparação de resultados entre espécies (CRAWFORD et al., 2014; KVIST, 2000). Assim, considerando a ampla utilização desse

gene de mtDNA, e a disponibilidade do mesmo em bancos de dados referentes às espécies em estudo, foi selecionado o gene mitocondrial *citocromo b* como o marcador molecular a ser utilizado.

1.9. Filogeografia

A Filogeografia estuda os princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens, pois associa a biogeografia, a genética populacional e a filogenia molecular, no estudo dos polimorfismos de genes em populações de uma espécie ou entre espécies próximas (AVISE, 1998). Estudos de filogeografia comparativa têm sido valiosos para o desenvolvimento e teste de hipóteses sobre processos evolutivos históricos com impacto na composição da biodiversidade atual, relacionando-a com biogeografia, principalmente por meio das diferenças entre sequências de DNA (AVISE, 2000). Análises de padrões filogeográficos intraespecíficos conduzem a observação de barreiras e estruturas físicas, levando a um maior avanço no conhecimento dos processos biogeográficos históricos (EIZIRIK, 2001).

Apesar da filogeografia ter sido usada comumente como método de esclarecimento de padrões históricos e evolutivos entre populações de uma espécie, as aproximações filogeográficas também podem ser úteis, em conjunto com estudos genéticos e populacionais, para inferir processos demográficos históricos como fluxo gênico, tamanho efetivo populacional, sequências de colonização, gargalos de garrafa e também para determinar os limites entre espécies e identificar unidades de significância evolutiva (AVISE et al., 1987; AVISE, 2000, 2009; FREELAND, 2005; VAZQUEZ; DOMINGUEZ, 2002, 2007).

A literatura tem indicado a utilização de metodologias diversas em associação, na elucidação de questões taxonômicas em quelônios, não só para a descrição de novas espécies, mas também em estudos sobre diversidade e distribuição morfológica e genética desses animais (PADIAL et al., 2010; PARHAM et al., 2006). Populações de quelônios morfológicamente distintas são comumente reconhecidas como espécies novas, pois a morfologia fornece evidências de linhagens evolutivas independentes (STUART; PARHAM, 2004). Por outro lado, incongruências nesses aspectos argumentam contra o reconhecimento

de novas espécies apenas com um único conjunto de dados, sejam eles moleculares, morfológicos, comportamentais ou bioquímicos, no intuito de evitar a inflação taxonômica, que é a nomeação equivocada de novos táxons (PARHAM et al., 2006).

Apesar do extenso uso de filogenias baseadas no uso de mtDNA para a reconstrução de padrões filogeográficos (AVISE, 2000), poucos estudos nessa área têm utilizado tais metodologias para os Testudinidae Brasileiros.

Estudos multidisciplinares envolvendo Testudinidae brasileiros são incipientes na literatura, e considerando a existência de populações com características distintas do padrão para a espécie *C. carbonarius*, estudos dessa natureza permitiriam melhor caracterização das populações de jabutis, auxiliando a elucidação de questões taxonômicas, história natural e ações de conservações.

Duas espécies de jabutis são descritas para o Brasil, sendo elas, *C. denticulatus* e *C. carbonarius*. Entretanto, observou-se, inicialmente no Criatório de Animais Silvestres e Exóticos “Reginaldo Uvo Leone”, a existência de populações que não correspondiam ao padrão típico da espécie *C. carbonarius*, sendo estes, classificados como morfotipos 1, com base em caracteres morfológicos e de coloração. Posteriormente, em visitas técnicas ao Museu Paraense “Emílio Goeldi”, observamos animais que não correspondiam ao padrão das espécies *C. denticulatus* e *C. carbonarius* e do morfotipo 1. Dessa forma, com base em suas características morfológicas e de coloração, o classificamos como morfotipo 2.

A hipótese proposta no presente estudo é a de que os morfotipos correspondam a espécies já diferenciadas, e que não devem ser consideradas como uma mesma unidade taxonômica que *C. carbonarius*. Para corroborar a hipótese apresentada, foram analisados dados associados sobre: biogeografia, vocalização, morfologia, dimorfismo sexual, citogenética, perfil de hemoglobinas e moleculares, por meio de um fragmento do gene mitocondrial *citocromo b* em jabutis brasileiros, no intuito de explorar o potencial taxonômico discriminativo das técnicas avaliadas, e corroborar a hipótese apresentada.

Objetivos

2. Objetivo Geral

Auxiliar na elucidação da taxonomia dos Testudinidae brasileiros e ao entendimento dos processos filogeográficos que moldaram a diversidade do gênero *Chelonoidis*, por meio de informações sobre biogeografia, vocalização e preferência sexual, análise morfológica, perfil de hemoglobinas, análises citogenéticas e de DNA mitocondrial.

2.1. Objetivos específicos

1. Delinear as áreas de ocorrência de jabutis, por meio da avaliação biogeográfica dos dados disponíveis na literatura e a partir de espécimes depositados em coleções herpetológicas;
2. Descrever as características físicas da vocalização das espécies *C. carbonarius*, *C. denticulatus* e do morfotipo 1, estabelecendo padrões espécie-específicos, a fim de utilizá-los como uma característica adicional à taxonomia do grupo; Investigar a preferência das fêmeas e dos machos por vocalizações inter e intraespecíficas, fornecendo dados sobre a comunicação e reconhecimento sonoro intraespecífico;
3. Avaliar aspectos morfológicos e padrão de dimorfismo do gênero *Chelonoidis* em regiões previamente definidas no Brasil;
4. Caracterizar e comparar o cariótipo de *C. carbonarius*, *C. denticulatus* e do morfotipo 1 com base em técnicas de citogenética clássica de bandamento (C, G, Ag-Nor) e de hibridação *in situ* (HIS);
5. Avaliar o perfil das frações de hemoglobina em *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e morfotipo 1, por meio da determinação do padrão de migração eletroforética e das globinas em pH alcalino e ácido e quantificar as frações por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC);
6. Analisar um fragmento do gene *citocromo b* (mtDNA), como parâmetro taxonômico, por meio de análise comparativa, no intuito de explorar o potencial discriminativo da variabilidade genética no gênero *Chelonoidis*;
7. Correlacionar os parâmetros avaliados, com finalidade de inferir a história evolutiva, os processos demográficos e históricos que moldaram a diversidade do gênero *Chelonoidis* no Brasil.

Considerações Éticas

3. Considerações Éticas

Todos os experimentos realizados para o desenvolvimento deste trabalho foram autorizados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP/IBILCE (No. 037/11) e aprovado pelo IBAMA/SISBIO (No. 19514-1).

Os animais utilizados para o desenvolvimento deste projeto foram obtidos no Criatório de Animais Silvestres e Exóticos “Reginaldo Uvo Leone”, Tabapuã-SP, no Bosque Municipal de Araçatuba e São José do Rio Preto - SP, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - AM (INPA), e no Museu Paraense “Emílio Goeldi” - PA.

Capítulo 1

4. Capítulo 1. Biogeografia dos Testudinidae Brasileiros

Resumo

A distribuição geográfica de uma espécie é resultado da interação de complexo conjunto de fatores e processos. Sugere-se que o jabuti *C. denticulatus* está associado a florestas úmidas, enquanto sua espécie irmã *C. carbonarius* ocorre tanto em florestas como em fitofisionomias mais abertas. Entretanto, não existem trabalhos na literatura que tenham utilizado abordagens quantitativas para avaliar, em escala geográfica, possíveis novas espécies em relação a suas distribuições geográficas, associando parâmetros de análise taxonômica. Neste estudo, compilou-se registros de ocorrência de *C. denticulatus* e de *C. carbonarius* e de um morfotipo 1, inicialmente descrito por SILVA (2011), com dados da literatura e em coleções herpetológicas do Museu Paraense “Emílio Goeldi”, e do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Além do morfotipo já descrito, identificou-se ocorrência de um novo padrão, denominado morfotipo 2, que apresenta distribuição geográfica, coloração e características morfológicas distintas dos outros grupos anteriormente definidos. Com base nos dados obtidos pela avaliação biogeográfica dos espécimes na literatura, obteve-se que, a distribuição do padrão típico da espécie *C. carbonarius* está associado à região Nordeste do país, não havendo animais depositados nas coleções visitadas. No Brasil, *C. denticulatus* ocorre em todos os estados da Amazônia Legal, além de apresentar registros isolados para o domínio da Floresta Atlântica, nos Estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro, e para a região Centro-Oeste, nos estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Na região Nordeste, apresenta ocorrência no estado da Bahia. O morfotipo 1, apresenta distribuição geográfica mais abrangente que *C. carbonarius* e são possivelmente atribuídos a ele, os relatos de distribuição associados a *C. carbonarius*, indicando associação errônea do morfotipo 1 como a mesma unidade taxonômica que *C. carbonarius*. O morfotipo 2 apresenta ocorrência restrita aos estados do Pará, Maranhão e Piauí. Foram identificadas regiões de simpatria entre o morfotipo 1 e *C. denticulatus*, nos estados do Amazonas, Acre, Rondônia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Tocantins e Goiás. Apenas no estado da Bahia encontrou-se simpatria entre *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, e para o morfotipo 2, ocorreu simpatria com *C. denticulatus* apenas nos estados do Pará, Maranhão e Piauí. Não foi observado simpatria entre os morfotipos avaliados e *C. carbonarius*, e nem entre os morfotipos 1 e 2. Os resultados obtidos sugerem que as distribuições geográficas de *C. denticulatus* e de *C. carbonarius* estão associadas à distribuição das diferentes fisionomias vegetais da América do Sul, e que *C. carbonarius* parece tolerar uma maior amplitude de condições ambientais que *C. denticulatus*, fator esse possivelmente relacionado a presença de morfotipos, como indicado pela ocorrência de *C. carbonarius* em fisionomias vegetais que incluem condições ambientais mais contrastantes. Ressaltamos que, parte da distribuição geográfica atribuída atualmente a *C. carbonarius*, se deve ao fato de todos os morfotipos da espécie serem considerados como uma única unidade taxonômica. Entretanto, informações sobre esses animais em populações naturais se fazem necessários para melhor caracterização biogeográfica dos mesmos.

Palavras chave: Biogeografia, Testudinidae, Jabutis, Morfotipo.

Introdução

A distribuição geográfica de uma espécie é resultado da interação de um complexo conjunto de fatores e processos. A ausência de uma espécie em determinada região pode estar relacionada à sua incapacidade de dispersão, à preferência por outros tipos de ambientes, à sua exclusão devido à interação com outros organismos, ou à intolerância a características físicas e químicas do ambiente (KREBS, 1994).

Informações sobre a biogeografia de espécies com ampla ocorrência, como é o caso dos jabutis *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, muitas vezes refletem deficiências na amostragem de regiões isoladas e ainda pouco estudadas. Poucas representações das distribuições geográficas destas duas espécies de Testudinidae foram publicadas (IVERSON, 1986; MOSKOVITS, 1985; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; VANZOLINI, 1994). A melhor caracterização da distribuição geográfica das espécies se dá por meio do aumento do número de registros, permitindo a exploração de fatores relacionados a padrões biogeográficos. Pritchard e Trebbau (1984) discutem algumas diferenças relacionadas ao uso do ambiente pelas duas espécies de jabutis, porém não fazem nenhuma abordagem quantitativa visando identificar fatores relacionados aos distintos padrões biogeográficos das mesmas.

A espécie *C. denticulatus* é frequente em florestas tropicais, enquanto que *C. carbonarius* é encontrada em uma gama mais ampla de ambientes, incluindo florestas secas e áreas de vegetação florestal, em cerrados. Entretanto, em várias localidades, essas espécies ocorrem em simpatria, especialmente em regiões de transição entre florestas e cerrado (AUFFENBERG, 1965; JEROZOLIMSKI, 2005; MEDEM et al., 1979; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; MOSKOVITS, 1998; ZUG, 1993).

A espécie *C. carbonarius* (SPIX, 1824), popularmente conhecida como “jabuti-piranga” ou “jabuti-de-patas-vermelhas”, é um animal terrestre, que apresenta carapaça convexa, de cor cinza à marrom ou preta, com desenhos simétricos. Seu plastrão apresenta a mesma coloração escura, com forma côncava nos machos. As fêmeas alcançam maior porte, e sua distribuição geográfica é atribuída às regiões de cerrado da Venezuela, Colômbia, Suriname, Guianas, Guiana Francesa, Bolívia, Paraguai, Argentina, Caribe, nas ilhas

Venezuelanas Margarita e Los Tertigos e, no Brasil, nos estados do Pará, Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia, Goiás, Mato Grosso e Roraima (ERNEST; BARBOUR, 1989; PRITCHARD, 1979; PRITCHARD; TREBBAU, 1984). Entretanto, esses dados não levam em consideração a ocorrência de morfotipos, assumindo toda variação morfológica e de coloração, como uma mesma unidade taxonômica.

A espécie *C. denticulatus* (LINNAEUS, 1766), popularmente conhecida como “jabuti-tinga” ou “jabuti-de-patas-amarelas”, possui a região cefálica e membros locomotores amarelos e a escama nasal preta. Os machos são maiores que as fêmeas, podendo atingir até 70 cm de comprimento e as fêmeas até 40 cm, sendo o peso médio da espécie entre oito e 18 kg. A espécie representa o maior quelônio terrestre da América do Sul, podendo ser encontrado em florestas densas tropicais e subtropicais, do Sudeste da Venezuela, passando pelas planícies da Guiana, e para o Brasil, onde habitam toda bacia Amazônica, ocupando áreas da porção oriental do Equador e Colômbia, Norte oriental do Peru e Norte e Sudeste da Bolívia (PRITCHARD; TREBBAU, 1984). No Brasil, ocorrem em pontos restritos da região Nordeste, na bacia do Rio Mearim, no Maranhão, e próximo à foz do Rio São Francisco; na região Centro-Oeste está presente junto às nascentes do Rio Tocantins. Em Goiás, ocorre na bacia do Rio Paraguai, nas bordas do Pantanal Mato-grossense, e na região Sudeste, ocorre em pontos da Mata Atlântica, próximos à costa, entre a Bahia e o Rio de Janeiro (PRITCHARD; TREBBAU, 1984).

Este capítulo teve por objetivo delinear as áreas de ocorrência de jabutis brasileiros, por meio da avaliação biogeográfica dos dados disponíveis na literatura e a partir de espécimes depositados em coleções herpetológicas.

Material e Métodos

Informações sobre as localidades de ocorrência de *C. denticulatus* e *C. carbonarius* foram obtidas a partir da revisão dos registros da literatura, e dos espécimes de jabutis depositados em coleções herpetológicas do Museu Paraense “Emílio Goeldi” e do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Foram utilizados registros de terceiros, desde que houvesse registros fotográficos que permitissem a correta identificação dos animais, e apenas quando os espécimes foram avistados a mais de 30 km de áreas urbanas, em áreas de vegetação nativa, reduzindo dessa forma, o registro de animais provenientes de cativeiro e que foram liberados pela população.

Todos os animais foram avaliados por meio das características morfológicas e de colocação descritas na literatura (CASTANÕ-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; SILVA, 2011; WILLIAMS, 1960), e classificados como *C. denticulatus*, *C. carbonarius* ou como morfotipo 1 (SILVA, 2011). Os animais depositados nas coleções herpetologicas tiveram suas características morfológicas aferidas, foto documentados, registrados em relação à distribuição geográfica e identificados como *C. denticulatus*, *C. carbonarius*, morfotipo 1 ou 2. Essa reavaliação taxonômica se fez necessária, uma vez que esse é o primeiro trabalho a avaliar e considerar possíveis novas espécies de *Chelonoidis* no Brasil.

Os mapas de distribuição geográfica foram elaborados com base em dados obtidos em coleções herpetologicas de museus e comparados com os dados da literatura. Foram utilizados 54 registros de *C. denticulatus*, 30 de *C. carbonarius* e 30 do morfotipo 1 e 10 registros do morfotipo 2. Para representar as áreas de ocorrência dos jabutis, os dados obtidos na literatura e nas coleções herpetologicas foram plotados em um mapa político do Brasil, disponibilizado pelo IBGE (2015).

Resultados e Discussão

Durante a visita técnica realizada junto ao Museu Paraense “Emílio Goeldi”, observou-se a presença de alguns espécimes que apresentavam características morfológicas e de coloração distintos do padrão de *C. denticulatus*, *C. carbonarius*, e do morfotipo 1, sendo classificados como morfotipo 2. Os animais classificados como morfotipo 2, eram menores que 20 centímetros de comprimento linear da carapaça, dessa forma, não foram utilizados nas aferições morfológicas, apenas como referência para a avaliação biogeografica, e de padrão de coloração.

No Brasil, *C. denticulatus* ocorre em todos os estados da Amazônia Legal, além de apresentar registros isolados para o domínio da Floresta Atlântica, nos Estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro, e para a região do Brasil central, nos Estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Na região Nordeste, apresenta ocorrência no estado da Bahia (Figura 1).

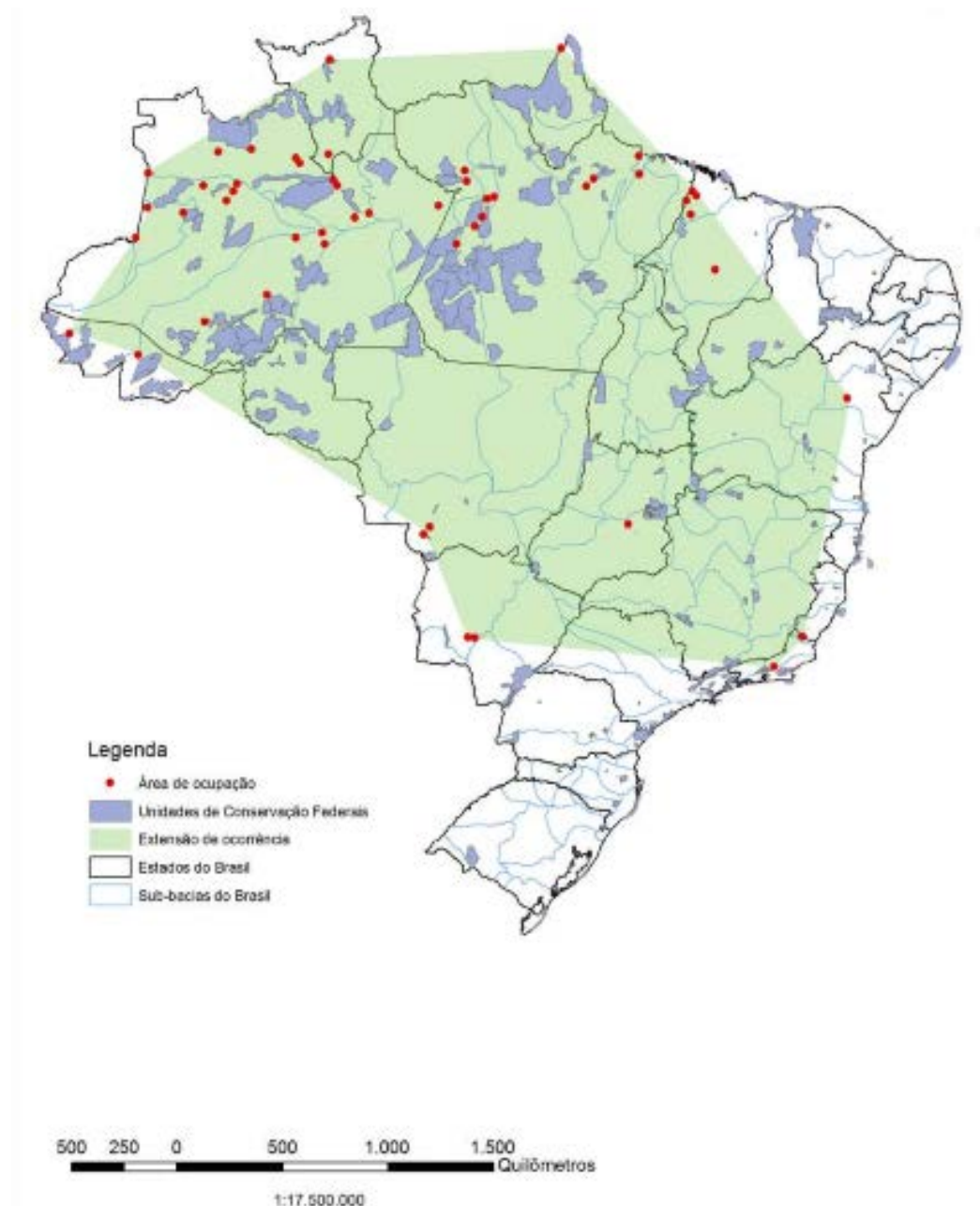


Figura 1. Áreas de ocorrência de *C. denticulatus* no Brasil. Fonte: Répteis e Anfíbios Nacionais (RAN - IBAMA).

A espécie *C. carbonarius*, é citada como tendo ocorrência em todos os países da região Norte da América do Sul cisandina, com exceção do Peru e Equador, além da região transandina da Colômbia, no Sudeste do Panamá e em várias ilhas do Caribe, na maioria dos casos, devido a introduções realizadas pela população (BARBOUR, 1934; PRITCHARD; TREBBAU, 1984). Segundo Censky (1988), a possibilidade de dispersão natural para algumas das ilhas do Caribe não pode ser descartada. As áreas mais ao Sul de sua distribuição incluem regiões do Paraguai e do Norte da Argentina, onde *C. denticulatus* parece não ocorrer.

Para *C. carbonarius*, é citada ocorrência nos estados do Pará, Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia, Goiás, Mato Grosso e Roraima (**Figura 2**). Entretanto, os dados disponíveis na literatura (VINKE et al., 2008) sugerem que o padrão típico da espécie, tenha ocorrência apenas para a região Nordeste do país, no estado da Bahia, e não amplamente distribuída como sugerido pela literatura (RAN - IBAMA).



Figura 2. Áreas de ocorrência de *C. carbonarius* no Brasil. Fonte: Répteis e Anfíbios Nacionais (RAN – IBAMA).

Nota-se, com base nas proporções corpóreas, padrão de coloração e distribuição, que parte significativa dos registros atribuídos a *C. carbonarius*, disponíveis na literatura, não correspondem ao padrão típico da espécie (**Figura 3**). A espécie *C. carbonarius* é conhecida popularmente como “jabuti-de-patas-vermelhas”, entretanto, foram observados animais com

coloração laranja (Morfotipo 1), e amarela (Morfotipo 2). Além do padrão de coloração, observam-se diferenças nas escamas pré-frontais e na morfologia.

O morfotipo 1, apresenta distribuição geográfica mais abrangente que *C. carbonarius* e são possivelmente atribuídos a ele, diversos relatos de distribuição associados a *C. carbonarius*, indicando citação equivocada do morfotipo 1 como a mesma unidade taxonômica que *C. carbonarius*. O morfotipo 1 apresenta a maior distribuição geográfica entre os grupos estudados, ocorrendo na região Norte do Brasil, a partir do estado do Amazonas, até a região Centro - Oeste, já o morfotipo 2 apresenta ocorrência restrita aos estados do Pará, Maranhão e Piauí. Entretanto, os dados de distribuição e ocorrência desses animais em populações naturais se fazem necessários para melhor caracterização biogeográfica dos mesmos (**Figura 3**).



Figura 3. Áreas de ocorrência de *C. denticulatus*, *C. carbonarius*, morfotipo 1 e morfotipo 2 no Brasil. ● - *C. denticulatus*; ● - *C. carbonarius*; ● - Morfotipo 1; ● - Morfotipo 2.

Foram identificadas regiões de simpatria entre o morfotipo 1 e *C. denticulatus*, nos estados do Amazonas, Acre, Rondônia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Tocantins e Goiás. Apenas no estado da Bahia encontrou-se simpatria entre *C. denticulatus* e *C. carbonarius*. Para o morfotipo 2, ocorreu simpatria com *C. denticulatus* apenas nos estados do Para, Roraima e Maranhão e Piauí. Não foi observado simpatria entre os morfotipos avaliados e *C. carbonarius*, e nem entre os morfotipos 1 e 2 (**Figura 3**).

Nos primeiros mapas de distribuição geográfica de *C. denticulatus* e de *C. carbonarius*, publicados por Pritchard e Trebbau (1984), não foram incorporados alguns registros importantes de ambas as espécies que, caso considerados, alterariam profundamente os padrões de distribuição resultantes (VANZOLINI, 1994). Por exemplo, no mapa que representa a distribuição geográfica de *C. carbonarius* elaborado por Pritchard e Trebbau (1984), as regiões de ocorrência desta espécie no extremo Norte da América do Sul (incluindo regiões da Venezuela, Colômbia, Guiana, Suriname, Guiana Francesa e extremo Norte do Brasil) estão completamente isoladas das regiões de ocorrência da espécie nas regiões Nordeste e Central do Brasil e em outros países localizados na região central da América do Sul, incluindo a Bolívia, o Paraguai e a Argentina. Existe uma série de registros de ocorrência de *C. carbonarius* para os estados de Roraima, do Amazonas e do Pará, que demonstra que as duas grandes regiões representadas por Pritchard e Trebbau (1984) são evidentemente contínuas. Equívocos como este também estão presentes em livros texto como, por exemplo, no livro *Turtles of the World* (ERNST; BARBOUR, 1989) onde a ocorrência de *C. carbonarius* na bacia Amazônica é citada, equivocadamente, como limitada à região Oriental.

O presente trabalho é o primeiro a realizar registros oficiais dos morfotipo 1 e 2, ressaltando que, parte significativa das ocorrências atribuídas a espécie *C. carbonarius*, correspondem, na realidade aos morfotipos, e não ao padrão típico da espécie. Outro fator relevante que limita o registro real da ocorrência das espécies de *Chelonoidis* no Brasil é a baixa densidade populacional decorrente de atividade antrópica intensa, como tráfico, poluição industrial, perda de habitats, coleta dos filhotes como animais de estimação, coleta dos ovos e caça dos adultos para consumo alimentar. Além dos fatores supra citados, parte das falhas na descrição das áreas de ocorrências dos *Chelonoidis* deve-se a falta de inventários adequados, e não necessariamente à não ocorrência das mesmas nessas áreas (JEROZOLIMSK, 2005).

É provável que populações ancestrais de *C. denticulatus* que se estabeleceram no domínio da Mata Atlântica tenham alcançado esta região durante um período de maior conectividade com o domínio da floresta Amazônica, pois registros palinológicos indicam que a região do Brasil Central já foi mais úmida e coberta por florestas tropicais (LEDRU,

1993). A distribuição atual de táxons irmãos, de ambientes florestais da Amazônia e da Mata Atlântica, como, por exemplo, espécies de roedores do gênero *Rhipidomys* (COSTA, 2003), indicam que já existiram florestas mais extensas na região onde hoje está o Cerrado, conectando as florestas Amazônica e Atlântica.

Em 1983 Mittermier *apud* PRITCHARD, TREBBAU (1984) relatou que, ao longo de mais de 1000 km de trilhas percorridas, nos mais importantes remanescentes de Mata Atlântica, em quase 30 localidades nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais e Bahia, não encontrou sequer um único exemplar de *C. denticulatus*. Segundo ele, as populações de *C. denticulatus* que ocuparam a Mata Atlântica foram, muito provavelmente, eliminadas pela pressão de caça exercida pelo homem, potencializada pela grande fragmentação deste ecossistema. Assim, o autor acredita que seria surpreendente se ainda existisse algum exemplar desta espécie nas áreas de Mata Atlântica que restaram.

As regiões com maiores chances de ainda manterem populações de *C. denticulatus* seriam os maiores remanescentes deste ecossistema localizados nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (MITTERMIEER, 1983 *apud* PRITCHARD; TREBBAU, 1984). No entanto, no inventário de herpetofauna da Estação Ecológica Juréia-Itatins, um dos mais bem preservados remanescentes da Floresta Atlântica de planície e de encosta, com cerca de 82.000 ha, localizado no Sudeste do estado de São Paulo, não foi registrado sequer um jabuti (MARQUES; SAZIMA, 2004). Isso indica que, ou a espécie nunca ocorreu na região Sudeste de São Paulo, possivelmente devido às baixas temperaturas atingidas durante os meses de inverno, ou se ela já ocupou esta região, suas populações foram localmente extintas.

Entretanto, na Reserva Florestal de Linhares (ES), Garla et al (2001) registraram, recentemente, que *C. denticulatus* está entre as seis espécies de presas encontradas com maior frequência em fezes de onça (*Panthera onca*). A espécie parece ser relativamente abundante na área, já que indivíduos de *C. denticulatus* são vistos, com frequência, atravessando estradas nos arredores da reserva. É bem provável que *C. denticulatus* também ocorra na Reserva Biológica de Sooretama (ES), área de 242 km, contínua à área da 220 km da Reserva Florestal de Linhares.

Cinthia Brasileiro (comunicação pessoal) encontrou, em 1995, um espécime de *C. denticulatus* com mais de 30 cm de comprimento linear da carapaça na floresta estacional

semi-decídua do Parque Estadual do Morro do Diabo, extremo Oeste do estado de São Paulo. Contudo, Mittermier (*apud* PRITCHARD; TREBBAU, 1984) alerta que devido às duas espécies de *Chelonoidis* serem frequentemente vendidas como animais de estimação por todo o Brasil, torna-se difícil julgar, baseando-se em um único registro, se um indivíduo encontrado em determinada localidade é um remanescente da população local de jabutis ou é apenas um indivíduo originário de outra região, que fugiu do cativeiro ou foi ali introduzido. Desta forma, registros isolados e questionáveis como este não foram considerados na elaboração dos mapas de distribuição de jabutis aqui relatados.

Estudos que relacionem as variações morfológicas e genéticas de populações de *C. denticulatus* e *C. carbonarius* de diferentes regiões com suas distâncias geográficas são importantes para compreendermos os processos e mecanismos que determinaram a atual distribuição destas espécies. Da mesma forma, estudos que determinem as densidades de populações das duas espécies ao longo de um gradiente ambiental, de florestas mais úmidas para florestas mais secas, poderiam ajudar a compreender quais os fatores que influenciam as distribuições destas espécies.

Segundo Auffenberg (1971), os fósseis de jabutis encontrados na formação Villavieja (Colômbia), atribuídos a *C. hesternus*, representam a espécie mais próxima a linhagem ancestral comum a *C. denticulatus* e a *C. carbonarius*. Apesar de Villavieja apresentar, atualmente, clima árido, durante o Mioceno a região foi coberta por florestas tropicais (KAY et al., 1997; WOOD, 1997), o que indica que o ancestral de *C. denticulatus* e de *C. carbonarius* provavelmente habitava ambientes florestais. Desta forma, a associação de *C. carbonarius* a ambientes mais secos e menos florestais, como aqui sugerida, seria uma radiação secundária na história evolutiva deste grupo.

Estudos com algumas espécies de quelônios das famílias Cheloniidae, Emydidae e Testudinidae, para os quais existem evidências fósseis relativamente abundantes, e barreiras geográficas bem conhecidas, sugerem taxa evolutiva média para o DNA mitocondrial de 0,4% por milhão de anos (AVISE et al., 1992; BOWEN et al., 1993; LAMB et al., 1994), o que chega a ser oito vezes menor que as taxas de outros vertebrados. Estimativas do período de divergência entre *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, baseada no sequenciamento de um fragmento de 430 pares de bases do *citocromo b* e assumindo a taxa evolutiva média de 0,4%

por milhão de anos, indica que este evento deve ter ocorrido no início do Mioceno, cerca de 22,5 milhões de anos atrás (JEROZOLIMSK, 2005).

Desta forma, assim como sugerido para outros táxons da região amazônica (MORITZ et al., 2000), a divergência molecular entre *C. denticulatus* e *C. carbonarius* parece não confirmar a “Teoria dos Refúgios Pleistocênicos” (HAFFER, 1969), já que estas espécies se diferenciaram em um período anterior ao das flutuações climáticas ocorridas durante esse período do Quaternário. Entretanto, suas distribuições atuais foram, provavelmente, influenciadas por vários ciclos de alterações na extensão e distribuição das principais fisionomias vegetais, associados a oscilações climáticas, que devem ter sido acompanhadas por expansões e retrações de suas populações. As extensas áreas de simpatria destas duas espécies, incluindo localidades tão distantes entre si como a região dos Llanos del Yari, no departamento de Caquetá (Colômbia) e a região da cidade de Nioaque, no estado do Mato Grosso do Sul, indicam que flutuações nas fitofisionomias desempenharam papel importante na diferenciação deste grupo.

Alguns mecanismos propostos para explicar a diversificação da fauna em florestas tropicais, entretanto, parecem pouco plausíveis no caso deste grupo. Por exemplo, parece ser pouco provável, ao contrário do proposto para espécies de primatas da Amazônia (AYRES; CLUTTON-BROCK, 1992), que a dinâmica de grandes rios tenha desempenhado papel importante na diferenciação dos Testudinidae brasileiros, uma vez que, não há nenhuma evidência baseada em suas distribuições atuais que corrobore tal hipótese. Os jabutis, apesar de não apresentarem morfologia adaptada à natação, são capazes de flutuar na água por longos períodos, sendo encontrados por Jerozolimsky (2005) em duas ocasiões, após forte chuva, flutuando no Riozinho do Anfrísio - PA. Marcio Martins (comunicação pessoal) (*apud* JEROZOLIMSKY, 2005) observou na região da hidrelétrica de Balbina, em 1986, jabutis flutuando no rio Uatumã e no Igarapé Caititu. Castaño-Mora e LugoRugeles (1981), também obtiveram evidências de que jabutis ocasionalmente eram arrastados pelas águas do rio Meta, na Colômbia.

A colonização, por jabutis, de ilhas oceânicas, como as do arquipélago de Galápagos e do Atol de Aldabra, é mais uma evidência de que grandes extensões de água não devem funcionar como barreiras geográficas efetivas para este grupo de quelônios.

Caso a diferenciação de *C. denticulatus* e *C. carbonarius* tenha ocorrido em alopatria, é possível supor um cenário evolutivo em que uma sub-população do táxon ancestral que originou *C. carbonarius* tenha sido isolada do restante da população que originou *C. denticulatus* em uma área florestal que se tornou gradualmente mais seca, mecanismo proposto por Vanzolini e Williams (1981) para explicar a diversificação na Amazônia, derivado da hipótese do refúgio, inicialmente proposta por Haffer (1969). O isolamento dos ancestrais de *C. denticulatus* e *C. carbonarius* pode ter sido desencadeado por mudanças climáticas globais (por exemplo: durante períodos glaciais), por alterações geomorfológicas regionais (ex: soerguimento da cordilheira Andina) que por sua vez teriam desencadeado mudanças climáticas locais ou por uma combinação de fatores globais e regionais.

Independente de qual tenha sido o fator que promoveu o isolamento das populações ancestrais de *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, o cenário resultante teria favorecido à adaptação de *C. carbonarius* às fitofisionomias vegetais mais abertas e secas com temperaturas mais altas e maiores amplitudes térmicas.

A população ancestral de *C. denticulatus*, por sua vez, teria acompanhado a retração das florestas ombrófilas. A maior frequência de *C. carbonarius* em áreas com formações menos florestais e em áreas de transição entre formações mais e menos florestais, quando comparada a *C. denticulatus*, encontrada por Jerozolimsk (2005) parece corroborar essa hipótese.

A espécie *C. carbonarius* é considerada mais generalista em relação a *C. denticulatus*, pois a primeira ocorre não apenas em maior número de eco regiões, mas também em regiões ecologicamente mais contrastantes em relação a fatores como temperatura, pluviosidade e estrutura da vegetação. Entretanto, salientamos que esta característica pode não ser verídica, pois os dados que a suportam não levam em consideração a ocorrência de morfotipos, considerando *C. carbonarius* e os morfotipos como uma única unidade taxonômica. Entre as regiões citadas como de ocorrência para *C. carbonarius*, estão áreas nos domínios da Caatinga, do Pantanal, do Cerrado e áreas de floresta ombrófila densa e Amazônia (JEROZOLIMSKI, 2005).

A ausência de registros da espécie para o domínio de Mata Atlântica, onde existem registros de *C. denticulatus*, é intrigante. Medem et al. (1979) e Ernst e Barbour (1989)

sugerem que possa existir exclusão competitiva entre as duas espécies de jabutis, pelo fato de *C. carbonarius*, em locais de simpatria com *C. denticulatus*, prevalece em áreas raramente utilizadas por *C. denticulatus*, como por exemplo, regiões de cerrado. Entretanto, quando não há ocorrência de *C. denticulatus* em simpatria, a espécie tende a ocupar áreas florestadas em detrimento a áreas de cerrado.

Os dados supra citados são condizentes com os padrões comportamentais observados em cativeiro para *C. denticulatus*, onde os machos são extremamente territorialistas, sendo comumente agressivos com indivíduos da mesma espécie, com *C. carbonarius* e morfotipos.

Contudo, o grande número de registros de simpatria e, em muitos casos, de sintopia das duas espécies, é um indicativo de que, caso ocorra competição entre elas, a interação parece não ser suficientemente importante a ponto de resultar na exclusão de uma delas, e desta forma, por meio de ajustes comportamentais, *C. carbonarius* e os morfotipos conseguem coexistir com *C. denticulatus*. Uma característica marcante nesse sentido é o horário de atividade preferencial apresentado por cada grupo. Observações realizadas no Criatório de Animais Silvestres e Exóticos “Reginaldo Uvo Leone” (Registro IBAMA 167525), mostraram que a espécie *C. denticulatus* entra em atividade logo nas primeiras horas do dia, período no qual se dedica ao forrageamento, já a espécie *C. carbonarius*, apresenta esta atividade nas horas mais quentes do dia. Os morfotipos 1 e 2, apresentam período de atividade de forrageamento intermediários em relação as duas espécies já descritas (observação pessoal não publicada). Diferenças em relação aos horários de maior atividade podem estar relacionadas a mecanismos adaptativos anti excludentes, que propiciam a coexistência entre os grupos.

O fato de ambas as espécies apresentarem hábitos alimentares generalistas reduz a probabilidade de ocorrer competição por esse recurso ambiental, assim como, para áreas de abrigo e postura, que não devem representar um fator limitante para a ocorrência dos grupos, a ponto de os levar a competir por esses recursos. Em cativeiro, é relativamente comum a ocorrência de comportamentos agressivos entre *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, principalmente entre os machos adultos. Ao contrário do que foi descrito por Castaño-Mora e Lugo-Rugeles (1981) que relatou ser incomum eventos agonísticos intraespecíficos.

Em populações silvestres, entretanto, jabutis são essencialmente solitários (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981) e os encontros interespecíficos devem ser raros e ocorrer mais frequentemente em locais com densidade de recursos alimentares, como sob árvores em frutificação. Moskovits (1985) observou, na Ilha de Maracá, o encontro entre machos de *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, nas proximidades de uma árvore de genipapo (*Genipa americana*) e relatou um encontro em que um macho de *C. carbonarius* permaneceu praticamente imóvel enquanto o macho de *C. denticulatus* realizou, por cerca de 45 minutos, os característicos movimentos laterais e de distensão da cabeça descritos por Castaño-Mora e Lugo-Rugeles (1981) para interações entre os sexos desta espécie, até abandonar a área deslocando-se para outro lugar.

Diferenças no comportamento de defesa de território entre os grupos de *Chelonoidis* têm associação direta com o tipo de habitat, uma vez que, para *C. denticulatus*, espécie de áreas florestadas, a locomoção tende a ser um recurso limitado. Dessa forma, os machos foram selecionados positivamente ao longo de sua história evolutiva para aumento do dimorfismo sexual de tamanho, pois a defesa de um determinado território ou recurso, passou a ser vantajosa em termos de seleção natural, aumentando seu valor adaptativo.

Já para espécies de ambientes abertos, o grande tamanho corpóreo do macho deixa de representar uma vantagem seletiva, pois dificultaria a busca ativa por recursos alimentares e por fêmeas durante o período reprodutivo. Dessa forma, a seleção sexual direcionada à produção da prole passa a ser selecionada positivamente, levando a ocorrência de fêmeas com maior tamanho corpóreo. Destaca-se nesse sentido o dimorfismo sexual maior nos machos em *C. denticulatus* e morfotipos, padrão distinto do observado para *C. carbonarius*, em que as fêmeas apresentam maior tamanho corpóreo, indicando que os morfotipos tiveram história evolutiva distinta do padrão da espécie, provavelmente ocorrendo em áreas florestadas.

Dados obtidos por Fretey (1977) e Castaño-Mora e Lugo-Rugeles (1981) indicaram a espécie *C. carbonarius* como tipicamente de campos e cerrados. Jerozolimsk (2005), questionou tais dados, sugerindo que a espécie também ocorreria em grande número em localidades que apresentam vegetação exclusivamente florestal, incluindo regiões no Suriname (M. HOOGMOED, comunicação pessoal *apud* Pritchard; Trebbau, 1984), na

Colômbia (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981), no Panamá (LEGLER, 1963) e no Brasil (MOREIRA, 1989, 1991). As contradições encontradas entre os autores em relação às preferências de uso de habitat entre os *Chelonoidis* no Brasil se devem ao fato de que se consideram apenas duas espécies até o momento, e os padrões distintos da espécie *C. carbonarius*, aqui chamados de morfotipos, apresentam ocorrências geográficas e preferências no uso de habitat distintos de *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, ocorrendo preferencialmente em bordas de áreas florestadas.

Dados referentes à abundância relativa das duas espécies de jabutis de algumas localidades onde elas são simpátricas, parecem indicar, de fato, que as populações de *C. denticulatus* atingem densidades maiores que as populações de *C. carbonarius* e dos morfotipos, em regiões de florestas mais fechadas e úmidas, enquanto que em áreas de florestas mais secas, ocorre o inverso (JEROZOLIMSKI, 2005). No território da aldeia Kayapó de A'Ukre - PA, as abundâncias relativas das duas espécies de jabutis parecem variar bastante em uma escala de poucas dezenas de quilômetros, e o tipo de cobertura vegetal parece estar relacionado a essas variações: em regiões de matas mais úmidas, as populações de *C. denticulatus* atingem densidades mais altas que as populações do morfotipo 2.

Considerando um mesmo tipo de formação vegetal, diferenças, entre as duas espécies, no sucesso reprodutivo e nas taxas de sobrevivência dos diversos estágios de desenvolvimento, poderiam resultar em diferentes densidades populacionais. Segundo Castaño-Mora e Lugo-Rugeles (1981), a casca da maioria dos ovos de *C. denticulatus* é mais grossa e apresenta uma superfície mais rugosa e porosa que a dos ovos de *C. carbonarius*. Essa diferença poderia fazer com que os embriões de *C. denticulatus* fossem mais susceptíveis à desidratação que embriões de *C. carbonarius*, em ambientes mais quentes e secos. Entre os dois morfotipos, observam-se padrão de casca de ovo e tamanho, semelhantes ao observado em *C. denticulatus*. Tais dados são condizentes com a hipótese sugerida por Silva (2011), de que os morfotipos ocorrem em ambientes próximos a áreas florestadas, sofrendo dessa forma ao longo de sua evolução, padrões de seleção semelhantes aos de *C. denticulatus*.

Conclusões

- A espécie *C. carbonarius* apresenta ocorrência apenas para a região Nordeste, no estado da Bahia.
- A espécie *C. denticulatus* ocorre em todos os estados da região Norte e Centro-Oeste, e na região Sudeste, nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo.
- O morfotipo 1 apresenta ocorrência nas regiões Norte e Centro-Oeste, nos estados do Amazonas, Roraima, Acre, Rondônia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Tocantins.
- O morfotipo 2 têm ocorrência nos estados do Pará, Amapá, Maranhão e Piauí.
- Não há sobreposição de ocorrência entre os morfotipos 1 e 2 e a espécie *C. carbonarius*.
- A espécie *C. denticulatus* ocorre em simpatria com os morfotipos 1 e 2 e com a espécie *C. carbonarius*.

Capítulo 2

5. Capítulo 2. Vocalização e Preferência Sexual em Testudinidae

Resumo

São escassos os estudos que abordam a importância do comportamento de vocalização no isolamento reprodutivo pré-zigótico de espécies de jabutis. Aspectos comportamentais como a comunicação intraespecífica podem se mostrar tão confiáveis quanto dados morfológicos ou moleculares para inferir relações evolutivas. Nesse contexto, a utilização de características distintas e independentes, como por exemplo, padrões de vocalização e preferência sexual por estímulos sonoros específicos, podem fornecer indícios sobre isolamento reprodutivo mediado por mudanças acústico-comportamentais, fornecendo dados valiosos para a elucidação dos processos que influenciam na escolha em machos de quelônios terrestres Brasileiros. Dessa forma, objetivou-se a utilização das características físicas da vocalização durante a cópula e a preferência por sinal sonoro intraespecífico de jabutis Brasileiros como modelo de estudo de isolamento reprodutivo. A maioria das vocalizações foram obtidas entre os meses de Outubro e Novembro de 2012, período de maior atividade reprodutiva. Não foi observada nenhuma cópula de *C. denticulatus* durante todo o período de observações, o que impossibilitou a obtenção de dados para esse grupo. A análise das características físicas da vocalização (frequência fundamental (Hz), intervalo entre notas (s), duração de cada nota (s) e número de notas de cada vocalização) foi realizada posteriormente à obtenção das mesmas, por meio do programa *Raven* 1.3. A análise e comparação das características físicas da vocalização entre *C. carbonarius* e o Morfotipo 1 foi realizada no intuito de obter informações acerca do comportamento reprodutivo e possível separação desses dois grupos de jabutis. Construiu-se uma arena quadrangular na qual foram realizados os experimentos de preferência por estímulo sonoro espécie específico. Os experimentos de preferência foram conduzidos no mês de Outubro, sempre com a presença de dois observadores, para minimizar os erros de observação. Após a obtenção dos dados de comportamento, estes foram comparados com o intuito de gerar informações acerca da função e importância da vocalização durante a cópula. As características físicas da vocalização demonstraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados em relação ao intervalo entre notas (s) $p=0,0000$; duração de cada nota (s) $p=0,0000$; (Hz) $p=0,0009$ e número de notas por vocalização $p=0,0002$ nos dois grupos estudados. A espécie *C. carbonarius* apresentou vocalização com uma série longa de harmônicos e frequência dominante no segundo harmônico, enquanto que o morfotipo 1 possui notas com apenas dois harmônicos e frequência dominante no primeiro deles. Os experimentos de preferência por estímulo sonoro não foram conclusivos sobre a preferência por vocalização espécie específica, sendo que apenas fêmeas de *C. carbonarius* demonstraram preferência, indicando possíveis mecanismos de isolamento reprodutivo mediado pelas fêmeas. Os resultados encontrados reforçam a hipótese de que o morfotipo 1 corresponde a uma unidade taxonômica distinta de *C. carbonarius*.

Palavras Chave: *Chelonoidis*, comportamento, vocalização, preferência sexual.

Introdução

Membros da família Testudinidae são bons modelos para se estudar a seleção sexual, pois possuem comportamento elaborado de corte, baseado em sinais táteis, olfativos, visuais e auditivos. Este último em particular, pode representar um sinal acústico de discriminação entre espécies de jabutis. Estudos acerca da função e da importância da vocalização durante a cópula com *Testudo hermanni* demonstram que este comportamento é fundamental no momento da escolha dos machos pelas fêmeas (GALEOTTI, 2005b). Entretanto, não existem estudos que abordem a importância do comportamento de vocalização no isolamento reprodutivo pré-zigótico de espécies entre espécies de jabutis brasileiras.

Como sugerido por Tinbergen (1959), aspectos comportamentais como a comunicação intraespecífica podem se mostrar tão confiáveis quanto dados morfológicos ou moleculares para inferir relações evolutivas. Nesse contexto, a utilização de características distintas e independentes, como por exemplo, padrões de vocalização e preferência sexual por estímulos sonoros específicos, podem fornecer indícios sobre isolamento reprodutivo mediado por mudanças acústico-comportamentais, fornecendo dados valiosos para a elucidação dos processos que influenciam na escolha dos machos de quelônios terrestres Brasileiros.

Dessa forma, sugeriu-se a utilização da vocalização durante a cópula e a preferência por sinal sonoro intraespecífico de jabutis brasileiros do gênero *Chelonoidis* como modelo de estudo de isolamento reprodutivo.

Este capítulo teve como objetivo, descrever as características físicas da vocalização das espécies *C. carbonarius*, *C. denticulatus* e do morfotipo 1, estabelecendo padrões espécie-específicos, a fim de utilizá-los como uma característica adicional à taxonomia do grupo, além de investigar a preferência de machos e fêmeas por vocalizações inter e intraespecíficas, fornecendo dados sobre a comunicação e reconhecimento sonoro intraespecífico em Testudinidae brasileiros.

Material e Métodos

O presente estudo foi realizado no zoológico municipal “Dr. Flávio Leite Ribeiro” localizado na cidade de Araçatuba, e no zoológico municipal de São José do Rio Preto, ambos no estado de São Paulo.

Os jabutis foram inicialmente identificados como *C. carbonarius*, *C. denticulatus* e morfotipo 1, por meio da avaliação do padrão de coloração e características morfológicas, conforme descrito na literatura (CASTANÕ-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; SILVA, 2011; WILLIAMS, 1960). Cada espécime foi devidamente identificado por meio de marcações temporárias, realizadas de forma numérica, com esmalte sobre a carapaça. Para a avaliação das características físicas da vocalização, foram utilizados 10 machos adultos de *C. carbonarius*, e nove do morfotipo 1.

Apesar de o estudo ter sido desenvolvido em cativeiro, foi realizada a aferição morfológica e comparação dos dados obtidos com animais provenientes de Museus, com procedência confirmada, essa abordagem permitiu maior segurança na classificação dos animais, uma vez que os zoológicos geralmente não possuem registros de origem, e mesmo quando os têm, não há marcações específicas que permitam a correta identificação dos mesmos.

Obtenção e Análise de Dados da Vocalização

Índice de parâmetros acústicos utilizados no presente estudo: **Nota** - É a onda sonora desenvolvida por uma onda complexa, correspondente a superposição do modo fundamental com uma série de harmônicos superiores; **Harmônico** - Componente do serial que é um múltiplo inteiro da frequência fundamental; **Frequência Fundamental** - A primeira frequência componente da série harmônica; **Frequência Dominante** - A frequência com maior intensidade de uma série harmônica; **Intervalo entre notas** - Intervalo em tempo entre a emissão de duas notas; **Duração de cada nota** - Período entre o início e o término de uma nota, medidos em segundos.

Os dados de vocalização foram obtidos por meio de amostragem de todas as ocorrências de um comportamento específico, como descrito por Altmann (1974), na qual um comportamento específico pré-determinado, no caso ‘vocalização durante a cópula’, é gravado a cada vez que é realizado. A utilização desta amostragem apresentou-se a mais adequada, pois o estudo seguiu todas as três premissas propostas pelo autor: i) o estudo foi realizado em cativeiro, permitindo boa visualização e contato com os animais; ii) a vocalização foi facilmente distinguível de outros comportamentos e iii) como o comportamento não ocorre de forma frequente, permitiu que cada casal fosse amostrado isoladamente a cada experimento.

A vocalização durante a cópula foi registrada inicialmente durante os meses de março, abril e maio de 2012, porém os animais demonstraram pouca atividade sexual neste período, com apenas quatro vocalizações amostradas. Posteriormente foram realizadas novas gravações nos meses de setembro e outubro, período em que foi observada maior atividade reprodutiva, sendo obtidas 15 vocalizações.

Todas as vocalizações foram gravadas em equipamento profissional modelo *Marantz* PMD 222, acoplado a um microfone semi-direcional *Sennheiser* ME 66. Estes foram posicionados a aproximadamente um metro de distância do animal vocalizante, para que não houvesse interferência na interação sexual. Todas as vocalizações registradas possuíam o tempo aproximado de dois minutos e foram arquivadas em mídia com formato “*Windows PCM*”. Para cada vocalização foram selecionadas e mensuradas diretamente as seguintes características: frequência fundamental (Hertz - Hz), tempo de intervalo entre cada nota (Segundos - s), duração de cada nota (Milissegundos - ms) e o número de notas por vocalização (**Figura 1**) as quais foram obtidas por meio do *software Raven.Pro* 1.3.

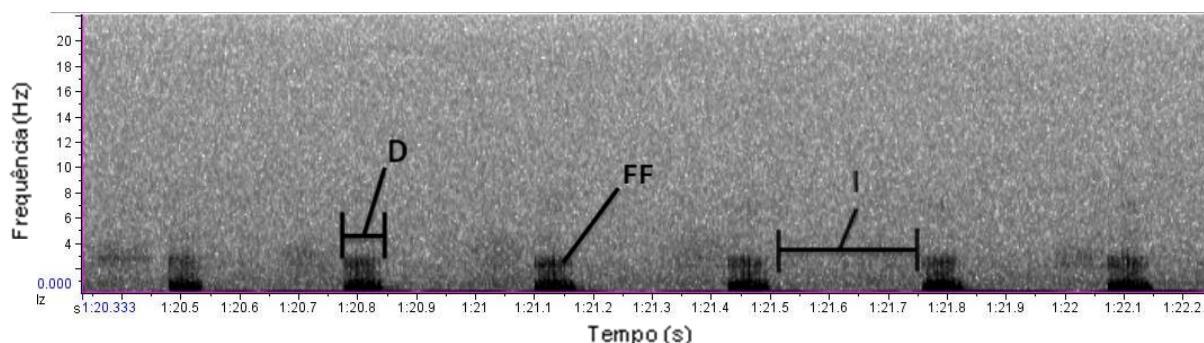


Figura 1. Espectrograma indicando as características físicas da vocalização analisadas no presente trabalho. D – Duração de cada nota; I – Intervalo entre notas e FF – Frequência fundamental.

Preferência por Sinal Sonoro Espécie Específico.

Os experimentos de preferência foram realizados durante o mês de agosto de 2012, duas vezes por semana, das 07h00min às 17h00min, contabilizando oito dias e 56 horas de observações. Os experimentos foram realizados em arena ao ar livre com 4m², construída distante do recinto original em que os animais eram mantidos, impedindo assim possível interferência por estímulos visuais e olfativos por outros animais. No intuito de minimizar interferências relacionadas ao manejo dos animais, os mesmos eram mantidos por 2 horas na arena antes do início do experimento (**Figura 2**).



Figura 2. Foto da arena montada para os experimentos de vocalização e preferência no zoológico municipal “Dr. Flávio Leite Ribeiro” localizado na cidade de Araçatuba, SP.

Foram utilizados dois alto-falantes conectados a computadores portáteis posicionados em lados opostos da arena. Cada alto-falante emitiu a vocalização de um dos grupos (*C. carbonarius* e o morfotipo 1). Antes do início de cada experimento, o animal testado foi posicionado em um círculo no centro da arena durante dois minutos. Após esse período, o experimento teve início, com uma duração de 10 minutos para cada animal, durante os quais, os mesmos foram submetidos às duas fontes de estímulos sonoros simultaneamente. Para minimizar viés na interpretação dos comportamentos, foram posicionados dois observadores, fora da arena, a uma distância de dois metros do animal. A preferência por um dos dois estímulos foi determinada pela quantidade de vezes que o animal testado direcionou a cabeça em direção a fonte do estímulo (**Figura 3**).

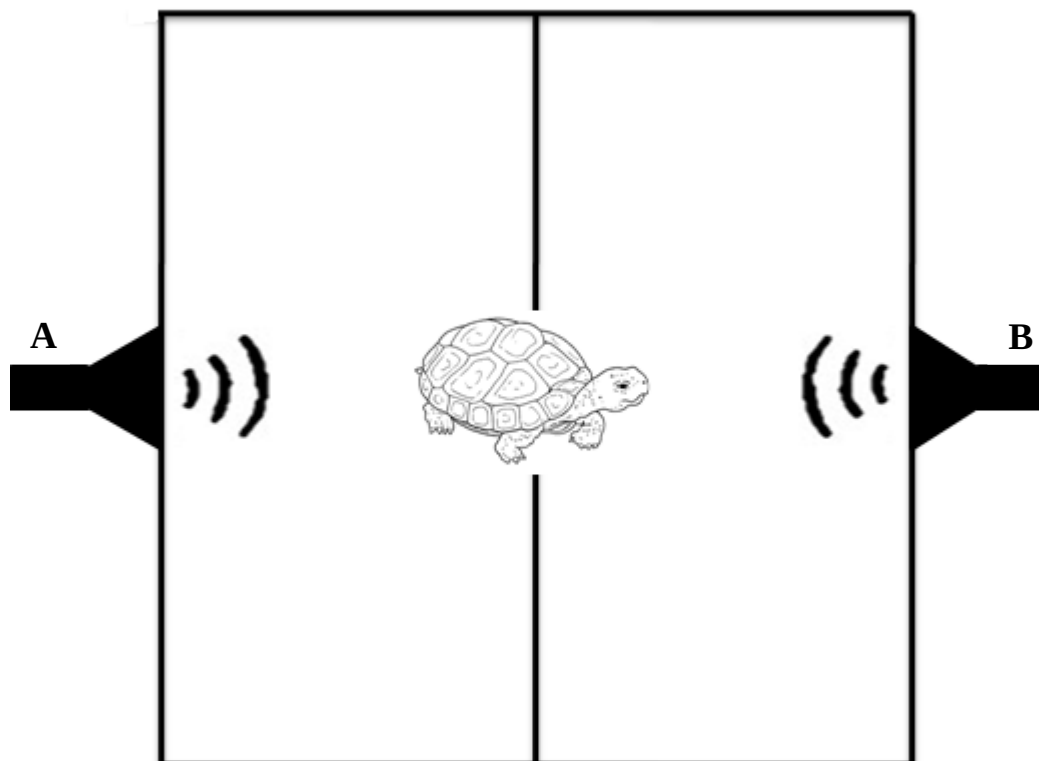


Figura 3. Esquema da arena na qual os experimentos de *playback* foram realizados. A e B representando as vocalizações de *C. carbonarius* e do morfotipo 1.

Cada animal testado recebeu cinco estímulos sonoros de 1 minuto cada, alternados com 1 minuto de silêncio. Comparando o comportamento dos animais nos dois períodos, silêncio/estímulo, foi possível definir se os estímulos sonoros possuíam algum efeito em seu comportamento. Os lados da arena no qual cada estímulo foi emitido foram alternados a cada

animal inserido no recinto. As vocalizações utilizadas nos experimentos foram previamente obtidas do macho sexualmente mais ativo de cada grupo. Não foi possível a realização do experimento de preferência com a espécie *C. denticulatus*, pois nenhuma vocalização foi obtida.

Para testar a preferência sonoro-específica, foram avaliados 10 machos e 10 fêmeas da espécie *C. carbonarius* e do morfotipo 1. Cada animal recebeu simultaneamente, estímulos sonoros de machos de *C. carbonarius* e do morfotipo 1.

Análise Estatística

Os valores obtidos para as características físicas das vocalizações (frequência fundamental, tempo de intervalo entre cada nota, duração de cada nota e o número de notas por vocalização), foram inicialmente submetidos à análise estatística descritiva, posteriormente, foi aplicado o teste de *Mann-Whitney*, pois os dados se apresentaram não paramétricos, para comparação entre as características da vocalização de *C. carbonarius* e do morfotipo 1.

Para analisar a resposta dos jabutis ao estímulo acústico, foi utilizado o teste de *Wilcoxon*, pois os valores foram obtidos por método de pareamento. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software *Statistica 8.0*, e o nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados e Discussão

Características Físicas das Vocalizações.

O maior número de eventos copulatórios observados para os meses de setembro e outubro concordam com o descrito por Vinke et al. (2008). Não foi possível realizar a análise das características físicas da vocalização de *C. denticulatus*, pois os indivíduos desta espécie cessavam suas atividades de cópula com a aproximação do pesquisador. O mesmo comportamento foi descrito por Vinke et al. (2008), destacando que o comportamento natural

do animal é mais influenciado pela atividade antrópica do que o observado em *C. carbonarius* e o morfotipo 1, impedindo desta forma, o registro de seu comportamento reprodutivo durante o período amostrado.

As vocalizações emitidas pelos machos de *C. carbonarius* durante a cópula são compostas por sequências curtas de notas repetidas a um intervalo regular, enquanto as emitidas pelos machos do morfotipo 1, são compostas por sequências mais longas, e por notas repetidas a um intervalo regular, apresentando notas com apenas dois harmônicos, diferindo entre os espécimes estudados. Observou-se que em *C. carbonarius*, a Frequência Fundamental (Hz) e a Frequência Dominante (Hz) estão localizadas no primeiro e segundo harmônico dentro da nota (**Figura 4A**). Para o morfotipo 1, o primeiro harmônico é o que possui a Frequência Dominante, portanto está localizado no mesmo local que a Frequência Fundamental (Hz) (**Figura 4B**).

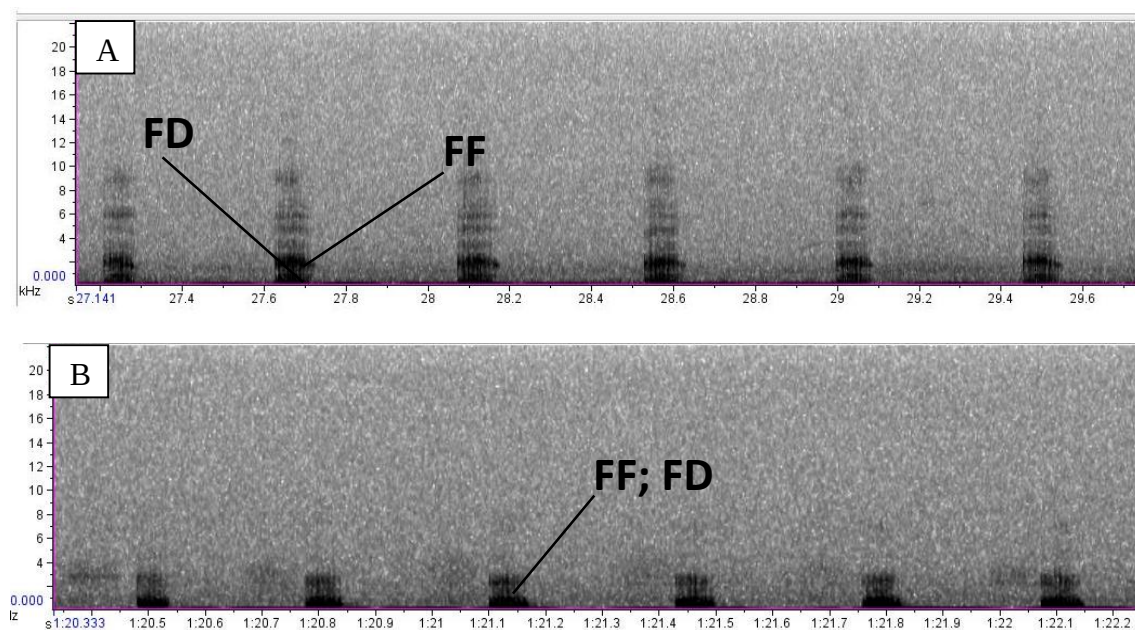


Figura 4. Espectrogramas demonstrando a localização na série harmônica, da frequência fundamental (FF) – (primeira frequência da série harmônica) e da frequência dominante (FD) – (frequência com maior energia da série harmônica). **A)** *C. carbonarius*, **B)** Morfotipo 1.

As notas soam como um “cacarejo” e são moduladas em frequência, apresentando estruturas com vários harmônicos. As características físicas das vocalizações analisadas no presente estudo possuem variação intraespecífica (**Tabela 1**).

Tabela 1. Estatística descritiva das características físicas das vocalizações de *C. carbonarius* e morfotipo 1, destacando a variação interespecífica das características avaliadas.

Características Físicas da vocalização	Média ± Desvio Padrão	
	<i>Chelonoidis carbonarius</i>	Morfotipo 1
Duração das notas (s)	0,31 ± 0,109 (0,055-0,513)	0,239 ± 0,058 (0,052-0,411)
Intervalo entre as notas (s)	0,086 ± 0,023 (0,04-0,227)	0,071 ± 0,041 (0,021-0,161)
Frequência fundamental (Hz)	436,5 ± 229,96 (186-1537)	424,15 ± 125,7 (183-1030)
Número de notas por vocalização	9,83 ± 4,05 (4-24)	14,53 ± 6,31 (7-40)

No presente estudo foram comparadas quatro características físicas das vocalizações (duração de cada nota, intervalo entre notas, frequência fundamental e número de notas por vocalização) entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1, e apesar da ocorrência de variação intraespecífica, foi observada diferença estatisticamente significativa entre as quatro características (intervalo entre notas (s) $p=0,0000$; duração de cada nota (s) $p=0,0000$; frequência fundamental (Hz) $p=0,0009$ e número de notas por vocalização $p=0,0002$) entre os dois grupos estudados, indicando a eficiência desta variável para a elucidação taxonômica em Testudinidae. Estudos anatômicos se fazem necessários para determinar quais fatores morfofuncionais influenciam esta variação e descrever quais características são importantes para a diferenciação de cada grupo.

A figura 5 mostra a análise estatística realizada nos dados de características físicas da vocalização, sendo todas as comparações estatisticamente significantes, indicando que a espécie *C. carbonarius* e o morfotipo 1, com base no padrão de vocalização, não podem ser considerados como uma única unidade taxonômica.

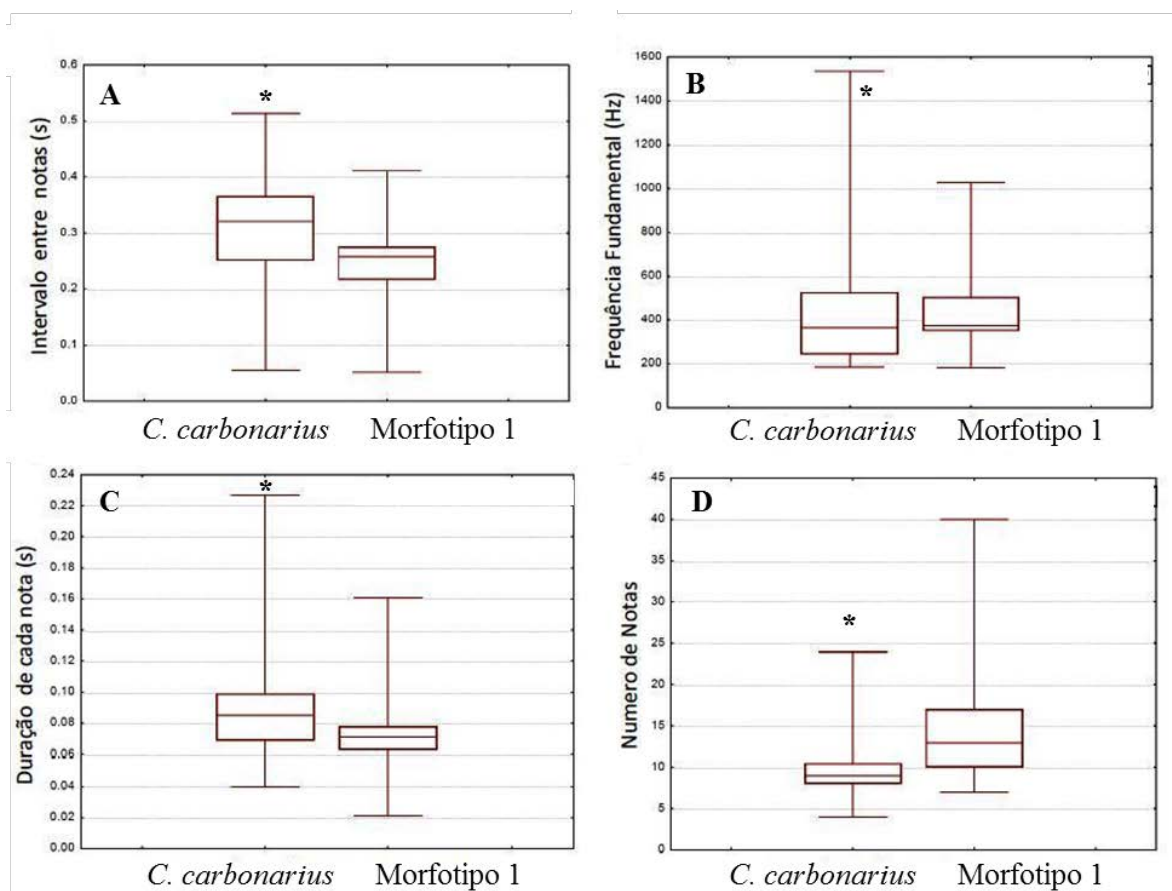


Figura 5 - Teste de *Mann-Whitney* demonstrando diferença estatística em todas as características físicas da vocalização analisadas entre *C. carbonarius* e morfotipo 1. **A)** Intervalo entre as notas, $p = 0,0000$; **B)** Duração de cada nota (s), $p = 0,0009$; **C)** Frequência fundamental, $p = 0,0000$; **D)** Número de notas, $p = 0,00002$). * = Diferença estatisticamente significativa.

As médias das características físicas das vocalizações analisadas para *C. carbonarius* e o morfotipo 1, apresentaram grande variação e diferem das descritas anteriormente em *C. carbonarius* por Galeotti et al. (2005a). Essa diferença pode estar associada à gravação de vocalizações de animais distintos do padrão da espécie, uma vez que este é o primeiro estudo a considerar a existência de uma nova espécie de jabuti. Esses dados sugerem que as características da vocalização variam entre os grupos avaliados, e refletem diferenças nos padrões morfológicos (SILVA, 2011; VINKE et al., 2008).

Sacchi et al. (2003) em estudo com *Testudo marginata* e Galeotti et al. (2005a) com *T. hermanni* encontraram relação entre a frequência fundamental e o tamanho e peso dos

animais. Dessa forma, parte da variação intraespecífica observada, pode estar relacionada a diferença no tamanho e peso dos animais avaliados (Peso: *C. carbonarius*, 2,5-5,5 Kg e morfotipo 1, 7-14,5 Kg; Comprimento Curvilíneo da Carapaça: *C. carbonarius*, 30-42 cm e morfotipo 1, 50-62,5 cm).

As vocalizações analisadas apresentaram estrutura complexa, com presença de harmônicos, o que sugere a presença de uma estrutura anatômica específica associada a produção de sons, e indica que este não é apenas um som produzido pela simples passagem de ar pela laringe (BRADBURY; VEHRENCAMP, 1998), como, por exemplo, os silvos produzidos por *Crotalus adamanteus*, no qual o som é apenas uma consequência de períodos de rápida inalação de ar. Neste caso, o som é simples, e não apresenta harmônicos como observados no presente estudo (KINNEY et al. 1998). Sacchi et al (2004) descreveram em três espécies de jabutis (*T. hermanni*, *T. graeca* e *T. marginata*) a presença de uma estrutura localizada na laringe, com função específica na produção de sons. Devido às evidências de que *C. carbonarius* e o morfotipo 1 apresentam vocalizações com estrutura complexa e da descrição na literatura de estrutura específica para produção de sons em jabutis europeus, sugerimos a presença de estrutura anatômica semelhante em Testudinidae brasileiros, havendo a necessidade de estudos posteriores para confirmar e descrever a presença destas estruturas.

Todas as características físicas, das vocalizações analisadas, mostraram diferenças estatisticamente significantes entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1. *C. carbonarius* apresentou maior frequência fundamental, intervalo entre notas e duração de cada nota e menor número de notas por vocalização. Estes dados são concordantes com os encontrados na literatura, pois jabutis do mesmo gênero, com menor porte, possuem maior frequência e menor número de notas por vocalização (GALEOTTI et al., 2005a; SACCHI et al., 2003). Além disto, os espectrogramas mostraram que *C. carbonarius* apresenta notas com a presença de até seis harmônicos, enquanto que o morfotipo 1 possui no máximo dois. Por fim, a frequência fundamental e a frequência dominante observadas no morfotipo 1, estão localizadas no mesmo harmônico, enquanto que em *C. carbonarius* a frequência que apresenta maior energia (Frequência dominante) é observada sempre no segundo harmônico. Estes dados evidenciam que as vocalizações de *C. carbonarius* e do morfotipo 1 são

diferentes, devendo desta forma, representar um sinal espécie específico que pode ter papel relevante na seleção sexual em Testudinidae.

Preferência por Estímulo Sonoro Específico

Nos experimentos de preferência sexual, apenas as fêmeas de *C. carbonarius* demonstraram preferência pelos estímulos sonoros específicos, apresentando diferenças estatisticamente significantes quando comparado períodos de estímulo sonoro com períodos de silêncio (Teste de *Wilcoxon*, $p=0,03$). Fêmeas do morfotipo 1 não apresentaram diferença estatisticamente significativa para o teste de preferência (Teste de *Wilcoxon*, $p=0,06$).

Para os machos dos dois grupos, não foi observada diferenças estatisticamente significantes (Teste de *Wilcoxon* - *C. carbonarius*, $p=0,074$ e Morfotipo 1, $p=0,60$). Assim como observado em *Testudo hermanni* por Galeotti (2004) os machos das duas espécies estudadas não demonstraram preferência por nenhum dos estímulos sonoros espécie específico, indicando que a emissão de sons tem função direcionada às fêmeas (**Figura 6**).

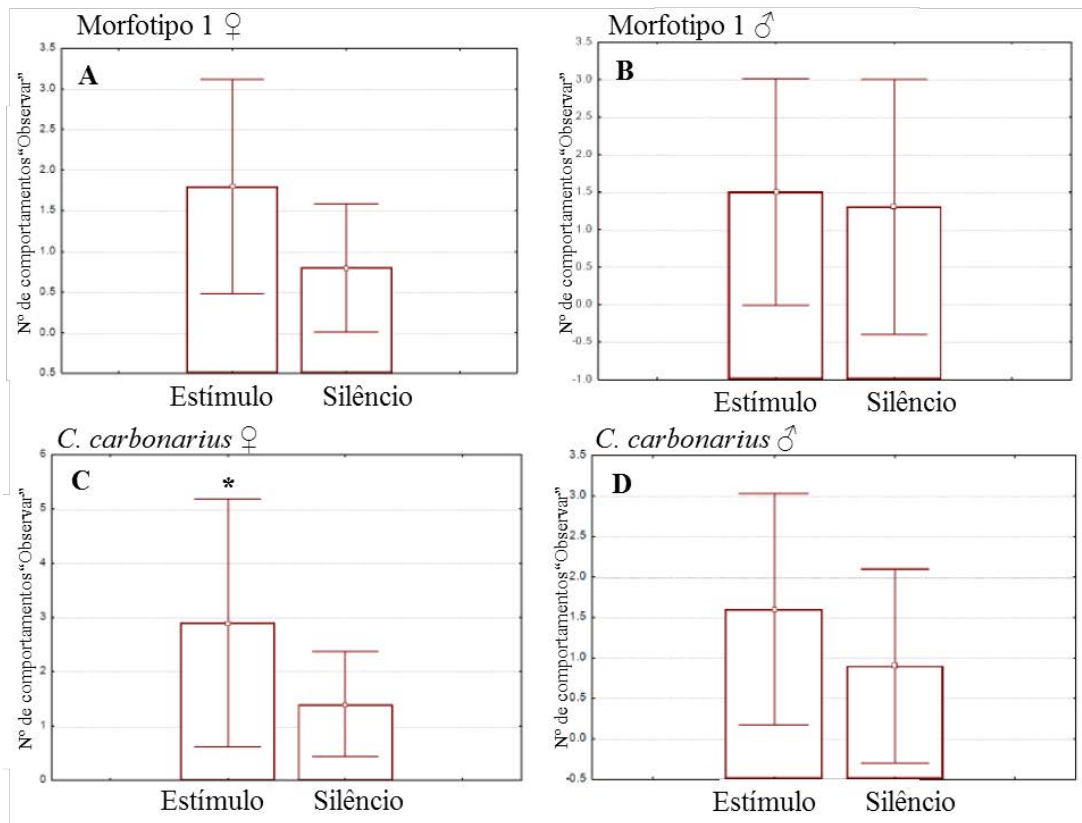


Figura 6 - Teste de *Wilcoxon* demonstrando a comparação entre o número de comportamentos "observar" em períodos de silêncio e estímulo. **A)** Morfotipo 1 (fêmea); **B)** Morfotipo 1 (macho); **C)** *C. carbonarius* (fêmea); **D)** *C. carbonarius* (macho).

Este estudo demonstrou pela primeira vez que fêmeas de *C. carbonarius* podem reconhecer a vocalização emitida pelos machos da mesma espécie, reforçando a hipótese sugerida por Silva (2011), que demonstrou com base em características morfológicas relacionadas a região das placas anais e supra caudais, que as fêmeas demonstram ser as principais responsáveis pelo processo de isolamento reprodutivo de *C. carbonarius* e do morfotipo 1. Por outro lado, fêmeas do morfotipo 1 por vezes percebem as vocalizações, mas não reagem a elas de forma consistente, demonstrando respostas diversas aos *playbacks*, com alguns indivíduos se aproximando e outros se distanciando da vocalização dos machos. Por fim os machos de ambos os grupos estudados não parecem responder aos estímulos sonoros, considerando que durante os experimentos estes ficaram circulando pela arena ou apenas parados no centro da mesma. Desta forma os resultados obtidos, reforçam a hipótese de

Galeotti et al. (2005b) de que a vocalização durante a cópula possui função de comunicação direcionado a fêmea.

A preferência por vocalização interespecífica foi avaliada com o objetivo de determinar a importância deste comportamento na discriminação entre os indivíduos de *C. carbonarius* e do morfotipo 1. O modelo experimental proposto se mostrou eficiente para demonstrar a preferência da fêmea por determinado estímulo sonoro em relação a um estímulo oposto.

Durante o período de observação, foi identificado comportamento de cópula apenas entre indivíduos de um mesmo grupo, e não entre grupos, sugerindo a existência de mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1. As diferenças encontradas nas características das vocalizações e comportamentos reprodutivos reforçam a hipótese de que não se pode considerar o morfotipo 1 como a mesma unidade taxonômica que *C. carbonarius*.

As características físicas da vocalização foram avaliadas com o objetivo de determinar as diferenças entre *C. carbonarius* e o morfotipo estudado. Assim os resultados contribuíram para o conhecimento da biologia dos Testudinidae brasileiros, fornecendo dados para futuros estudos comportamentais e de bioacústica, contribuindo desta forma, com a preservação deste importante grupo de quelônios.

Conclusões

- A caracterização física das vocalizações, é uma metodologia eficiente para a diferenciação de unidades taxonômicas regionais de jabutis brasileiros.
- As fêmeas da espécie *C. carbonarius*, apresentam preferência por estímulo sonoro específico dos machos, demonstrando a função da vocalização, para atrair a atenção de fêmeas durante a cópula.
- A não ocorrência de cópulas entre animais classificados como *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e Morfotipo 1, sugere a existência de mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1.
- Os dados encontrados reforçam a hipótese sugerida por Silva (2011) de que o morfotipo 1 corresponde a uma nova unidade taxonômica.

Capítulo 3

6. Capítulo 3. Caracterização Morfológica e Dimorfismo Sexual em Testudinidae

Resumo

O presente projeto teve por objetivo estabelecer o padrão das características morfológicas e do padrão de dimorfismo efetivos para a diferenciação das espécies *Chelonoidis carbonarius*, *C. denticulatus* e do morfotipo 1. Foram avaliadas 19 características morfológicas, no intuito de caracterizar as diferenças entre as espécies, além de verificar quais foram as sexualmente dimórficas entre os grupos avaliados. Esse estudo é pioneiro por levantar dados morfológicos em jabutis brasileiros, abrangendo ampla extensão territorial, além da possibilidade de referendar a existência de novas espécies. Dados disponíveis na literatura se limitam a avaliar animais de apenas uma região, e não permitem extrapolações de informações sobre a evolução dos Testudinidae no Brasil. Foram realizadas análises, a partir de jabutis depositados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e no Museu Paraense “Emílio Goeldi”. Parques e zoológicos, onde esses animais são abundantes, em sua maioria não possuem registros de origem confiável, uma vez que os animais são provenientes de tráfico ou doação de colecionadores particulares. Para explorar a presença de caracteres morfológicos sexualmente dimórficos e de diferenças morfológicas entre os grupos analisados, os valores encontrados para as medidas registradas foram inicialmente submetidos à análise de estatística descritiva, e a escolha do teste se deu com base na parametria dos dados. Foram então realizadas duas análises: uma para cada grupo, comparando entre os sexos e uma para cada sexo, comparando entre os grupos. Para testar a variação interespecífica de tamanho e forma foi utilizada matriz de correlação para a análise de componentes principais (ACP), seguida de análise multivariada para os dados morfológicos por meio das técnicas de ACP. Após a ACP, realizou-se e análise de fatores, no intuito de elencar as características que possuíam mais de 0,75 de correlação na diferenciação entre os sexos. Os resultados obtidos se apresentaram condizentes com a hipótese de que o morfotipo 1 corresponde a uma nova espécie, pois difere do padrão clássico da espécie em relação a morfologia, dimorfismo sexual e coloração. Dessa forma, inferimos que o morfotipo 1 corresponde a uma nova espécie de jabuti, distinta de *C. carbonarius*. Com base nos dados morfológicos avaliados, sugerimos que o morfotipo 1 corresponda a uma nova espécie de jabuti. Esses resultados contribuem para o conhecimento da biologia dos quelônios, incentivando futuros estudos genéticos e de evolução desses animais e, principalmente, gerando dados que contribuam para a preservação desse importante grupo de répteis.

Palavras Chave: Testudinidae, morfologia, *Chelonoidis*, dimorfismo sexual.

Introdução

A forma, o tamanho, a coloração, o número e a disposição dos escudos que compõem o casco dos jabutis são características importantes para a identificação genérica e específica dos Testudines (MEDEM 1976; MOLINA; ROCHA, 1996; PRITCHARD; TREBBAU, 1984). As espécies *C. carbonarius* e *C. denticulatus* assemelham-se em certos aspectos, tais como: tamanho corporal, forma da carapaça e plastrão, dieta e comportamento. Geralmente podem ser diferenciadas em campo por meio da coloração das patas e pelas características morfológicas descritas na literatura, tais como; tamanho e presença de escudo gular ultrapassando o rebordo da carapaça em *C. denticulatus* (CASTANÕ-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; MOSKOVITS, 1998; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; WILLIAMS, 1960). O padrão dos escudos que compõem o casco dos quelônios de uma mesma espécie é bastante uniforme (PRITCHARD, 1979), mas variações nesse padrão foram descritas e analisadas para um grande número de espécies, incluindo as espécies objeto do presente estudo (PRITCHARD, 1979; SIQUEIRA et al., 2004; ZANGERL; JOHNSON, 1957).

Em 1965, Auffenberg descreveu a espécie *Geochelone hesternae*, uma tartaruga fóssil do Mioceno encontrada na Colômbia, que apresentava características morfológicas intermediárias entre *C. carbonarius* e *C. denticulatus*. Esta espécie é considerada ancestral de *C. carbonarius* e *C. denticulatus*, cuja separação teria ocorrido com o desenvolvimento de cerrados e prados periféricos à bacia Amazônica, no Pleioceno ou Pleistoceno, com as espécies se tornando distintas, por isolamento geográfico, ficando *C. denticulatus* restrita a florestas tropicais e *C. carbonarius* a cerrados e campos abertos.

Poucos marcadores morfológicos, citados na literatura, para a diferenciação das espécies *C. carbonarius* e *C. denticulatus* apresentam eficiência para a distinção dos grupos. Destes, destacam-se aqueles localizados na região cefálica, carapaça, plastrão e coloração. São relatados na literatura padrões morfológicos variados em *C. carbonarius*, sugerindo a presença de exemplares resultantes de interações entre ambas as espécies ou morfotipos de *C. carbonarius*, e que atualmente, são considerados como um único táxon (SIQUEIRA et al., 2004).

A caracterização morfológica das espécies brasileiras do gênero *Chelonoidis* vem sendo questionada desde que Williams (1960) examinou um grande número de espécimes, afirmando que características distintas entre elas deveriam ser revistas, pois nem sempre era possível a correta identificação dos indivíduos encontrados em museus ou na natureza, tendo em vista que alguns espécimes de *C. carbonarius* apresentavam tamanhos e coloração distintos do padrão clássico da espécie (PRITCHARD, 1979).

O dimorfismo sexual está presente em inúmeras espécies e em quase todos os grupos de vertebrados, e diferenças entre os sexos de uma espécie tem, há muito tempo gerado interesse por parte de ecólogos evolucionistas (BUTLER et al., 2000). Uma das formas de dimorfismo sexual é o tamanho, no qual machos e fêmeas não permanecem com o mesmo tamanho, quando adultos. Darwin propôs que a evolução do dimorfismo sexual poderia ser resultado de pressões de seleção sexo-específicas, como por exemplo; disputas por fêmeas, em que machos maiores seriam favorecidos (BERRY; SHINE, 1980; TRIVERS, 1972; WIKELSKI; TRILLMICH, 1997). Por outro lado, em espécies em que as fêmeas escolhem seus parceiros sexuais, o tamanho corpóreo ou outras características selecionadas pelas mesmas seriam favorecidos, e geralmente, nesses casos, o tamanho corpóreo das fêmeas é maior em relação ao dos machos, favorecendo maior prole (BERRY; SHINE, 1980).

Os dois exemplos supra citados, de pressões de seleção sexual, que interferem na relação de tamanho entre os sexos, podem ser exemplificados com espécies de quelônios, terrestres e aquáticas, respectivamente. Espécies de quelônios terrestres, geralmente, possuem machos com maior porte em relação às fêmeas, já espécies aquáticas apresentam padrão inverso (BERRY; SHINE, 1980). Outro tipo de pressão que pode favorecer a evolução do dimorfismo sexual em tamanho nos quelônios seria a dispersão dos machos. Nesse contexto, pressões ambientais que limitem a locomoção das espécies podem levar a maior defesa territorial, favorecendo dessa forma machos maiores (GHISELIN, 1974).

Darwin propôs que a seleção natural levaria à maior dimensão do corpo em fêmeas, pois o tamanho do corpo está positivamente correlacionado à fecundidade, entretanto autores têm sugerido que uma série de fatores ecológicos e comportamentais podem contribuir para o origem e manutenção de dimorfismo sexual, incluindo aquela relacionada à diferença em tamanho entre os sexos (SHINE, 1989; VINCENT; HERREL, 2007). O habitat ocupado pela

espécie pode influenciar diretamente no padrão de dimorfismo em relação ao tamanho, assim como a interação entre predadores e disponibilidade de alimentos, que poderia levar a padrões de dimorfismo distintos do esperado (BUTLER et al., 2000).

O dimorfismo sexual pode ser filogeneticamente conservado, ou ser recém-evoluído em resposta a pressões de seleção ativas (VINCENT; HERREL, 2007). Dessa forma, sua utilização em contextos taxonômicos pode fornecer evidências adicionais em relação a diferenças no tipo de habitat ocupado por quelônios.

Este capítulo teve por objetivo, avaliar estatisticamente, aspectos morfológicos e padrão de dimorfismo sexual das espécies *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e do morfotipo1.

Material e Métodos

Os dados morfológicos foram obtidos a partir de espécimes depositados nos Bosques Municipais de São José do Rio Preto - SP e Aracatuba, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em Manaus - AM e no Museu Paraense “Emílio Goeldi”, Belém - PA.

Os jabutis foram identificados como *C. carbonarius* ou *C. denticulatus*, por meio das características descritas por Williams (1960), Castanõ-Mora e Lugo-Rugeles (1981), Pritchard e Trebbau (1984) e Moskovits, (1998), e os animais que não se enquadravam na classificação das espécies, conforme os parâmetros acima destacados, foram considerados como Morfotipo 1, com base em seu tamanho corpóreo e padrão de escudação dos escudos pré frontais. Os animais foram identificados com base nos números de tombamento utilizados pelos museus, quanto a sua origem geográfica.

Foram avaliados 114 animais, separados em três grupos, sendo estes: *C. carbonarius* (n=30), *C. denticulatus* (n=54) e um grupo composto por animais descritos na literatura como *C. carbonarius*, mas que apresentam características diferenciadas, como tamanho e coloração. Por este motivo, estes animais foram denominados como Morfotipo 1 (n=30).

Análise Morfométrica

Foram realizadas aferições morfológicas, por meio do uso de segmometro e fita métrica, no intuito de avaliar a presença de caracteres morfológicos sexualmente dimórficos, entre os grupos, e entre os sexos de cada grupo. As características avaliadas foram utilizadas para o estabelecimento das diferenças morfológicas entre *C. carbonarius*, Morfotipo 1 e *C. denticulatus*.

Apenas os animais que apresentaram comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) maior ou igual a 25 cm foram utilizados para as análises morfológicas, pois indivíduos que apresentam CCC abaixo de 25 cm não possuem características sexualmente dimórficas evidentes e suas proporções corpóreas diferem das encontradas em animais adultos (JEROZOLIMSKY, 2005).

As medidas lineares e curvilíneas foram realizadas com uma fita métrica acompanhando-se a superfície referente da carapaça ou do plastrão. O uso simultâneo de medidas lineares e curvilíneas permite melhor caracterização da forma do casco, já que carapaças e plastrões com o mesmo comprimento linear podem apresentar formas bem distintas (BONNET et al., 2001).

Para a determinação do comprimento e da largura da carapaça, plastrão e altura do casco, utilizou-se um segmometro. Para a utilização do dispositivo, manuseavam-se as peças, permitindo a movimentação das mesmas, obtendo-se com as hastes, a distância entre os pontos a serem medidos utilizando-se de uma trena, segundo (BRITES, 2002, com modificações).

A nomenclatura das placas ou escudos córneos dos jabutis foi a mesma adotada por Pritchard e Trebbau (1984). Para cada jabuti foram registradas 19 medidas do plastrão e da carapaça. Para garantir a compreensão das medidas registradas, a figura 1 e o Quadro 1 apresentam a descrição detalhada dos parâmetros morfológicos avaliados.

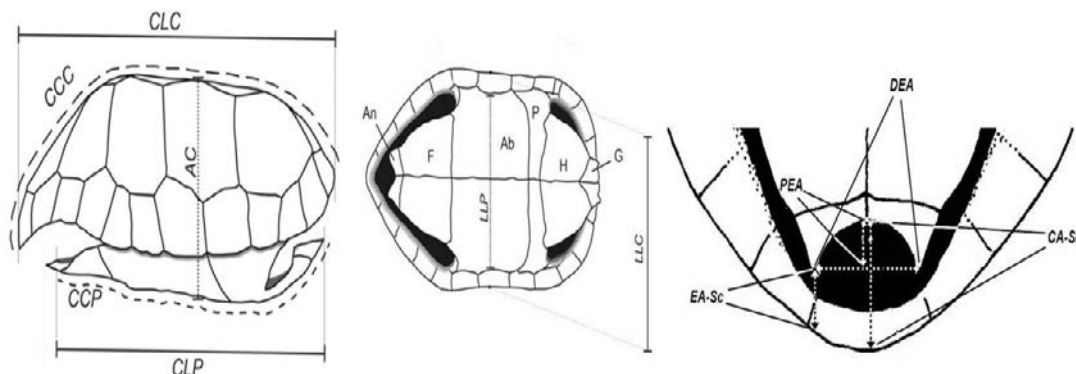


Figura 1. Imagem ilustrativa dos parâmetros morfológicos avaliados. Modificado de Jerozolinski (2005).

Análise Estatística

Para explorar a presença de caracteres morfológicos sexualmente dimórficos e de diferenças morfológicas entre os grupos analisados, os valores encontrados para as medidas registradas foram inicialmente submetidos à análise estatística descritiva. As variáveis foram consideradas paramétricas quando apresentavam normalidade segundo os histogramas do teste de *Shapiro-Wilk* e eram homocedásticas. Foram então realizadas duas análises: uma para cada grupo, comparando os sexos, e uma para cada sexo, comparando os grupos. Utilizou-se o *Test t* para dados paramétricos e *Mann Whitney* para dados não paramétricos (ZAR, 1996).

Para as análises de variância foi utilizado o teste ANOVA *one way*, para dados paramétricos, e o teste *Kruskal Wallis*, para dados não paramétricos. No teste ANOVA *one way*, foi realizado o teste *a posteriori* de *Tukey* para identificar as medidas que, tomadas duas a duas, diferiram estatisticamente entre si, e para o teste *Kruskal Wallis*, utilizou-se o teste *a posteriori* de *Dunn*, para a mesma finalidade. Tais testes *a posteriori* protegem as análises de aumento no nível de significância devido ao grande número de comparações efetuadas (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

Para testar a variação interespecífica de tamanho e forma, foi utilizada a análise de componentes principais (ACP), que utiliza uma matriz de correlação para a análise de componentes principais (ACP) (MORA et al., 2003). Conforme Cadima e Jolliffe (1996), a separação das variações em componentes principais (CP) está relacionada ao tamanho e a forma dos animais, onde o primeiro CP relaciona-se com medidas que refletem tamanho, enquanto que o segundo com a forma dos organismos estudados. Após a ACP, realizou-se e análise de fatores, no intuito de elencar as características que possuíam mais de 0,75 (correlação forte) de correlação na diferenciação entre os sexos. Posteriormente, os valores dos vetores de todos os indivíduos de cada sexo foram utilizados para comparações, por meio do ANOVA *one way*, entre os três grupos avaliados.

Todos os testes estatísticos foram realizados com o programa *Statistica*, versão 8.0 e em todas as análises o nível de significância (p) adotado foi de 5%.

Quadro 1. Descrição dos parâmetros morfológicos avaliados.

Medidas da carapaça
Altura da carapaça (AC): Medida verticalmente, entre a extremidade superior da sutura entre o segundo e o terceiro escudos vertebrais até a extremidade inferior do escudo abdominal. Comprimento curvilíneo da carapaça (CCC): Medida ao longo da região mediana dos escudos vertebrais, partindo da extremidade anterior do primeiro par de escudos marginais até a extremidade posterior do escudo supra caudal. Comprimento linear da carapaça (CLC): Distância entre a extremidade anterior e posterior da carapaça. Largura curvilínea da carapaça (LCC): Medida pela região dorsal, ao longo do eixo que passa pela extremidade posterior do segundo escudo vertebral, entre os pontos de inflexão do sexto par de escudos marginais, onde se curvam na direção do plastrão. Largura linear da carapaça (LLC): Medida da largura da carapaça na altura da região mediana, no sexto par de escudos marginais.
Medidas do Plastrão
Comprimento curvilíneo do plastrão (CCP): Medida ao longo da sutura médio-ventral do plastrão, entre a extremidade anterior dos escudos gulares e a extremidade posterior da sutura entre os escudos anais. Comprimento linear do plastrão (CLP): Medida entre a extremidade anterior dos escudos gulares até a extremidade posterior da sutura entre os escudos anais. Escudos gulares (EG): Primeiro par de escudos do plastrão. Escudos humerais (EH): Segundo par de escudos do plastrão, posterior aos escudos gulares. Escudos peitorais (EP): Terceiro par de escudos do plastrão, posterior aos escudos humerais. Escudos abdominais (EAB): Quarto par de escudos do plastrão, posterior aos escudos humerais. Escudos femorais (EF): Quinto par de escudos do plastrão, posterior aos escudos abdominais. Escudos anais (EAN): Último par de escudos do plastrão. Largura curvilínea do plastrão (LCP): Medida ao longo do escudo abdominal entre as suturas deste escudo com o sexto par de escudos marginais. Largura linear do plastrão (LLP): Medida entre as suturas dos escudos abdominais com o sexto par de escudos marginais.
Medidas da abertura posterior, entre a carapaça e o plastrão
Distância central dos escudos anais ao supra caudal (CA-Sc): Medida da distância entre a extremidade posterior da sutura mediana dos escudos anais e a extremidade inferior do escudo supra caudal, paralela ao eixo ântero-posterior. Distância da extremidade do escudo anal ao supra caudal (EA-Sc): Medida da distância da extremidade posterior do escudo anal direito à extremidade inferior do escudo supra caudal, paralela ao eixo ântero-posterior do jabuti. Distância entre as extremidades dos escudos anais (DEA): Medida da distância linear entre as extremidades posteriores dos escudos anais. Profundidade da abertura dos escudos anais (PEA): Medida da distância entre a extremidade posterior da sutura entre os escudos anais e a linha imaginária que conecta as extremidades destes escudos (linha de medida da DEA).

Resultados e Discussão

Nos espécimes avaliados no Museu Paraense “Emílio Goeldi”, observamos animais que diferiam, tanto para o padrão típico da espécie *C. carbonarius*, quanto para o morfotipo 1, sendo então, considerados a partir de agora, como morfotipo 2. Porém, o baixo número de animais acima de 25 cm de CCC, não possibilitou a realização de análises estatísticas para esse grupo. A maioria dos animais disponíveis no Museu eram juvenis, o que permitiu a avaliação biogeográfica, padrão de escudação das placas cefálicas nasais e prefrontais e coloração amarela da região cefálica e escudos dérmicos dos membros locomotores, diferindo em relação ao padrão da espécie *C. carbonarius* (vermelho) e do morfotipo 1 (laranja) (**Figura 2**).

Segundo comunicação pessoal da Dra. Ana Lúcia da Costa Prudente e de sua equipe (Museu Paraense “Emílio Goeldi”), o morfotipo 2 tem ocorrência também no estado do Maranhão e Piauí. Ao longo dos anos de coletas por toda Amazônia, o grupo de pesquisa nunca encontrou animais como o morfotipo 2 no estado do Amazonas, e nem o morfotipo 1 no estado do Pará. Tais informações sugerem a ocorrência de algum evento de isolamento geográfico durante a separação desses dois grupos, possivelmente relacionado com a formação de refúgios ao longo do Pleistoceno, entretanto, informações que auxiliem referendar essa hipótese são escassas na literatura e demandam um novo estudo em campo.

Houve dificuldades referentes à amostragem nos museus, pois parte dos animais em coleção apresentava-se em estado de conservação que impossibilitava sua utilização para estudos morfológicos, ou eram juvenis, um viés para estudos dessa natureza, uma vez que estes, não possuem as mesmas proporções corpóreas dos adultos, e as características sexuais secundárias não estão evidentes. Uma opção cogitada foi a coleta desses animais em populações naturais, entretanto, a partir do contato com pesquisadores que saem constantemente a campo para coleta de outros grupos taxonômicos, fomos alertados da baixa taxa de captura desses animais, o que inviabilizaria buscas ativas em ambientes naturais.

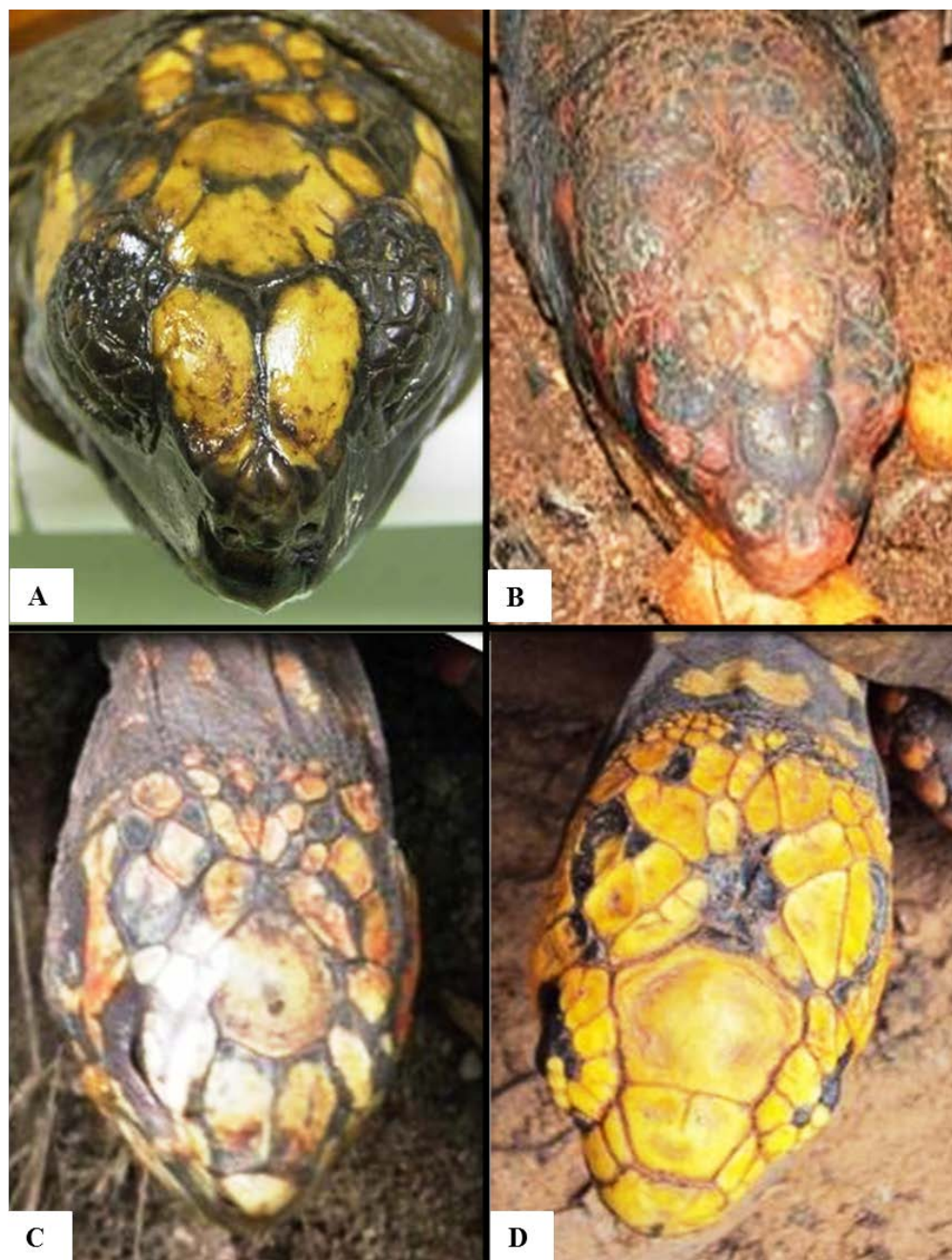


Figura 2. Padrão dos escudos pré-frontais e coloração da região cefálica. A - *C. denticulatus*, B - *C. carbonarius*, C - Morfotipo 1, D - Morfotipo 2. Imagens de arquivos pessoais.

Foi observado o padrão de coloração das escamas dérmicas da região cefálica, dos membros locomotores e dos olhos, sendo característicos de cada grupo avaliado (**Tabela 1; Figura 3**).

Tabela 1. Padrão de coloração da cabeça, escamas das patas e olhos dos animais avaliados.

Espécies	<i>C. carbonarius</i>	<i>C. denticulatus</i>	Morfotipo 1	Morfotipo 2
Região Cefálica	Vermelha	Amarelo	Laranja	Amarelo
Escudos dérmicos	Vermelha	Amarelo	Laranja	Amarelo
Cor dos olhos	Preto	Preto	Amarelo	Amarelo

Morfotipo 1 e 2 - Animais considerados *C. carbonarius*, mas que apresentam características diferenciadas dos padrões de tamanho e coloração para espécie.

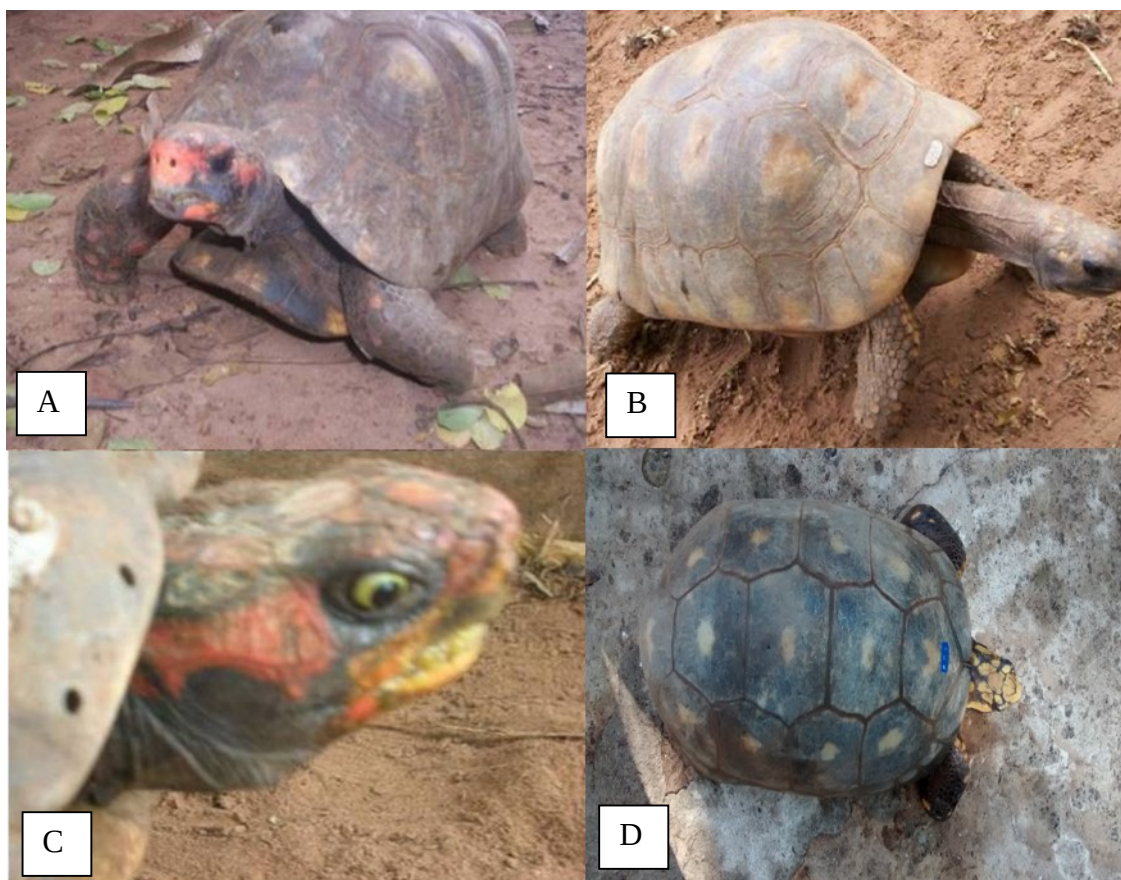


Figura 3. Padrão de coloração dos escudos córneos da região cefálica, escamas das patas e olhos dos animais avaliados. A – *C. carbonarius*, B - *C. denticulatus*, C - Morfotipo 1, D - Morfotipo 2. Imagens de arquivos pessoais.

Porém, o único dado disponível na literatura, citado como característica espécie-específica corresponde à coloração amarela das patas e cabeça de *C. denticulatus*. Para a espécie *C. carbonarius* é citado na literatura a coloração vermelha para a cabeça e patas, característica essa que confere seu nome popular “jabuti-de-patas-vermelhas”, entretanto

observa-se na literatura, descrições de uma gama mais ampla de padrões de coloração, talvez relacionada à presença dos morfotipos (PRITCHARD; TREBBAU, 1984).

Inicialmente todos os dados morfológicos referentes às 19 características avaliadas, foram submetidos à estatística descritiva. Posteriormente, as comparações realizadas entre machos e fêmeas nos três grupos, foram realizadas par a par, de acordo com a parametria dos dados.

Os espécimes de *C. carbonarius* apresentaram os menores valores médios de CLC ($28,20 \pm 2,60$ para machos e $29,55 \pm 2,90$ para fêmeas), quando comparados com os outros dois grupos (morfotipo 1 ($40,46 \pm 4,83$ para machos e $38,16 \pm 4,55$ para fêmeas) e *C. denticulatus* ($47,05 \pm 6,05$ para machos e $41,43 \pm 3,71$ para fêmeas). Em *C. carbonarius*, os maiores animais encontrados para cada sexo, foram um macho de CLC = 35,6 cm, e a maior fêmea com CLC = 35,2 cm. O grupo de Morfotipo 1 apresentou valores médios CLC próximos aos encontrados para *C. denticulatus*, sendo os maiores para cada sexo: um macho de CLC = 48 cm, e uma fêmea de CLC = 50 cm. A espécie *C. denticulatus* apresentou os maiores valores médios de CLC, sendo os maiores espécimes para cada sexo: um macho de CLC = 61 cm, e uma fêmea de CLC = 47 cm (**Tabela 2**).

Tabela 2- Medidas dos espécimes de *C. carbonarius* (n=30), morfotipo 1 (n= 30) e *C. denticulatus* (n= 54). Para machos e fêmeas, representadas por médias, desvio padrão e valor de p.

CM	<i>C. carbonarius</i>			Morfotipo 1			<i>C. denticulatus</i>		
	Machos	Fêmeas	p*	Machos	Fêmeas	p*	Machos	Fêmeas	p*
	Média ± DP			Média ± DP			Média ± DP		
CLC	28,20 ± 2,60	29,55 ± 2,90	NS	40,46 ± 4,83	38,16 ± 4,55	NS	47,05 ± 6,05	41,43 ± 3,71	0,002
CCC	39,92 ± 3,79	39,72 ± 4,46	NS	55,97 ± 8,43	51,26 ± 7,34	0,005	40,08 ± 0,13	30,94 ± 0,08	0,001
LLC	17,02 ± 1,75	19,18 ± 1,89	0,003	23,89 ± 3,03	23,98 ± 1,96	NS	32,06 ± 0,15	33,04 ± 0,07	0,045
LCC	34,16 ± 4,03	37,24 ± 6,63	0,002	47,90 ± 5,97	48,44 ± 5,39	NS	51,05 ± 7,14	18,92 ± 4,35	NS
CLP	23,02 ± 2,19	23,12 ± 2,68	NS	31,92 ± 3,59	30,41 ± 3,38	0,025	40,83 ± 5,32	35,69 ± 3,28	0,001
CCP	25,19 ± 2,69	23,70 ± 3,52	NS	35,86 ± 4,36	31,93 ± 3,89	0,007	42,95 ± 5,46	38,70 ± 5,99	0,004
LLP	16,18 ± 1,63	17,96 ± 2,21	0,011	22,26 ± 3,49	21,37 ± 2,00	NS	24,80 ± 3,23	25,20 ± 2,16	NS
LCP	18,42 ± 1,68	19,00 ± 2,34	NS	26,58 ± 4,24	23,12 ± 2,28	0,005	28,96 ± 4,06	27,56 ± 2,55	NS
AC	13,28 ± 1,32	15,00 ± 1,92	0,003	18,12 ± 2,32	18,70 ± 2,64	NS	21,28 ± 2,46	19,99 ± 1,66	NS
EG	3,87 ± 0,54	3,72 ± 0,48	NS	5,32 ± 0,75	4,74 ± 1,03	0,013	5,88 ± 1,09	4,32 ± 0,78	0,001
EH	4,26 ± 0,60	4,18 ± 0,59	NS	5,62 ± 1,13	5,49 ± 0,52	NS	10,54 ± 1,22	8,98 ± 1,08	0,001
EP	1,33 ± 0,31	1,74 ± 0,26	0,001	1,76 ± 0,43	1,83 ± 0,60	NS	2,21 ± 0,55	2,60 ± 0,46	0,022
EAB	8,27 ± 0,96	8,58 ± 0,75	NS	11,10 ± 2,48	11,10 ± 1,15	NS	13,16 ± 1,94	11,96 ± 1,05	0,033
EF	5,25 ± 1,08	5,21 ± 0,85	NS	7,60 ± 0,98	6,54 ± 0,89	0,002	7,21 ± 1,60	5,99 ± 1,82	NS
EAN	1,44 ± 0,55	1,00 ± 0,28	0,001	2,47 ± 0,92	1,22 ± 0,31	0,001	3,60 ± 0,98	2,69 ± 1,59	0,001
CA-SC	3,70 ± 0,88	6,06 ± 0,98	0,001	1,61 ± 0,314	1,85 ± 0,16	0,001	7,42 ± 1,34	7,42 ± 1,04	NS
EA-SC	1,54 ± 0,73	3,05 ± 1,05	0,001	1,48 ± 1,05	2,55 ± 1,00	0,001	2,86 ± 1,22	4,73 ± 1,41	0,001
DEA	7,46 ± 1,01	5,60 ± 0,86	0,001	9,58 ± 1,67	6,66 ± 1,84	0,001	8,23 ± 2,16	5,70 ± 1,94	0,001
PEA	1,67 ± 0,39	2,18 ± 0,58	0,004	1,98 ± 0,74	2,93 ± 0,61	0,001	3,04 ± 1,22	2,15 ± 0,88	0,046

p- Valor de significância; *Utilizou-se o *Test t* para dados paramétricos e *Mann Whitney* para dados não paramétricos; NS- Não significante; DP- Desvio padrão; CM- Características morfológicas; Comprimento linear da carapaça (CLC); Comprimento curvilíneo da carapaça (CCC); Largura linear da carapaça (LLC); Largura curvilínea da carapaça (LCC); Comprimento linear do plastrão (CLP); Comprimento curvilíneo do plastrão (CCP); Largura linear do plastrão (LLP); Largura curvilínea do plastrão (LCP); Altura da carapaça (AC); Escudos gulares (EG); Escudos humerais (EH); Escudos peitorais (EP); Escudos abdominais (EAB); Escudos femorais (EF); Escudos anais (EAN); Distância central dos escudos anais ao supra caudal (CA-Sc); Distância da extremidade do escudo anal ao supra caudal (EA-Sc); Distância entre as extremidades dos escudos anais (DEA); Profundidade da abertura dos escudos anais (PEA).

Os dados referentes às médias de CLC encontradas no presente estudo diferem dos apresentados na literatura (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; FRETEY, 1977; JEROZOLIMSKI, 2005; MOSKOVITS, 1988; PRITCHARD; TREBBAU, 1984), nos quais os maiores valores encontrados para *C. carbonarius* e *C. denticulatus* foram 23,2 cm e 37,8 cm respectivamente. Tais resultados apontam o morfotipo 1 como mais próximo ao tamanho de *C. denticulatus* do que de *C. carbonarius* (**Tabela 3**). Vale ressaltar que este é o primeiro estudo a considerar o morfotipo 1 como uma possível morfoespécie de *C. carbonarius*, avaliando-os separadamente e comparativamente com *C. carbonarius* e *C. denticulatus*.

Os resultados para medidas de carapaça e plastrão (**Tabela 3**), apontam *C. denticulatus* como a maior espécie, seguida de Morfotipo 1 e *C. carbonarius*. Estes achados são concordantes com a literatura para o gênero; porém, diferem do proposto por Jerolimski (2005), que encontrou indivíduos adultos de *C. denticulatus* com média corporal e carapaças menores que de *C. carbonarius*. Uma possível explicação reside na área de estudo deste autor, que corresponde ao território da aldeia A'Ukre - PA, onde as populações indígenas têm, culturalmente, o hábito de se alimentar de ambas espécies, o que pode ter influenciado na estrutura etária e no tamanho médio dos espécimes avaliados. Além disso, a população avaliada de *C. carbonarius*, pode corresponder à populações do morfotipo 2, o que explicaria as médias próximas entre os grupos avaliados por esse autor e o presente estudo.

Em populações de *Chrysemys scripta* e de *Testudo hermanni*, há relatos de variações no comprimento da carapaça e na massa corporal de até três vezes, em função de características relacionadas ao ambiente, tais como temperatura, disponibilidade de alimento e taxas de mortalidade. Entretanto, é difícil avaliar a influência desses eventos na estrutura etária de populações adultas de *C. carbonarius* e *C. denticulatus*, tendo em vista a forte influência antropogênica, por meio da predação para consumo, principalmente por populações indígenas (GIBBONS et al., 1979; WILLEMSSEN; HAILEY, 2001; JEROZOLIMSKI, 2005).

A média do CLC encontrada para os indivíduos adultos de *C. carbonarius* do presente estudo, foi de 28,8 cm, sendo a maior média encontrada, 35,6 cm, média essa menor que as relatadas na literatura para a espécie. Esses dados indicam que os animais amostrados, e considerados na literatura como *C. carbonarius*, correspondem na maioria das vezes, a

morfotipos (**Tabela 3**). Estes valores estão abaixo daqueles encontrados por Jerozolinski (2005), tanto para a média do CLC (32,2 cm), quanto para o maior registro (40,8 cm). Destaca-se aqui o fato de que os dados encontrados por Jerozolinski (2005) correspondem a maior média de CLC descrita na literatura para a espécie.

Estudos semelhantes foram realizados em outras localidades no Brasil, como no estado de Roraima (MOSKOVITS, 1988) e Tocantins (CLEMENTE-CARVALHO, comunicação pessoal, *apud*, JEROZOLIMSKI, 2005). Há também dados provenientes da Colômbia (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981), Guiana Francesa (FRETEY, 1977) e Venezuela (PRITCHARD; TREBBAU, 1984), referendando a média do comprimento linear da carapaça de indivíduos adultos de *C. carbonarius* variando de 25,2 a 32,2 cm, e os maiores registros obtidos por esses autores variaram entre 35,0 a 40,6 cm (**Tabela 3**).

Tabela 3. Dados referentes ao comprimento linear da carapaça (CLC) de indivíduos adultos de *C. carbonarius* em diferentes localidades. Comparação com a literatura.

País / Localidade	<i>C. carbonarius</i>	CLC		
	Fonte	n	médio	máximo
Brasil	Presente estudo	30	28,8	35,6
Brasil / Aldeia A'Ukre (PA)	Jerozolinski (2005)	130	32,2	40,8
Brasil / Ilha de Maracá (RR)	Moskovits (1988)	138	31,9	40,6
Brasil / Luis Eduardo Magalhães (TO)	Clemente-Carvalho (com. pessoal)	42	27,0	36,6
Brasil / Pantanal de Poconé (MT)	Boulhosa (com. pessoal)	48	30,6	40,1
Colômbia	Castañó-Mora; Lugo-Rugeles (1981)	30	29,7	36,6
Guiana Francesa	Fretey (1977)	10	26,6	35,0
Venezuela	Pritchard e Trebbau (1984)	51	29,5	39,6

Adaptado de Jerozolinski (2005).

Existem relatos na literatura de populações de *C. carbonarius* com médias de CLC muito próximas de *C. denticulatus* (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; FRETEY, 1977; JEROZOLIMSKI, 2005; MOSKOVITS, 1988; PRITCHARD; TREBBAU, 1984), diferindo dos dados encontrados no presente estudo, em que essa diferença foi acentuada. Tais dados sugerem que algumas das populações de *C. carbonarius*, citadas na literatura, como próximas a *C. denticulatus* em relação ao tamanho, correspondam na realidade populações do morfotipo 1 ou 2, e que diversos autores têm citado erroneamente o morfotipo 1 e 2 como *C. carbonarius*, ou simplesmente considerando-as como uma única

unidade taxonômica. Há relatos na literatura de indivíduos de *C. carbonarius*, excepcionalmente grandes, chamados pela tribo Kayapó como *kapran-ti*, o que significa literalmente “jabuti-grande” (JEROZOLIMSKI, 2005; WILLEMSSEN; HAILEY, 1999).

A tabela 4 apresenta a compilação dos dados referentes a CLC de *C. denticulatus*, disponíveis na literatura, com os dados obtidos no presente trabalho.

Tabela 4. Dados referentes ao comprimento linear da carapaça (CLC) de indivíduos adultos de *C. denticulatus* em diferentes localidades. Comparação com a literatura

País/localidade	Fonte	N	CLC médio	CLC máximo
Brasil	Presente estudo	54	44,2	61,0
Brasil / Aldeia A'Ukre (PA)	Jerozolinski (2005)	213	30,4	39,0
Brasil / Ilha de Maracá (RR)	Moskovits (1988)	27	34,5	40,6
Colômbia	Castañó-Mora; Lugo-Rugeles (1981)	30	37,8	44,2
Guiana Francesa	Fretey (1977)	11	31,6	34,3
Venezuela	Pritchard e Trebbau (1984)	26	31,6	39,4

Adaptado de Jerozolinski (2005).

As médias registradas para CLC de indivíduos adultos de *C. denticulatus* foram de 47,05 cm para os machos e 41,43 cm para as fêmeas. Esses dados são maiores que os descritos na literatura para a espécie, para ambos os sexos, no Brasil por Moskovits (1988) e Jerozolinski (2005); na Colômbia (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981), Guiana Francesa (FRETEY, 1977) e Venezuela (PRITCHARD; TREBBAU, 1984), e que variaram de 31,6 a 39,4 cm para machos e de 29,7 a 36,1 cm para fêmeas.

Embora tenha ocorrido a escolha por indivíduos maiores que 25 cm de CLC para o presente estudo, devido a poucos espécimes apresentavam medidas abaixo desta. Stickel (1950) encontrou dados semelhantes em populações naturais de *Terrapene c. carolina* em uma região de florestas no Vale do Rio Patuxent (Maryland, EUA), onde indivíduos jovens representavam menos de 10% dos indivíduos amostrados, proporção semelhante à registrada por Jerozolinski (2005), para *C. carbonarius* e *C. denticulatus* no território da aldeia A'Ukre. Tendo em vista que os animais utilizados no presente estudo são provenientes de populações naturais da região Norte do Brasil, os resultados encontrados refletem os sugeridos na literatura. Estes dados se devem, provavelmente, ao fato de que animais de tamanho reduzido se abrigam sob a serapilheira e emaranhados de cipós com mais facilidade que os indivíduos

adultos, levando a uma amostragem tendenciosa. A maioria dos animais averiguados no Museu Paraense “Emílio Goeldi” apresentavam CLC abaixo de 25 cm, tal fato reflete as condições nas quais os animais foram coletados. Como o objetivo principal das expedições era a coleta de serpentes, lagartos ou anfíbios, a busca dos mesmos em áreas mais fechadas, como a serapilheira, por exemplo, era mais comum, propiciando o encontro de indivíduos mais jovens. Esse fato reforça a hipótese de preferência de habitat para indivíduos jovens descrita por Stikel (1950).

Outros fatores que podem atuar nesse padrão são a baixa taxa de natalidade e/ou elevada mortalidade, principalmente em áreas onde ocorre consumo de carne desses animais (JEROZOLIMSKI, 2005). O impacto da caça influencia diretamente na redução do tamanho corpóreo médio de populações que apresentam alta longevidade, fato esse associado à maior remoção de indivíduos adultos na população (HART, 2000; LAMBERT, 1984; LUISELLI, 2003). Nascimento (1997) registrou para a comunidade da aldeia *A'Ukre*, que o tamanho dos jabutis em regiões próximas à área indígena foi significativamente menor (média de 2,8 kg) do que os capturados em áreas distantes (média de 5,0 kg), sugerindo a influência direta da caça no tamanho corpóreo de populações desses animais.

Compilados na tabela 5, encontram-se dados referentes à análise de variância comparando cada sexo entre os três grupos avaliados. Para a análise de variância, foram encontrados dados com diferença estatisticamente significativa para a maioria dos caracteres. Destaca-se aqui o grande número de características morfológicas que apresentam diferenças entre os grupos avaliados, o que referenda a hipótese de que a espécie *C. carbonarius* e o morfotipo 1 não correspondem a mesma unidade taxonômica.

Tabela 5. Análise de variância entre todas as características morfológicas mensuradas nos três grupos. *C. carbonarius* (n=30), Morfotipo 1 (n=30), *C. denticulatus* (n=54).

CM	C/C* ♂	C/D ♂	D/C* ♂	p Teste	C/C* ♀	C/D ♀	D/C* ♀	P* Teste
CLC	0.002	0.000	0.090	0.000	0.000	0.000	0.057	0.000
CCC	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
LLC	0.000	0.000	0.457	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCC	0.000	0.000	0.872	0.000	0.000	0.000	0.539	0.000
CLP	0.005	0.000	0.019	0.000	0.001	0.000	0.048	0.000
CCP	0.004	0.000	0.041	0.000	0.001	0.000	0.058	0.000
LLP	0.002	0.000	0.254	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCP	0.000	0.000	0.588	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AC	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.228	0.000
EG	0.001	0.000	0.862	0.000	0.003	0.077	0.950	0.003
EH	0.065	0.000	0.001	0.000	0.012	0.000	0.004	0.000
EP	0.037	0.000	0.212	0.008	1.000	0.000	0.001	0.000
EAB	0.008	0.000	0.145	0.000	0.000	0.000	0.480	0.000
EF	0.000	0.001	1.000	0.000	0.004	0.018	1.000	0.002
EAN	0.014	0.000	0.037	0.000	0.512	0.000	0.000	0.000
CA-SC	0.037	0.000	0.010	0.000	0.559	0.002	0.003	0.002
EA-SC	1.000	0.007	0.004	0.001	1.000	0.003	0.000	0.000
DEA	0.000	0.129	0.149	0.000	0.135	0.239	1.000	0.088
PEA	0.519	0.000	0.012	0.000	0.016	0.990	0.011	0.005

C - *C. carbonarius*; D - *C. denticulatus*; C* - Morfotipo 1 (animais considerados *Chelonoidis carbonarius*, mas que apresentam características diferenciadas dos padrões típicos da espécie, como tamanho e coloração); p Teste - Valor de significância obtido pelo teste, o restante dos valores referem-se ao teste *pos hoc* de Tukey ou Dunn; p* - Utilizou-se ANOVA *one way* para dados paramétricos e *Kruskal Wallis* para dados não paramétricos; Os valores comparados entre os sexos por grupo correspondem às análises estatísticas *Post-hoc* de Tukey para dados paramétricos e Dunn para dados não paramétricos. Valores em negrito – sem diferença estatisticamente significativa; CM - Características morfológicas; Comprimento linear da carapaça (CLC); Comprimento curvilíneo da carapaça (CCC); Largura linear da carapaça (LLC); Largura curvilínea da carapaça (LCC); Comprimento linear do plastrão (CLP); Comprimento curvilíneo do plastrão (CCP); Largura linear do plastrão (LLP); Largura curvilínea do plastrão (LCP); Altura da carapaça (AC); Escudos gulares (EG); Escudos humerais (EH); Escudos peitorais (EP); Escudos abdominais (EAB); Escudos femorais (EF); Escudos anais (EAN); Distância central dos escudos anais ao supra caudal (CA-Sc); Distância da extremidade do escudo anal ao supra caudal (EA-Sc); Distância entre as extremidades dos escudos anais (DEA); Profundidade da abertura dos escudos anais (PEA).

A análise de variância referente às 19 características morfológicas avaliadas, entre os grupos, evidenciou as diferenças morfológicas entre os mesmos, deixando clara a separação entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1. As maiores diferenças se deram entre as espécies *C. carbonarius* e *C. denticulatus*, diferindo da literatura, que aponta as espécies como tendo médias de tamanho corpóreo próximos entre si (JEROZOLIMSKI, 2005). O maior número de diferença, não significativa, se observou entre o Morfotipo 1 e a espécie *C. denticulatus*, indicando que estas são morfologicamente próximas em relação ao tamanho.

Destacam-se aqui as diferenças encontradas no padrão de dimorfismo entre os grupos, onde a espécie *C. carbonarius* apresentou 11 características sexualmente dimórficas, e as fêmeas alcançaram tamanho corpóreo maior que os machos. O Morfotipo 1 apresentou 11 características sexualmente dimórficas, porém, neste grupo os machos apresentaram maior tamanho corporal. A espécie *C. denticulatus* apresentou 13 características sexualmente dimórficas, e os machos mostraram-se maiores que as fêmeas em relação ao tamanho corporal. Esses resultados, obtidos para *C. denticulatus*, concordam com os registros de outras localidades para populações silvestres (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; MOSKOVITS, 1988; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; RODRIGUEZ-BAYONA; RYLANDER, 1984). O maior tamanho corpóreo alcançado pelos machos pode ser resultado da ação de outros agentes seletivos, que não apenas o combate na disputa por fêmeas (NIBLICK et al., 1994), o ambiente na qual as espécies se desenvolveram têm influência direta nesse aspecto, uma vez que animais que habitam áreas mais densas, têm seu valor adaptativo favorecido com o maior porte dos machos, pois defendem mais ativamente os recursos locais. Já para animais de áreas abertas, a maior capacidade de locomoção pode conferir aos machos maior valor adaptativo, uma vez que aumentam sua capacidade dispersiva para busca de alimentos e fêmeas.

Os dados encontrados para *C. carbonarius* não apontam diferenças significantes em relação ao CLC entre machos e fêmeas. Estes dados discordam dos apresentados na literatura, que indicam machos adultos com tamanhos superiores ao das fêmeas (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; LEGLER, 1963; MOSKOVITS, 1988; PRITCHARD; TREBBAU 1984). Os dados encontrados para Morfotipo 1 não mostraram diferença significativa entre machos e fêmeas para CLC, porém não há dados na literatura sobre este grupo.

A espécie *C. denticulatus* apresentou maior PEA em machos; no entanto, em *C. carbonarius* e Morfotipo 1 as fêmeas apresentaram os maiores valores. Na literatura é sugerido maior valor de PEA nos machos do gênero *Chelonoidis*, porém; no presente estudo, isso não foi confirmado para *C. carbonarius* e Morfotipo 1 (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; JEROZOLIMSKI, 2005; PRITCHARD; TREBBAU, 1984).

Diferenças entre os sexos, relacionadas ao formato e ao tamanho da abertura entre os escudos anais e supra caudal, já foram sugeridas para ambas as espécies (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; LEGLER, 1963; MOSKOVITS, 1985), entretanto, apenas Jerozolinski (2005) havia quantificado e comparado estatisticamente parâmetros relacionados a essas diferenças em *C. carbonarius* e *C. denticulatus*. Os maiores valores de CA-Sc nas fêmeas em relação aos machos, sugerido na literatura para *C. denticulatus* (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; JEROZOLIMSKI, 2005; MOSKOVITS, 1985) não foram encontrados neste estudo. Os dados encontrados para esta mesma característica em *C. carbonarius* concordam com os dados disponíveis na literatura (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; JEROZOLIMSKI, 2005; LEGLER, 1963; MOSKOVITS, 1985), indicando maiores valores de CA-Sc nas fêmeas. Em todos os grupos avaliados, as fêmeas apresentaram valores maiores que os machos para EA-Sc, e todos os machos apresentaram maior DEA, concordando com a literatura (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; JEROZOLIMSKI, 2005; MOSKOVITS, 1988; PRITCHARD; TREBBAU, 1984).

Apenas as fêmeas de *C. carbonarius* apresentaram diferença significativa quanto à AC em relação aos machos, o que pode estar relacionado à capacidade reprodutiva, já que carapaças mais altas teriam um maior volume interno para o armazenamento de ovos. Esta relação foi sugerida também para as três espécies Europeias de jabutis do gênero *Testudo* (WILLEMSSEN; HAILEY, 2003). A espécie *C. denticulatus* e o grupo Morfotipo 1, não apresentaram maior AC nas fêmeas, talvez devido ao fato de alcançarem maior tamanho, o que reduziria, em parte, a necessidade de uma carapaça mais alta em função da reprodução.

Os valores referentes à DEA foram significativamente maiores em machos para os três grupos analisados, indicando relação com as diferenças no tamanho da cauda, entre os sexos, pois jabutis machos apresentam cauda mais longa do que as fêmeas (CASTAÑO-

MORA; LUGO-RUGELES, 1981; ERNST; BARBOUR, 1989; PRITCHARD; TREBBAU, 1984), e necessitam de maior espaço lateral entre os escudos anais, para moverem a cauda quando procuram pela cloaca da fêmea durante a cópula. Esses movimentos são possíveis graças ao espaço entre as extremidades posteriores dos escudos anais. Willemssen e Hailey (2003) encontraram padrões semelhantes, em que machos apresentaram valores de DEA maiores do que os das fêmeas para quatro espécies de jabutis do gênero *Testudo* (*T. horsfieldii*, *T. graeca*, *T. marginata* e *T. hermanni*).

As fêmeas dos três grupos avaliados apresentaram maiores EA-SC e CA-SC em relação aos machos, com diferença estatisticamente significantes. Tal característica em fêmeas pode ser resultante da atuação de pressões seletivas agindo em direções opostas: por um lado, predadores de jabutis podem ter exercido pressão de seleção no sentido de limitar o tamanho máximo desta abertura, garantindo, assim, proteção à região caudal; já o formato e o tamanho mínimo desta abertura devem ter sido influenciados por funções reprodutivas (PRITCHARD; TREBBAU, 1984).

Além das diferenças intraespecíficas citadas anteriormente, foram detectadas diferenças, para cada um dos sexos, entre as espécies, relacionadas principalmente ao formato e tamanho da abertura entre os escudos anais e supra caudal. Machos de cada uma das espécies parecem apresentar estratégias evolutivas diferentes que garantem o sucesso da cópula, permitindo a movimentação da cauda e o depósito de esperma na cloaca das fêmeas (JEROZOLIMSKI, 2005). Em machos de *C. denticulatus*, a movimentação da cauda seria predominantemente lateral, já que o espaço entre a extremidade posterior da sutura mediana dos escudos anais e o escudo supra caudal é menor que o espaço entre as extremidades posteriores dos escudos anais, diferindo de *C. carbonarius*. Essas diferenças podem estar relacionadas ao comportamento de cópula das duas espécies. Castaño-Mora e Lugo-Rugeles (1981) descreveram que, durante a cópula, machos de *C. denticulatus* ficam em posição mais vertical do que machos de *C. carbonarius*; deste modo, a cauda de machos de *C. denticulatus* provavelmente ficaria mais próxima da região cloacal da fêmea. O fato de que machos de *C. carbonarius* apresentam a cauda proporcionalmente mais longa do que machos de *C. denticulatus* pode estar também relacionado a esta diferença (BELL, 1825; CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981).

A análise dos componentes principais (ACP) realizada com as 19 características supra citadas, e com todos os espécimes avaliados (114), de ambos os sexos, permitiu a separação dos mesmos em função dos componentes principais (CP) 1 e 2, indicando a existência de características sexualmente dimórficas (**Figura 4**). Nota-se na figura que houve separação entre os sexos, e, para as análises posteriores, comparamos as espécies sexo a sexo.

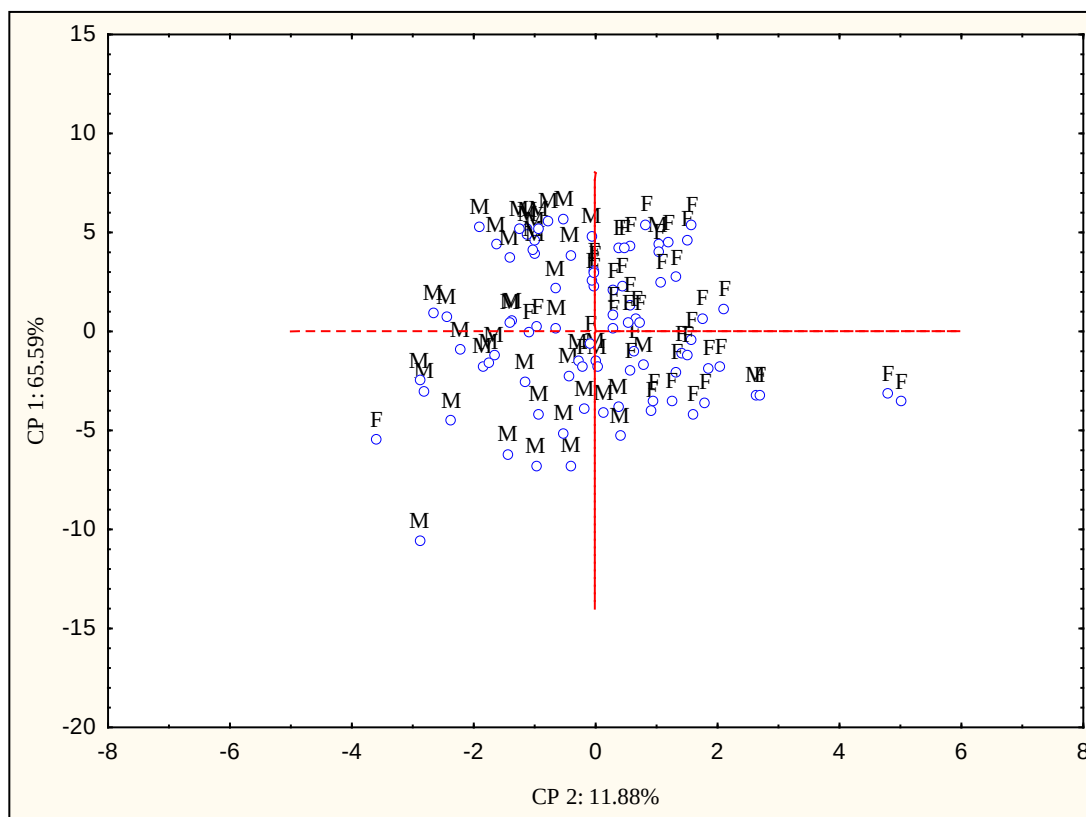


Figura 4. Análise dos componentes principais de todos os espécimes avaliados (114). *C. carbonaria*, Morfotipo 1 e *C. denticulata*, M- Machos, F- Fêmeas, CP- Componente principal.

As características que compuseram os CP1 referiam-se ao tamanho e a massa, já o CP2 foi composto por características relacionadas à forma. Tal padrão na distribuição das características que compõem os CP1 e 2, encontrado no presente estudo, concorda com o sugerido por Cadima e Jolliffe (1996). Esses dados indicam que as principais diferenças entre os grupos se devem ao tamanho (65,59%), seguido por diferenças relacionadas à forma (11,88%). Vale ressaltar que as características referentes ao CP2, estão relacionadas a aspectos reprodutivos, o que em parte, explica a baixa variação em relação às características

do CP1, pois características relacionadas com a reprodução tendem a ser mais conservadas entre grupos evolutivamente próximos.

O CP1, da análise realizada com todos os indivíduos, sem separação por sexo, foi composto por características relacionadas ao tamanho e massa, explicando 65,59% do dimorfismo sexual observado, indicando que as características relacionadas ao tamanho como CLC, LLC e altura, por exemplo, correspondem às principais diferenças entre machos e fêmeas nos três grupos. CP2 foi responsável por 11,88% do dimorfismo observado, sendo composto por características relacionadas à forma, principalmente das regiões entre as placas anais e supra caudais, associadas a aspectos reprodutivos.

Posteriormente foi realizada a ACP de machos e fêmeas separadamente, grupo a grupo, no intuito de verificar diferenças morfológicas entre os grupos. A ACP dos machos dos três grupos revelou a presença de dois CP, e estes explicaram 82,11% da variância encontrada nos três grupos, separando-os em função do CP1 e CP2 (**Figura 5**).

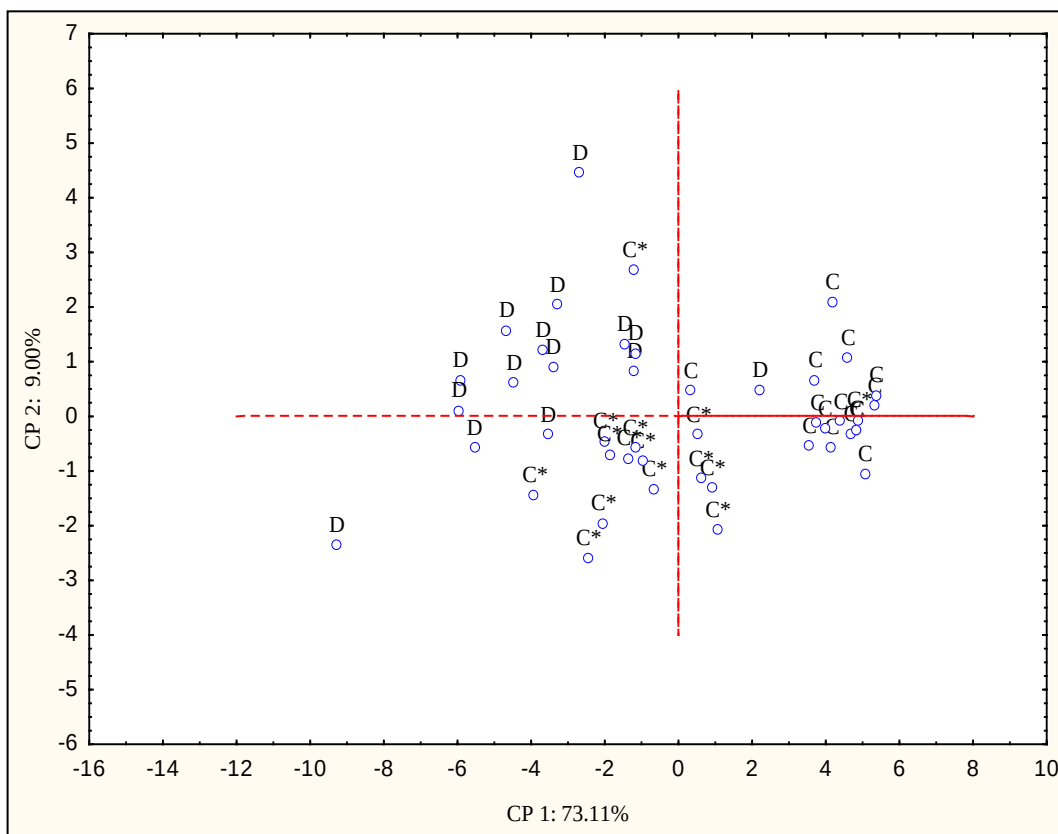


Figura 5. Análise dos componentes principais de todos os machos avaliados (n= 61). C- *C. carbonaria* (n= 15), C*- Morfotipo 1 (n= 15), D- *C. denticulata* (31 indivíduos/grupo), CP- Componente principal.

O CP1 explicou 73,11% da variância encontrada e foi composto pelas variáveis CLC, CCC, LLC, LCC, CLP, CCP, LLP, LCP, AC, EG, EH, EP, EAB, EF, EAN, CA-Sc, e PEA (Quadro 1). Já o CP2 foi responsável por 9% da variância encontrada entre os grupos, sendo composto pelas variáveis EA-Sc e DEA.

A ACP referente a todos os machos avaliados, revelou diferenças significantes entre os três grupos em função dos CP1 e 2. O Morfotipo 1, apesar de ser considerado *C. carbonarius* na literatura, apresentou-se mais próximo morfologicamente de *C. denticulatus*, em relação a essa característica. O mesmo pôde ser observado na ACP das fêmeas (**Figura 7**), embasando a hipótese de que Morfotipo 1, corresponde a uma espécie distinta de *C. carbonarius*.

Foi realizado o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do método *a posteriori* de *Tukey* para os CP1 ($F= 54,0691$; $p= 0,000$) e CP 2 ($F= 7,5469$; $p= 0,001$) dos machos, havendo diferença significativa para CP1 entre os três grupos avaliados. Quando analisado o CP2, apenas o Morfotipo 1 e *C. denticulatus* apresentaram diferenças estatisticamente significantes; porém, *C. carbonarius* apresentou médias próximas as do Morfotipo 1. As comparações estão ilustradas nas Figura 6 (A e B) e na Tabela 7.

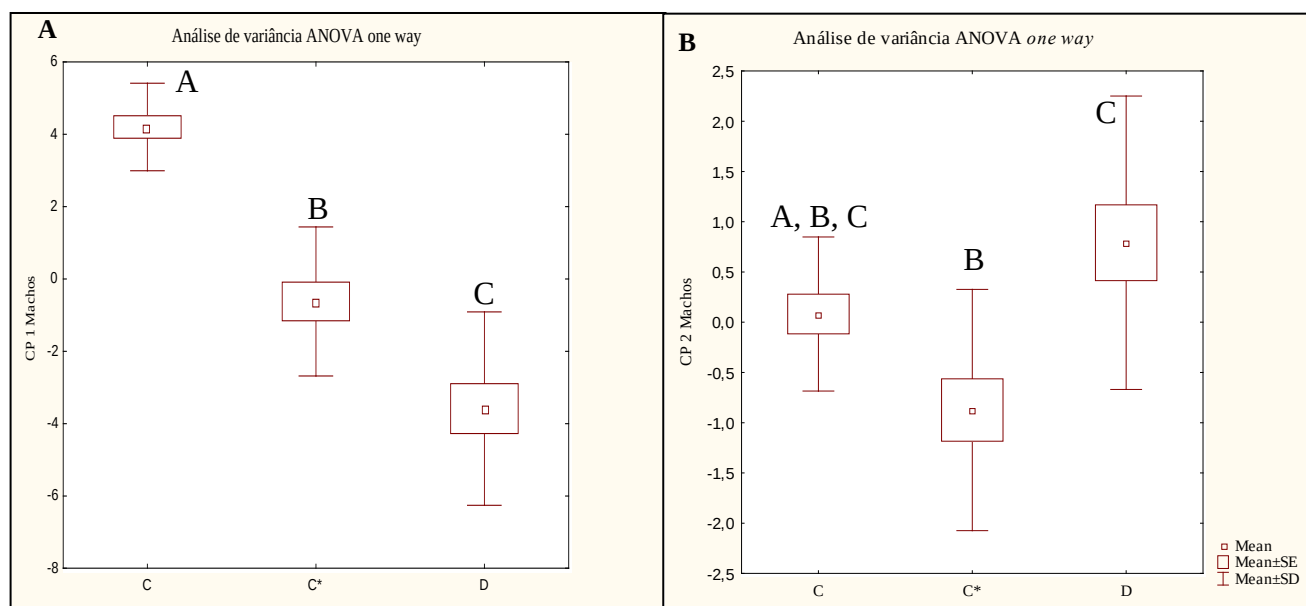


Figura 6. Análise de variância ANOVA *one way* de todos os machos avaliados. A- CP1. B- CP2. CP- Componente principal. C- *C. carbonaria* (n= 15). C*- Morfotipo 1 (n= 15). D- *C. denticulata*. (n = 31). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes.

A ACP das fêmeas revelou a presença de três CP, e estes explicaram 82,95% da variância encontrada nos três grupos. Porém o CP3, por ser responsável por apenas 7,43% da variância, não demonstrou ser um bom marcador morfológico para a diferenciação dos grupos estudados, sendo por isso desconsiderado da análise. Os CP1 e 2 foram responsáveis pela separação das fêmeas dos três grupos, e explicaram 75,52% da variância encontrada (Figura 7).

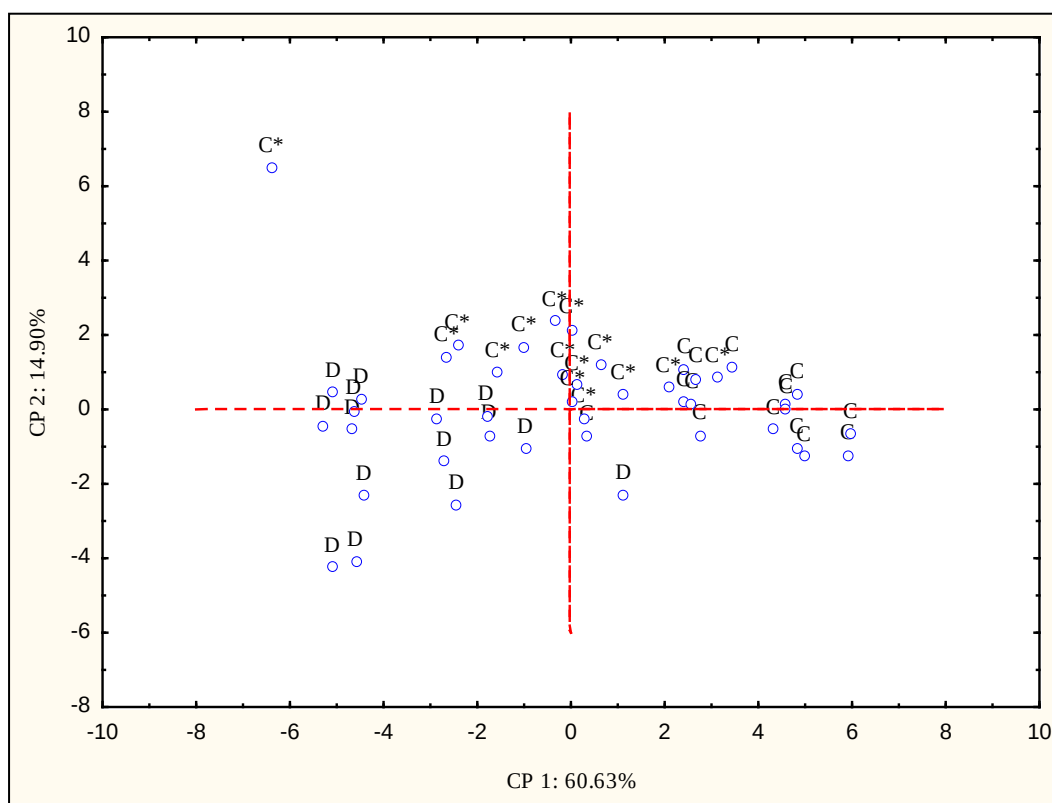


Figura 7. Análise de componentes principais de todas as fêmeas avaliadas (53). C- *C. carbonarius* (n= 15), C*- Morfotipo 1 (n=15), D- *C. denticulatus* (23). CP- Componente principal.

O CP1 explicou 60,62% da variância e foi composto pelas variáveis CLC, CCC, LLC, LCC, CLP, CCP, LLP, LCP, AC, EH, EP, EAB. Já o CP2, foi responsável por 14,89% da variância encontrada, sendo composto pelas variáveis: EA-Sc, DEA, e PEA.

O teste estatístico ANOVA *one way* para CP1 ($F= 52,1755$; $p= 0,000$) e CP2 ($F= 15,7131$; $p= 0,000$) realizado nas fêmeas, e seguido do método *a posteriori* de Tukey, revelou diferenças significantes para CP1 entre todos os grupos analisados. Para a análise de variância referente ao CP2, apenas *C. carbonarius* com morfotipo 1 e *C. denticulatus* com

morfotipo 1 apresentaram diferenças significantes, conforme demonstrado na Figura 8 (A e B) e na Tabela 4.

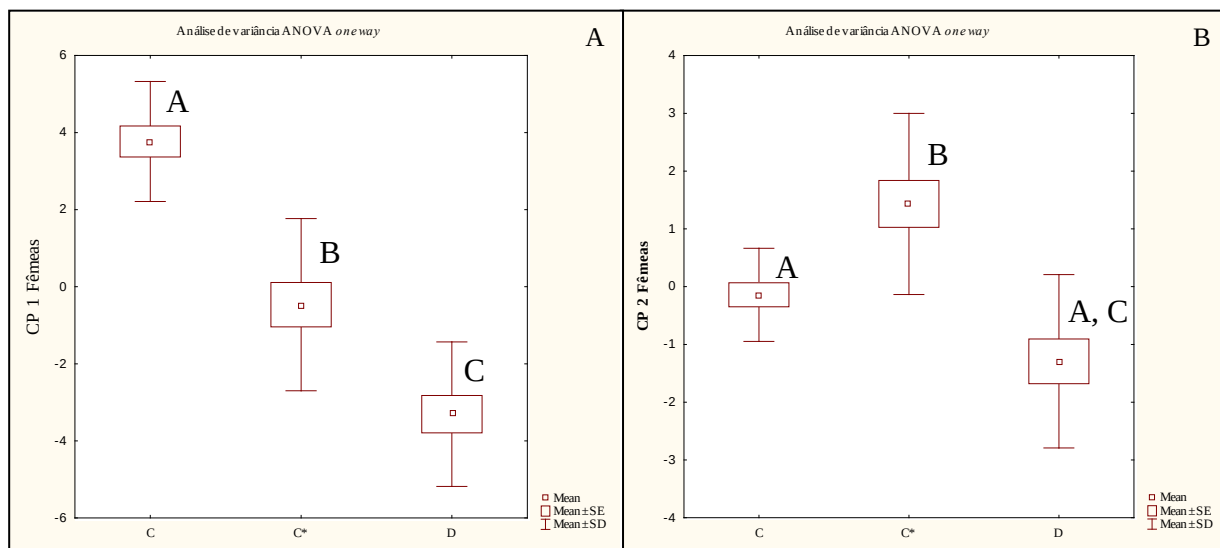


Figura 8. Análise de variância ANOVA *one way* de todas as fêmeas avaliadas. A- Componente principal 1. B- Componente principal 2. CP- Componente principal. C- *C. carbonaria* (n=15), C*- Morfotipo 1 (n= 15), D- *C. denticulata* (n= 54).

A Tabela 6 apresenta as médias dos autovalores encontrados na ACP para os CP1 e 2 dos 61 machos e 53 fêmeas avaliados, e que foram utilizados para a análise de variância referentes as Figuras 14 e 16.

Tabela 6 - Valores utilizados na Análise de Variância (ANOVA) - relativos aos dados obtidos após a ACP para o primeiro e segundo CP de todos animais avaliados

Espécie	Médias dos machos			Médias das fêmeas		
	n	CP 1	CP 2	n	CP 1	CP 2
<i>C. carbonarius</i>	15	4.203739	0.081868	15	3.770784	-0.141114
Morfotipo 1	15	-0.621032	-0.873445	15	-0.465302	1.432729
<i>C. denticulatus</i>	31	-3.58271	0.791577	23	-3.030548	-1.29162

A análise de variância referente ao CP1 revelou diferenças significantes em todos os grupos (machos e fêmeas), tais diferenças foram referentes ao tamanho e à massa nesses grupos. O CP2 dos machos apresentou diferenças apenas entre morfotipo 1 e *C. denticulatus*. Os grupos *C. carbonarius* e morfotipo 1 apresentaram médias muito próximas para o CP2, talvez em função destes grupos estarem ainda em processo de diferenciação. A avaliação das

fêmeas revelou diferenças significantes para o CP2 entre *C. carbonarius* e morfotipo 1, e entre morfotipo 1 e *C. denticulatus*. Em relação ao CP2 das fêmeas, este apresentou médias muito diferentes entre *C. carbonarius* e morfotipo 1, diferindo do padrão encontrado para os machos. Esse dado pode estar relacionado a diferentes pressões seletivas sobre os caracteres sexualmente dimórficos nas fêmeas, indicando um possível mecanismo de isolamento reprodutivo pré zigótico em função da diferenciação das regiões entre as placas anais e supra caudal nas fêmeas do morfotipo 1.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os sexos de *C. carbonarius* e morfotipo 1 em 11 das 20 variáveis registradas, enquanto que em *C. denticulatus* foram detectadas diferenças em 13 variáveis. O dimorfismo sexual mais acentuado nesta espécie sugere que a seleção sexual deve ter sido mais intensa em sua história evolutiva, possivelmente associada ao tipo de habitat na qual a espécie se desenvolveu. Este resultado difere daqueles obtidos por Moskovits (1988) e Jerozolinski (2005), que indicaram *C. carbonarius* como a espécie com dimorfismo sexual mais acentuado. Na espécie *C. carbonarius*, as fêmeas são maiores que os machos em nove das 11 características sexualmente dimórficas encontradas, padrão inverso do grupo morfotipo 1, em que os machos são maiores que as fêmeas em oito das 11 características sexualmente dimórficas. Esse padrão foi semelhante ao encontrado para *C. denticulatus*, em que os machos são maiores que as fêmeas em nove das 13 características sexualmente dimórficas da espécie.

Berry e Shine (1980) relacionaram o dimorfismo sexual em tamanho com o tipo de habitat, e interpretaram estes resultados à luz da teoria da seleção sexual. Gibbons e Lovich (1990), no entanto, não encontraram correlação significativa entre o tipo de habitat e o dimorfismo sexual em tamanho. Segundo Lovich (1996), tais diferenças dimórficas estariam relacionadas ao fato de que um sexo atinge maturidade reprodutiva antes que o outro, e dessa forma alcança maior porte.

Gosnell et al. (2009), sugeriram, com base em análise do dimorfismo sexual em tamanho, na ordem Testudines, que o estado basal do dimorfismo é aquele em que as fêmeas são maiores que os machos, assim, muitas espécies apresentariam esse padrão devido a inércia filogenética.

A evolução do dimorfismo sexual está relacionada à atuação de diferentes pressões seletivas, que determinam padrões distintos de tamanho, forma, coloração ou mesmo de características comportamentais, entre machos e fêmeas (ANDERSON; VITT, 1990). Algumas possíveis explicações em relação às diferenças no padrão de dimorfismo, considerando tanto as características da história de vida, quanto às diferenças ecológicas de cada espécie e de cada um dos sexos, são apresentadas por Butler et al (2000), que sugere aspectos relacionados a corte e ao habitat como determinantes do dimorfismo sexual relacionado ao tamanho corpóreo.

Entre as possíveis causas da presença de dimorfismo sexual no tamanho corpóreo estão: diferenças e limitações de requerimentos ecológicos e fisiológicos entre os sexos; taxas de mortalidade; tamanhos máximos atingidos por machos e fêmeas e maior sucesso reprodutivo em função do tamanho (ANDERSON; VITT, 1990). A seleção sexual é um dos mecanismos frequentemente citados na evolução do dimorfismo sexual, podendo resultar da competição intrasexual, normalmente na forma de combate entre machos, ou na escolha por parceiros (interssexual) (LOVICH, 1996; TRIVERS, 1972). Apesar de combates serem aparentemente raros em populações silvestres, comportamentos agressivos, como os observados entre indivíduos das duas espécies mantidas em cativeiro (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; PRITCHARD; TREBBAU, 1984), podem ter evoluído durante períodos em que as populações destas espécies teriam maiores densidades populacionais, e a competição por fêmeas era maior que a observada atualmente (JEROZOLIMSK, 2005). Entretanto, outras pressões seletivas como, por exemplo, a seleção natural para maximização da fecundidade, podem também atuar na evolução de caracteres sexualmente dimórficos (BONNET et al., 2001; WILLEMSSEN; HAILEY, 2003).

Tendo em vista que padrões de dimorfismo entre espécies estão relacionados à atuação de diferentes pressões seletivas, tanto ecológicas como reprodutivas, é de se esperar que indivíduos de uma mesma espécie apresentem padrões de dimorfismo sexual semelhantes; porém, isto não foi observado no presente estudo para *C. carbonarius* e morfotipo 1. Esses dados sugerem que *C. carbonarius* e o morfotipo 1 sofreram pressões seletivas diferentes ao longo de sua história evolutiva, provavelmente habitando ambientes diferentes. O morfotipo 1 apresentou um padrão de dimorfismo semelhante a *C. denticulatus*,

sugerindo que ambas sofreram pressões seletivas e habitaram ambientes semelhantes ao longo da sua história evolutiva. Dados obtidos no presente estudo sobre a distribuição geográfica do morfotipo 1 sugerem que essa hipótese pode ser verdadeira, pois segundo comunicação pessoal da Dra. Ana Lúcia da Costa Prudente e sua equipe (Museu Paraense “Emílio Goeldi”), e relatos encontrados nos livros de entrada de animais, a maioria desses foram coletados em bordas de matas. Tendo em vista que o morfotipo 1 é considerado atualmente como *C. carbonarius*, os dados aqui apresentados reforçam a hipótese da existência de um grupo morfológicamente distinto dentro do gênero *Chelonoidis*.

Diversos trabalhos sugerem a existência de híbridos entre *C. carbonarius* e *C. denticulatus*, porém, foi encontrado grande número de animais correspondentes ao morfotipo 1, e os mesmos reproduzem entre si, gerando filhotes também distintos, semelhantes, em coloração e padrão de escudos pré-frontais aos adultos. Dessa forma, inferimos que a existência dos morfotipos se deve a variações em nível de populações e não a eventos de hibridação, podendo até mesmo corresponder a populações em processo de diferenciação ou já diferenciadas. Vargas-Ramírez e colaboradores (2010) também relataram a existência de populações de *C. carbonarius* morfológicamente divergentes, apresentando-se mais próximas a *C. denticulatus* em morfologia e coloração. Tais dados reforçam a hipótese proposta de que o morfotipo 1 corresponde a um novo táxon, e que não deve mais ser considerado como *C. carbonarius*.

Ives e colaboradores (2008), estudando a espécie asiática *Indotestudo forstenii*, sugeriram que as diferenças em caracteres morfológicos em populações de quelônios, podem ser resultado de linhagens evolutivas distintas. Entretanto, não encontraram correlação com divergência genética, dificultando a interpretação desses dados, pois não se sabe ao certo até onde variações dentro de uma determinada espécie correspondem a variações regionais, ou a um grupo já diferenciado.

Os dados taxonômicos obtidos são relevantes para fins conservacionistas, pois apesar de *C. carbonarius* não estar inclusa na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (IUCN, 2014), essa classificação considera não haver subdivisões genéticas ou morfotipos na espécie; dessa forma, o *status* de conservação do morfotipo 1 ainda é incerto. Considerando as diferenças na distribuição geográfica e tipo de habitat e os indícios de que não

correspondem ao mesmo táxon, não se pode assumir que possuem o mesmo *status* de conservação, pois na Colômbia, por exemplo, a espécie é listada como criticamente ameaçada (CASTAÑO-MOURA, 2002).

As características morfológicas foram avaliadas com o objetivo de caracterizar as diferenças entre as espécies avaliadas, além de verificar quais são as características sexualmente dimórficas entre os grupos avaliados. Os resultados contribuíram para o conhecimento da biologia dos quelônios terrestres brasileiros, fornecendo dados para futuros estudos genéticos e taxonômicos, e para a preservação desse importante e pouco estudado grupo de vertebrados.

Conclusões

- A caracterização morfológica realizada neste estudo permitiu a diferenciação morfológica entre os grupos avaliados, podendo ser utilizada como metodologia na avaliação de unidades taxonômicas regionais em jabutis brasileiros;
- As diferenças observadas no padrão de dimorfismo sexual entre os grupos indicam que o morfotipo 1 sofreu pressões de seleção distintas da espécie *C. carbonarius*, sugerindo dessa forma, que corresponde a nova unidade taxonômica.

Capítulo 4

7. Capítulo 4. Estudo Citogenético em Jabutis Brasileiros (Testudinidae)

Resumo

Os répteis sofreram redução do número de espécies desde a época em que dominavam a Terra até os dias atuais. Os quelônios são pouco estudados, principalmente quanto à sua caracterização citogenética. O presente projeto teve por objetivo analisar das características cromossômicas, efetivas para a diferenciação das espécies *Chelonoidis carbonarius* e *C. denticulatus*, quelônios terrestres representativos de dois biomas brasileiros (Cerrado e Amazônia); e avaliar a existência de um morfotipo de *C. carbonarius*, além de descrever o cariótipo das espécies em estudo. Os animais foram coletados no criatório “Reginaldo Uvo Leone”, localizado na cidade de Tabapuã - SP. Foram realizadas análises citogenéticas clássicas e moleculares no intuito de diferenciar duas espécies de jabutis brasileiras, *C. carbonarius* e *C. denticulatus*, dando ênfase à comparação com o morfotipo 1, que apresenta tamanho e coloração diferenciada do padrão estabelecido para a espécie. Os estudos citogenéticos permitiram o reconhecimento do número cromossômico de $2n = 52$ cromossomos para os três grupos avaliados. O bandamento G não mostrou boa reprodutibilidade e constância nos padrões de bandamentos. Na espécie *C. carbonarius*, a técnica de bandamento C em machos, revelou a presença de heterocromatina constitutiva em dois microcromossomos e na região centromérica de dois macrocromossomos; nas fêmeas apenas dois microcromossomos apresentaram marcação específica. A espécie *C. denticulatus* e o morfotipo 1, não apresentaram blocos heterocromáticos evidentes. Em todos os grupos avaliados, a análise dos resultados por impregnação por íons prata (Ag-NOR), que evidencia regiões organizadoras de nucléolo (NORs), revelou marcação no décimo par de cromossomos. Nos machos foram evidenciadas as regiões teloméricas de um par de macrocromossomos acrocêntricos, e nas fêmeas em apenas um único macrocromossomo acrocêntrico desse mesmo par. Os resultados da hibridação *in situ*, com sonda de DNAr 28S, revelaram duas RONS nos machos e uma nas fêmeas dos três grupos de jabutis avaliados, indicando que as fêmeas possuem uma dessas regiões inativas. Com base nos dados citogenéticos avaliados, não foi possível inferir que o morfotipo 1 corresponda a uma nova espécie de jabuti, possivelmente em função do caráter altamente conservado dos cromossomos em quelônios.

Palavras-chave: Testudinidae, *Chelonoidis*, morfotipo, citogenética, Testudinidae.

Introdução

Uma das possibilidades de elucidar as diferenças entre espécies se dá por meio do estudo dos cromossomos, com base no cariótipo e em padrões de bandamentos cromossômicos. No entanto, existem poucos dados na literatura sobre estudos citogenéticos em Testudines brasileiros, a maioria concentra-se em representantes da família Chelidae da América do Sul, Austrália e África (BULL; LEGLER, 1980; MC BEE et al., 1985).

Marcadores citogenéticos constituem uma ferramenta importante em estudos citotaxômicos, pois permitem caracterizar espécies e populações, incluindo não somente número cromossômico e fórmula cariotípica, mas também sistemas de cromossomos sexuais diferenciados, cromossomos supra numerários, número e localização das regiões organizadoras de nucléolos (RON), distribuição da heterocromatina constitutiva, bandamento G, impregnação por íons prata e coloração por fluorocromos base-específicos (ALMEIDA-TOLEDO, 1998; GUERRA, 2004; SUMNER, 1972).

É importante ressaltar que no estudo dos cromossomos de répteis, dados de bandamento cromossômico clássico e molecular ainda não desempenham papel relevante na literatura, devido às dificuldades em se obter bons índices mitóticos e problemas na padronização das técnicas (GUERRA, 2004).

Estudos citogenéticos em quelônios representam grande desafio, em virtude das dificuldades em se obter bons índices mitóticos e, também, pela falta de padronização das técnicas citogenéticas clássicas e moleculares.

Este capítulo teve por objetivo caracterizar e comparar o cariótipo de *C. carbonarius*, *C. denticulatus* e do morfotipo 1 com base em técnicas de citogenética clássica de bandamento (C, G), impregnação de íons prata (Ag-Nor) e de hibridação *in situ* (HIS), com sonda ribossomal 28S.

Material e Métodos

Amostras

As amostras de sangue periférico foram coletadas no criatório “Reginaldo Uvo Leone” (Registro IBAMA nº. 167525), localizado na cidade de Tabapuã - SP (20° 59’ 47.4” S, 49° 07’ 16.6” W). Os animais do criatório são provenientes de Zoológicos, Parques e de apreensões realizadas pela Polícia Ambiental, sendo em sua maioria, provenientes de populações naturais, porém sem procedência confirmada.

Os jabutis foram identificados como *C. carbonarius* ou *C. denticulatus*, por meio das características descritas por Williams (1960), Castanõ-Mora e Lugo-Rugeles (1981), Pritchard e Trebbau (1984) e Moskovits, (1998), e os animais que não se enquadravam como nenhuma das espécies foram considerados como morfotipo 1. Os animais foram identificados com base nas placas de aço numeradas utilizadas como marcação para controle dos indivíduos existentes no criatório, e utilizados dois casais de cada grupo.

Padronização da cultura de células

Para a análise citogenética foi coletado sangue de dois casais de cada grupo, pela veia margino costal (SILVA et al., 2012), sendo colhidos de 3 a 5 mL de sangue total. As amostras foram identificadas e acondicionadas em tubos heparinizados e mantidas em refrigeração até o término das coletas, quando foram colocados em estufa de cultura, à 37° C, para ocorrer a sedimentação dos linfócitos.

Para garantir a assepsia das amostras o local de coleta foi higienizado com álcool 70° g/L. Após o procedimento, os animais permaneceram sob observação por cinco horas, antes de serem devolvidos para os seus respectivos recintos. Todos os animais utilizados para as aferições morfológicas e para as coletas de sangue tiveram suas identificações individuais registradas.

Duas horas após a coleta, foi verificada a sedimentação do sangue, pela formação de duas fases distintas: a superior, amarelada, que constitui o plasma, e a inferior vermelha, com

as hemácias sedimentadas. Entre essas camadas observou-se uma delgada camada esbranquiçada que corresponde à deposição dos leucócitos, a qual foi utilizada para a montagem da cultura de linfócitos, segundo o protocolo descrito por Silva et al. (2011). As análises de bandamento C, G e impregnação por íons prata, foram realizadas segundo Sumner (1972), Seabright (1971) e Howell e Black (1980). Para a avaliação da hibridação fluorescente *in situ*, com sonda 28S foram realizadas segundo Leitch et al. (1994).

A análise das metáfases obtidas a partir de culturas de linfócitos foi realizada ao microscópio de luz, acoplado a um analisador de imagens (AXIOCAM® ICc 3).

Inicialmente, as metáfases foram localizadas utilizando objetivas de 10x ou 20x e a análise foi realizada em objetiva de 100x. As metáfases escolhidas apresentavam cromossomos espalhados sem sobreposição. Os cromossomos foram classificados como metacêntricos, submetacêntricos, acrocêntricos ou microcromossomos, baseando-se em sua morfologia e posição do centrômero (LEVAN et al., 1964).

Resultados e Discussão

Análise citogenética de *C. carbonarius*, Morfotipo 1 e *C. denticulatus*

A coloração convencional por Giemsa revelou um número diplóide $2n = 52$ cromossomos, em machos e fêmeas de *C. carbonarius*, morfotipo 1 e *C. denticulatus*. Nas espécies avaliadas os cromossomos foram distribuídos em três grupos (A, B, C), com base no tamanho e na posição dos centrômeros. O grupo A foi composto por 28 cromossomos (3 pares metacêntricos, 1 par acrocêntrico e 10 pares submetacêntricos); o grupo B por 7 pares de cromossomos acrocêntricos e o grupo C por 5 pares de microcromossomos (**Figuras 1, 2 e 3 A e B**).

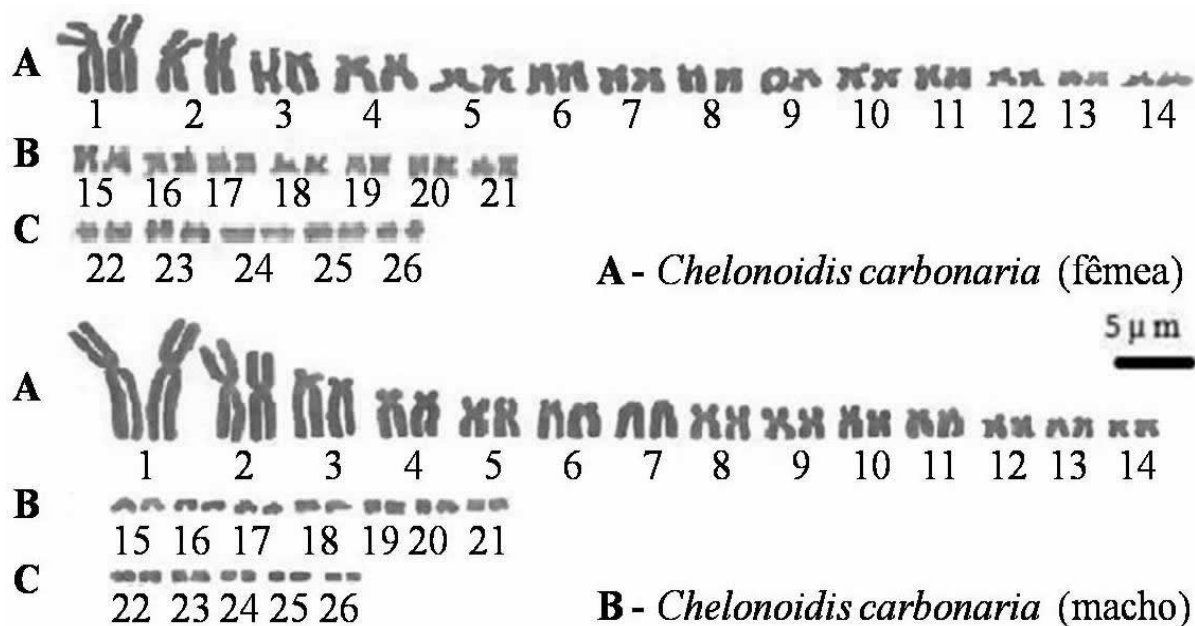


Figura 1. Coloração convencional: Giemsa. *Chelonoidis carbonarius*. **A-** Cariograma de Fêmea. **B -** Cariograma de Macho. Barra 5 µm.

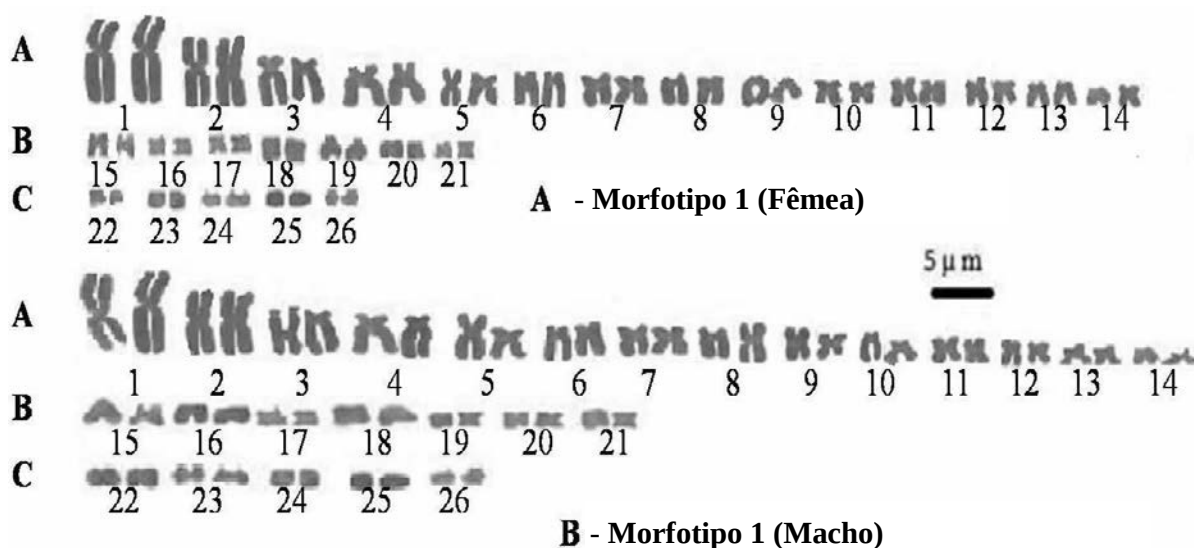


Figura 2. Coloração convencional: Giemsa. Morfotipo 1. **A-** Cariograma de Fêmea. **B -** Cariograma de Macho. Barra 5 µm.

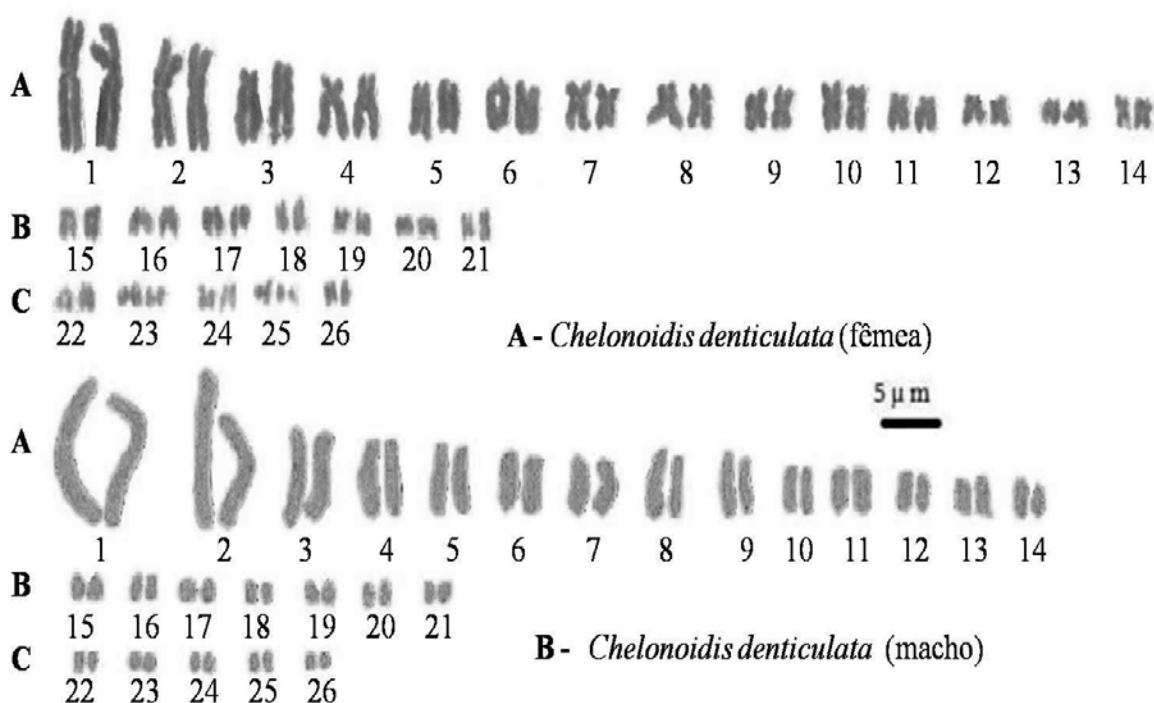


Figura 3. Coloração convencional: Giemsa. *Chelonoidis denticulatus*. **A**- Cariograma de Fêmea. **B** - Cariograma de Macho. Barra 5 μ m.

O número diplóide de cromossomos $2n = 52$ foi observado em outros membros da família Testudinidae, como em *C. donosobarrosi*, *C. chilensis*, *C. elephantopus* e *C. gigantea*, em membros da família Pelomedusidae e em membros do gênero *Sacalia* e *Mauremys*, família Bataguridae (BENIRSCHKE et al., 1976; BICKHAM, 1975; BICKHAM; BAKER, 1976; FORBES, 1966; GOLDSTEIN; LIN, 1972; SAMPAIO et al., 1971). Esses dados refletem o caráter conservado do cariótipo da família Testudines.

O gênero *Chelonoidis* é um dos poucos gêneros de quelônios em que se sugerem variação cromossômica intragenérica. Sampaio e colaboradores (1971) reportaram diferenças na posição do centrômero do cromossomo 12 de *C. carbonarius* e *C. denticulatus*, que é um dos menores macrocromossomos, na primeira espécie esse cromossomo apresentou-se metacêntrico e, na segunda, acrocêntrico. Entretanto, Bickham e Baker (1976), reavaliaram o cariótipo de *C. carbonarius* e *C. denticulatus*, e observaram que não havia diferenças na morfologia cromossômica entre essas espécies. Nossos dados concordam com

o observado por Bickham e Baker (1976), pois nenhuma diferença cromossômica foi observada entre os grupos avaliados. Esse conflito entre os autores reflete as dificuldades metodológicas encontradas nas análises citogenéticas em quelônios, devido ao grande número de microcromossomos e ao fato de ser extremamente difícil obter metáfases com um mesmo grau de condensação dos cromossomos e sem sobreposições.

O cariótipo dos grupos avaliados assemelha-se em número e morfologia com o cariótipo do gênero *Sacalia* e *Mauremys* (Bataguridae), que compreende uma família sugerida na literatura como basal em relação aos Testudinidae. Como o cariótipo primitivo dos Batagurídeos parece ser restrito ao Velho Mundo, a extrema similaridade com o cariótipo dos *Chelonoidis* brasileiros sugere que os mesmos possuem linhagens comuns no Velho Mundo (BICKHAM; BAKER, 1976).

Nossos dados confirmam que algumas espécies da família Testudinidae, apresentam um número relativamente menor de microcromossomos, em relação à família Trionychidae (MATSUDA et al., 2005; NOLETO et al. 2006; ROHILLA et al., 2006). Os mecanismos envolvidos na alteração numérica dos microcromossomos ao longo da evolução dos Testudines podem ser a perda numérica, translocação de microcromossomos para cromossomos acrocêntricos e formação de cromossomos metacêntricos (BICKHAM, 1975).

O bandamento G foi realizado no intuito de facilitar o pareamento dos macrocromossomos, e detectar possíveis rearranjos. Esses dados seriam utilizados para comparar o cariótipo dos grupos avaliados, servindo como ferramenta citotaxonômica, porém, não foi observado um padrão constante nas metáfases analisadas (**Figuras 4, 5 e 6 A e B**).

A técnica de bandamento G foi utilizada no pareamento dos cromossomos de algumas espécies, como *Hydromedusa tectifera*, *Chelonia mydas*, *Podocnemis vogli* e *Platemys platycephala*. Em todas essas espécies avaliadas, a técnica não mostrou sensibilidade e reprodutibilidade suficientes para permitir a diferenciação entre grupos próximos, com base no padrão de bandamento, não sendo, portanto, um bom marcador citotaxonômico para quelônios (BICKHAM et al., 1980; HAIDUK, BICKHAM, 1982; MORITZ, 1984; NOLETO et al., 2006; ORTIZ et al., 2005). As dificuldades técnicas podem se dar devido ao tipo de cultura, em que nem sempre é possível obter metáfases sem citoplasma sobreposto, o

que dificulta a ação da tripsina, responsável pela degradação do cromossomo e formação das bandas G. Dessa forma, devido a pouca reprodutibilidade da técnica e a inconstância dos padrões de bandamento encontrados, não foi possível utilizá-la como característica taxonômica para as espécies estudadas.

Na espécie *C. carbonarius*, a técnica de bandamento C das fêmeas revelou a presença de heterocromatina constitutiva em dois microcromossomos e na região centromérica de dois macrocromossomos. Nos machos apenas dois microcromossomos apresentaram marcação específica (**Figura 4 C e D**). Já na espécie *C. denticulatus* e no morfotipo 1, não foi observado a presença de blocos heterocromáticos evidentes, indicando que esses encontram-se distribuídos ao longo dos cromossomos, não possibilitando, dessa forma, sua visualização (**Figuras 5 e 6 C e D**).

A heterocromatina, evidenciada pela técnica de bandamento C, constitui parte importante do genoma de eucariotos, por possuir funções como segregação cromossômica, organização nuclear e regulação da expressão gênica (GREWAL; JIA, 2007). O padrão de distribuição da heterocromatina encontrado no morfotipo 1 e *C. denticulatus*, com ausência de blocos heterocromáticos evidentes ou difusos, já foi observado em outros grupos de vertebrados, como em peixes da família Pimelodidae, e para a maioria dos Siluriformes (FENOCCHIO; BERTOLLO, 1992; SWARÇA et al., 2001; TRECO et al., 2008). Essa característica peculiar da cromatina, compartilhada pelo morfotipo 1 e *C. denticulatus* é resultante de mecanismos epigenéticos como remodelamento da cromatina e metilação do DNA, que auxiliam na compactação e organização do genoma em domínios cromáticos. Diversas atividades gênicas são dependentes do estado de condensação da cromatina, que pode mudar em resposta a sinais celulares e atividade gênica, respondendo inclusive a mudanças ambientais (GREWAL; JIA, 2007). Tais fenômenos podem explicar as variações na quantidade e na distribuição da heterocromatina constitutiva. Essas alterações são consideradas importantes na evolução de alguns grupos de vertebrados, permitindo a diferenciação de espécies e populações, além de serem ferramentas úteis para estudos de relações filogenéticas (ANDREATA et al., 2006; TRECO et al., 2008).

Esse dado difere o morfotipo 1 e *C. denticulatus* de *C. carbonarius*, que apresenta blocos heterocromáticos evidentes. Porém, análises citogenéticas mais sensíveis devem ser

empregadas para verificar possíveis variações, já que a citogenética convencional foi pouco elucidativa e apresentou baixo poder de resolução. Em machos de *C. carbonarius*, o bandamento C revelou uma marcação na região centromérica do par cromossômico 1 e 2, e em dois pares de microcromossomos, como observado em *Pelodiscus sinensis* (BICKHAM; BAKER, 1975). Variações heterocromáticas intragenéricas são raramente descritas na literatura em quelônios.

Não foi observada a presença de cromossomos sexuais nos grupos do presente estudo, porém em algumas espécies de quelônios, como *Chelodina longicollis*, a presença de uma banda larga de heterocromatina constitutiva em um dos pares de microcromossomos, revelou os cromossomos sexuais, confirmado posteriormente por citogenética molecular (EZAZ et al., 2006; YAMADA et al., 2005).

Em todos os grupos avaliados, o bandamento das regiões organizadoras nucleolares com íons prata (Ag-NOR) revelou nos machos, marcações no décimo par de macrocromossomos acrocêntricos, evidenciando a região telomérica do braço curto, e nas fêmeas, em apenas um único macrocromossomo acrocêntrico desse mesmo par (**Figuras 4, 5 e 6 E e F**).

No gênero *Chelonoidis*, as RONS estão localizadas na região telomérica de um pequeno par cromossômico metacêntrico, e não há constrições secundárias visíveis, enquanto em *Gopherus*, as mesmas estão localizadas na região intersticial de um braço longo de um cromossomo médio subteloentrico, que possui constrição secundária visível (MARTINEZ et al., 2009). Esses resultados indicam que apesar de não existir diferenças cromossômicas numéricas na família Testudinidae, a estrutura dos cromossomos pode diferir em relação à morfologia e localização das RONS. Essa baixa taxa de variação encontrada se deve ao fato de que os quelônios apresentam um cariótipo altamente conservado.

A técnica de hibridação *in situ* foi realizada para verificar o número real de RONS, pois a técnica de impregnação por íons prata tem afinidade por proteínas acídicas associadas às RONS, marcando apenas as regiões ativas da interfase anterior das células analisadas. Os resultados da hibridação *in situ* revelaram duas RONS em machos e fêmeas dos três grupos de jabutis avaliados (**Figuras 4, 5 e 6, em destaque**).

O método para obtenção de cromossomos mitóticos, padronizado no presente estudo, mostrou-se eficaz, resultando em suspensões com bom índice metafásico e cromossomos pouco condensados, facilitando as análises. De forma geral, a obtenção de cromossomos metafásicos em quelônios não é tida como fácil, pois além das dificuldades em se obter bons índices mitóticos, a presença de um grande número de microcromossomos dificulta o pareamento dos pares homólogos e o reconhecimento de padrões de bandamento cromossômico.

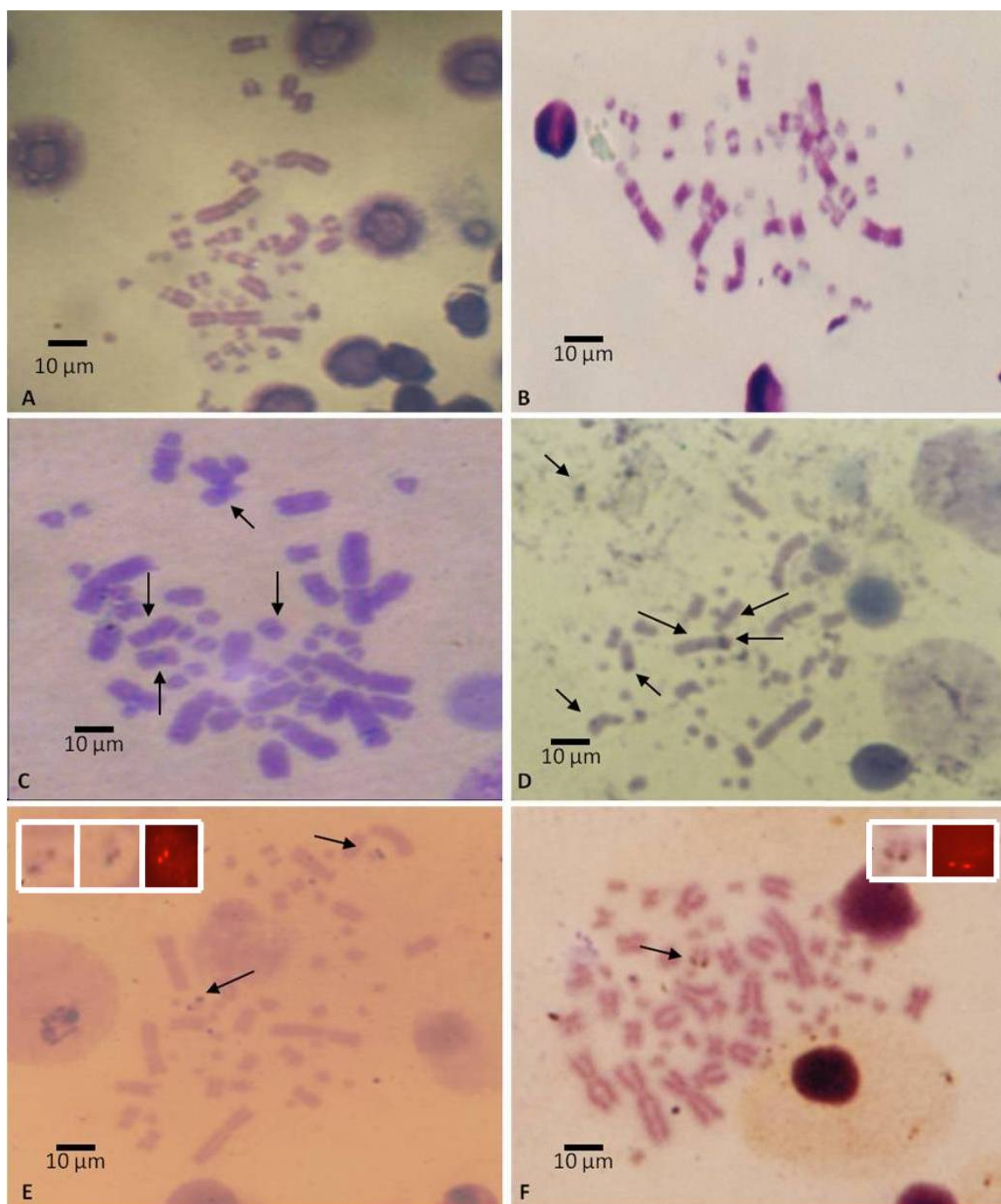


Figura 4. Metáfases de *Chelonoidis carbonarius* submetidas às técnicas de bandamento cromossômico. **A e B** - Bandamento G; **C e D** - Bandamento C; **E e F** - Bandamento Ag-NOR. Fêmeas: **A, C e E**. Machos: **B, D e F**. As setas em **E e F** indicam as RONS. Nos detalhes estão destacados os cromossomos portadores das regiões organizadoras nucleolares reveladas pela impregnação por íons prata (Ag-NOR) e os núcleos interfásicos com os dois sítios de DNAr 28S revelados pela técnica de hibridação *in situ*. Barra = 10 μm.

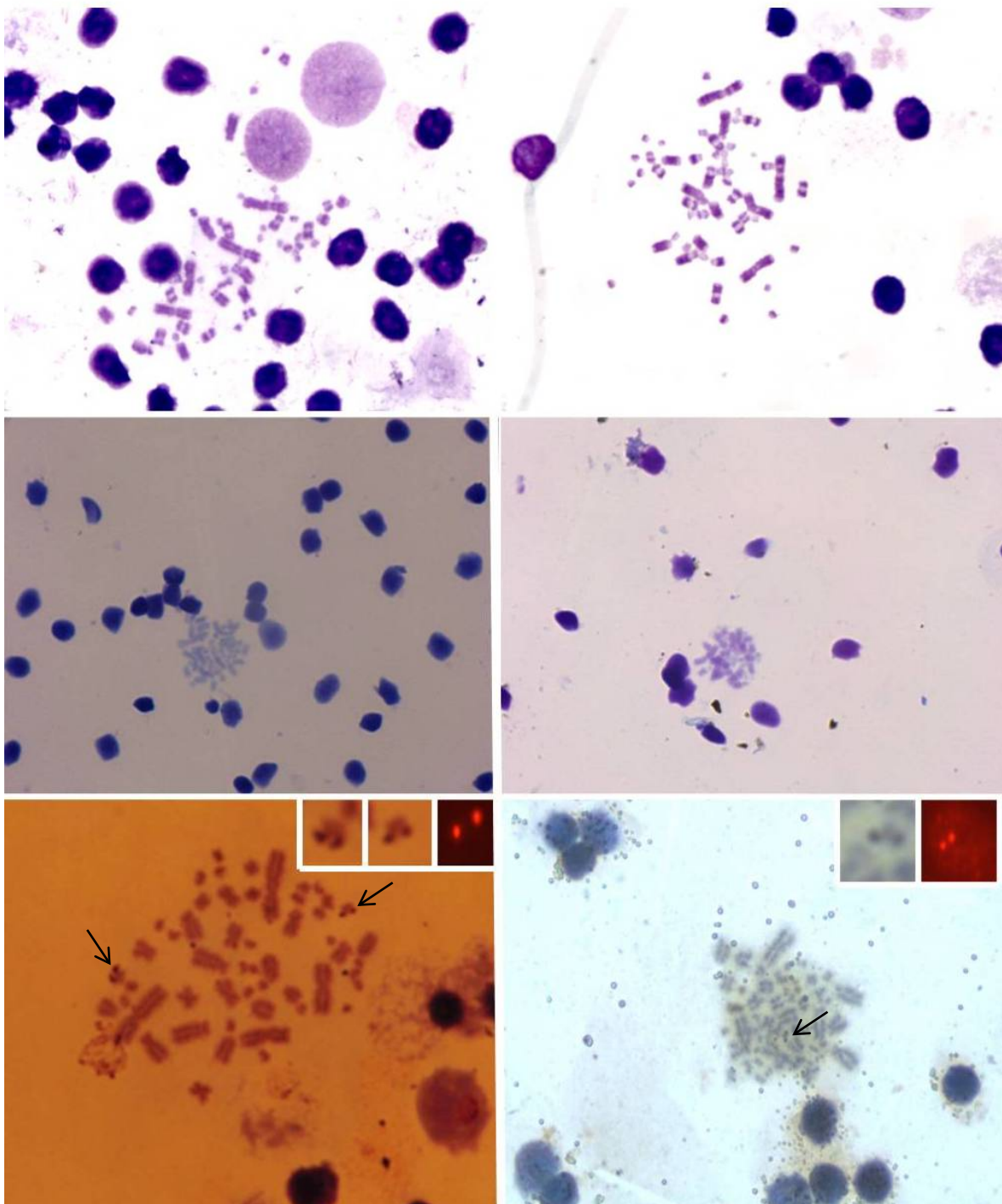


Figura 5. Metáfases do Morfotipo 1 submetidas às técnicas de bandamento cromossômico. **A e B** - Bandamento G; **C e D**- Bandamento C; **E e F**- Bandamento Ag-NOR. Fêmeas: **A, C e E**. Machos: **B, D e F**. As setas em E e F indicam as RONS. Nos detalhes estão destacados os cromossomos portadores das regiões organizadoras nucleolares reveladas pela impregnação por íons prata (Ag-NOR) e os núcleos interfásicos com os dois sítios de DNAr 28S revelados pela técnica de hibridação *in situ*. Barra = 10 µm.

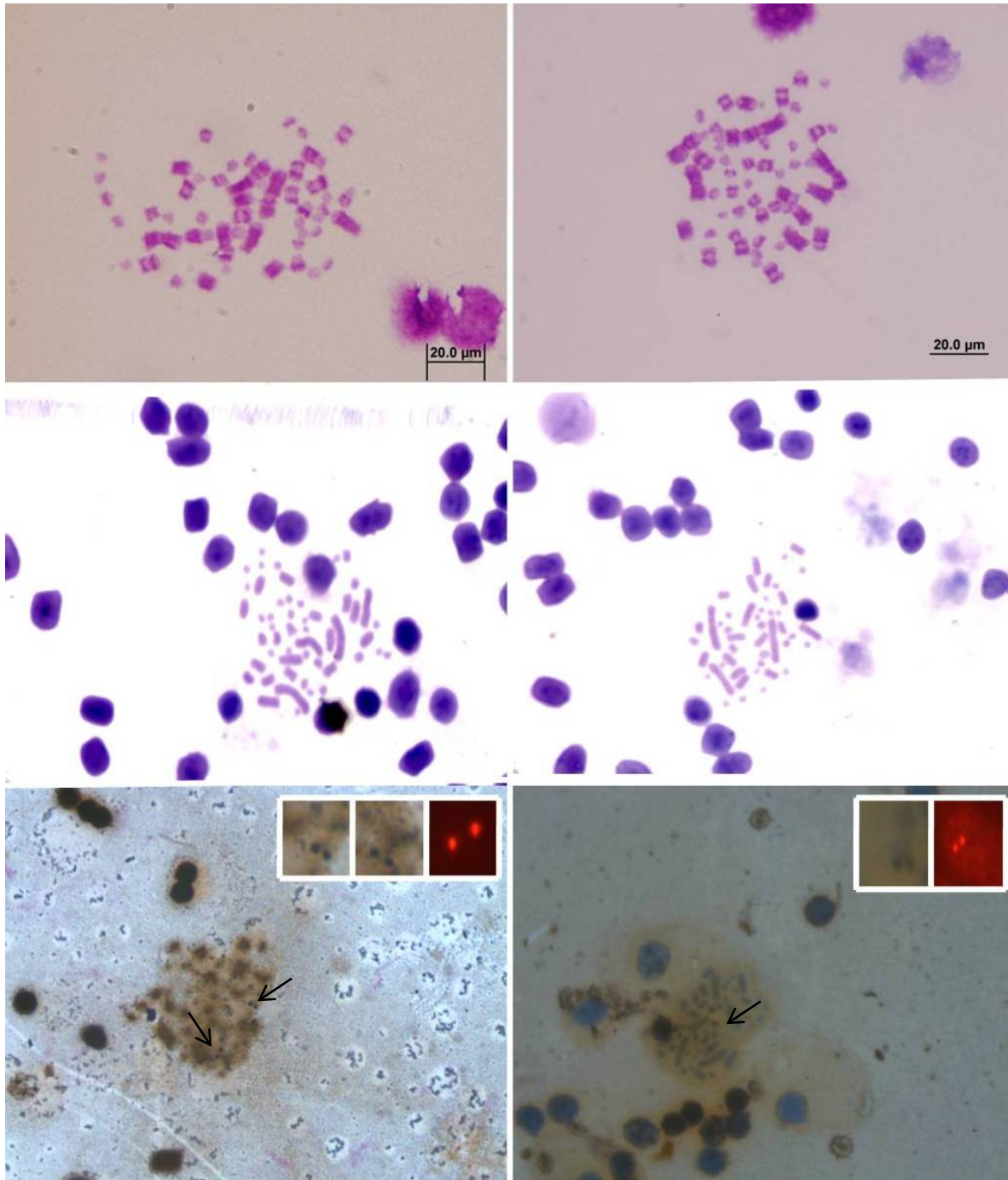


Figura 6. Metáfases de *Chelonoidis denticulatus* submetidas às técnicas de bandamento cromossômico. **A e B** - Bandamento G; **C e D** - Bandamento C; **E e F** - Bandamento Ag-NOR. Fêmeas: **A, C e E**. Machos: **B, D e F**. As setas em E e F indicam as RONS. Nos detalhes estão destacados os cromossomos portadores das regiões organizadoras nucleolares reveladas pela impregnação por íons prata (Ag-NOR) e os núcleos interfásicos com os dois sítios de DNAr 28S revelados pela técnica de hibridação *in situ*. Barra = 10 μm.

Conclusões

- O bandamento C revelou diferenças entre os grupos *C. denticulatus* e o morfotipo 1 de *C. carbonarius*, em relação à presença de blocos heterocromáticos, presentes apenas em *C. carbonarius*. Entretanto, as demais técnicas de citogenética clássica (coloração por Giemsa, bandamento G e impregnação por íons prata) e molecular (hibridação *in situ* com sondas de DNAr 28S) não revelaram diferenças na estrutura cromossômica entre os grupos avaliados;

8. Capítulo 5. Perfil Hemoglobínico como Parâmetro de Análise Taxonômica em Testudinidae Brasileiros

Resumo

Visando estabelecer um perfil hemoglobínico para os Testudinidae brasileiros *Chelonoidis denticulatus*, *C. carbonarius* e morfotipo 1, foram realizadas eletroforeses de hemoglobina em pH ácido em gel de Agar fosfato e em pH alcalino em acetato de celulose, com o intuito de visualizar as frações específicas de cada espécie. Para a quantificação das frações foi utilizada a cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Para uma análise mais aprofundada e melhor detalhamento do perfil hemoglobínico das espécies em estudo, foram realizadas eletroforeses de cadeias polipeptídicas em pH ácido e alcalino. Observamos diferenças nos perfis hemoglobínicos de *C. denticulatus* em relação à *C. carbonarius* e ao morfotipo 1, o que sugere que a metodologia empregada, pouco comum em estudos taxonomicos, pode atuar como metodologia de base para o estabelecimento de relações de parentesco entre espécies, dado que as hemoglobinas são proteínas com genes bem conservados. O presente estudo evidenciou a existência de diferenças na mobilidade das hemoglobinas entre *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e do morfotipo 1 na eletroforese em pH alcalino, porém, o comportamento das cadeias de globina é semelhante entre os três grupos. A cromatografia líquida de alta performance evidenciou diferentes tempos de retenção nas frações de globina de *C. denticulatus* e de *C. carbonarius*, mas não entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1, indicando que, possivelmente, o tempo de divergência entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1 é mais recente que a divergência entre *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, devido ao carácter altamente conservado desta proteína funcional. Desta forma, considerando o alto grau de conservação das hemoglobinas em vertebrados, e as diferenças observadas na eletroforese em pH alcalino e HPLC, inferimos que, *C. carbonarius* e o morfotipo 1 apresentam um provável ramo comum.

Palavras Chave: Testudinidae, Hemoglobina, eletroforese, *Chelonoidis*.

Introdução

A família Testudinidae, cujos representantes são os popularmente conhecidos jabutis, representa um importante grupo para estudos genéticos e taxonômicos, devido a sua história filogenética, a qual carrega características únicas que foram mantidas por esses animais durante a evolução (SHAFTER, 2009). São representados somente por espécies terrestres, incluindo mais de 200 formas fósseis e aproximadamente 40 espécies viventes (AUFFENBERG, 1974; POUGH et al., 2001). No Brasil, há ocorrência de apenas duas espécies, *C. denticulatus* (LINNAEUS, 1766), popularmente conhecida como “jabuti-tinga”, e *C. carbonarius* (SPIX, 1824), ou “jabuti-piranga”. Ambas as espécies assemelham-se em alguns aspectos, como tamanho corporal, dieta e comportamento. No entanto, alguns autores têm relatado padrões distintos do usual para *C. carbonarius*, assim como populações com haplótipos de DNA mitocondrial divergentes (SILVA et al., 2011; VARGAS-RAMÍREZ et al., 2010).

Com base em análises morfológicas e citogenéticas de animais encontrados em um cativeiro do interior do estado de São Paulo, Silva (2011) observou um morfotipo de jabuti que divergia dos padrões usuais de *C. denticulatus* e *C. carbonarius*. Este morfotipo, *a priori* denominado morfotipo 1, diferencia-se pelo padrão de escudos nasais, coloração da região cefálica e dos escudos dérmicos dos membros locomotores, cuja coloração é alaranjada, e possuem tamanho intermediário entre *C. denticulatus* e *C. carbonarius*. Tais observações questionam a ideia vigente de que os morfotipos sejam considerados como da espécie *C. carbonarius* e que correspondam a uma única unidade taxonômica.

Visando elucidar questões de taxonomia, pesquisadores constantemente realizam estudos com dados morfológicos e moleculares. Um exemplo de estudo taxonômico pouco realizado para estes fins, consiste no estabelecimento do perfil de hemoglobinas (Hb) como parâmetro taxonômico, devido ao grau de conservação dos genes da globina em vertebrados. A metodologia utilizada para estabelecer tal perfil, representa uma opção econômica para estudos de taxonomia, pois quaisquer alterações no padrão de corrida e perfil das frações de hemoglobina podem representar resultados significantes (BONINI-DOMINGOS et al., 2007; DESSAUER et al., 1957).

As hemoglobinas são proteínas homólogas com heterogeneidade marcada, o que faz com que espécies evolutivamente próximas apresentem semelhanças no perfil, o que pode ser utilizado como indicador de relação filogenética (DESSAUER et al., 1957).

Este capítulo teve por objetivo, avaliar o perfil das frações de hemoglobina em *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e morfotipo 1, por meio da determinação do padrão de migração eletroforético e das globinas em pH alcalino e ácido e quantificar as frações por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), além de explorar o potencial discriminativo dessas técnicas, como método de estudo taxonômico, abordagem essa, incipiente na literatura.

Material e Métodos

Coleta das amostras

Os animais utilizados neste estudo foram provenientes do Zoológico Municipal de São José do Rio Preto, e do Zoológico Municipal “Dr. Flávio Leite Ribeiro”, de Araçatuba, ambos no estado de São Paulo. A distinção dos espécimes foi baseada em características morfológicas relatadas na literatura (PRITCHARD; TREBBAU, 1984; SILVA, 2011). Foram coletados 1 mL de sangue periférico da veia margino costal, segundo metodologia padronizada por Silva et al. (2012), de 30 animais, sendo cinco machos e cinco fêmeas de cada grupo. As amostras coletadas foram armazenadas em tubos contendo anticoagulante heparina e refrigeradas até o momento da sua utilização, para evitar degradações. Devido à rápida ação coagulante, e da capacidade de formação de dímeros, que facilitam a degradação das amostras, todas as análises foram realizadas em período inferior a 24 horas após a coleta.

Perfil Hemoglobínico

Para que as amostras fossem submetidas a procedimentos eletroforéticos, as amostras de sangue total foram lavadas e centrifugadas com solução salina, para a retirada do plasma e obtenção de papa de eritrócitos. Esse concentrado foi então lisado com água destilada e o produto total purificado com clorofórmio, para a obtenção da solução de hemoglobina (Hb). Com a solução de hemoglobinas, foram realizadas eletroforeses em pH ácido em gel ágar

fosfato (VELLA, 1968) e em pH alcalino em acetato de celulose (MARENGO; ROWE, 1965). Para a análise das cadeias polipeptídicas utilizamos a eletroforese de globinas, após preparação com uréia e 2-mercaptoetanol, em pH ácido em gel de poliacrilamida (ALTER et al., 1980, modificado por BONINI-DOMINGOS, 2006) e em pH alcalino em acetato de celulose (SCHNEIDER, 1974 modificado por BONINI-DOMINGOS, 2006).

Na realização de eletroforeses é comum o uso de um padrão conhecido, o permite a comparação das amostras em estudo, entretanto, o padrão de migração das hemoglobinas de jabutis é desconhecido. Dessa forma, utilizou-se amostra de sangue humano com Hb AS. A escolha do padrão AS se fundamentou na padronização e ponto isoelétrico já conhecido dessa Hb comum na espécie humana. Uma alicota (5 μ L) das amostras de sangue total foi submetida à cromatografia líquida de alta performance, para quantificação das globinas. O equipamento utilizado foi o VARIANT da BIO-RAD com Kit específico para análise de hemoglobinas. A utilização deste kit se deu devido à inexistência de reagentes específicos para hemoglobinas de jabutis e pela facilidade na obtenção de perfil qualiquantitativo de hemoglobinas.

Resultados e Discussão

O perfil de Hb obtido por eletroforese em pH alcalino, evidencia a presença de frações majoritárias e minoritárias. Na eletroforese em pH alcalino em acetato de celulose (**Figura 1**) para amostras de *C. denticulatus*, verificamos a presença de quatro frações de globina, sendo duas majoritárias (F₁ e F₂). A fração F₁ encontrou-se na porção inferior da fita de acetato de celulose, abaixo da fração correspondente à Hb S do padrão, enquanto que, a fração F₂, foi visualizada no topo da fita de acetato de celulose, acima da fração correspondente à Hb A.

Em *C. carbonarius*, observamos a formação de cinco bandas, sendo duas delas predominantes, denominadas F₁ e F₂ (**Figura 1**). A fração F₁ aparece abaixo da posição referente à Hb S, enquanto a fração F₂ encontra-se acima da posição da Hb A, padrão semelhante ao visualizado para o morfotipo 1.

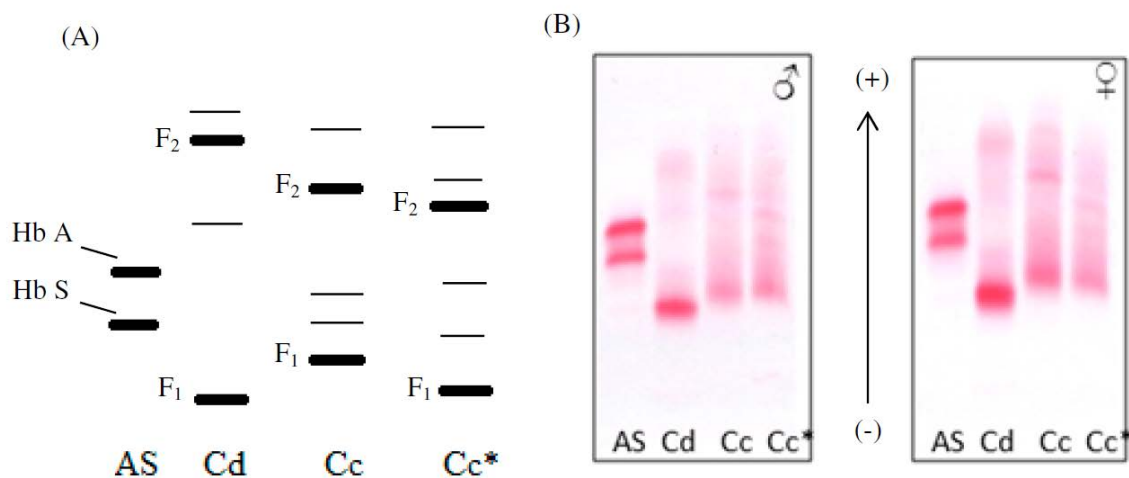


Figura 1. Eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino em acetato de celulose. (A) Modelo com a representação dos padrões de corrida eletroforética para padrão humano AS, *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e morfotipo 1 (B) Fitas de acetato de celulose mostrando os padrões de corrida eletroforética para o padrão humano AS e espécimes machos e fêmeas de *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e morfotipo 1. AS - Padrão heterozigoto para anemia falciforme; Cd - *C. denticulatus*; Cc - *C. carbonarius*; Cc* - Morfotipo 1.

Para *C. denticulatus*, a eletroforese em pH ácido em gel àgar-fosfato, apontou duas frações majoritárias, ambas acima da posição Hb S, estando uma delas (F₁), localizada na posição da Hb A e a outra, acima dessa fração (F₂). Em *C. carbonarius*, observamos também, duas frações majoritárias, sendo que a fração F₁ encontra-se localizada similar à posição da Hb S e a fração F₂, um pouco acima da posição da Hb A. Para o morfotipo 1, notamos a presença de duas frações majoritárias, similares ao perfil de *C. carbonarius* (Figura 2).

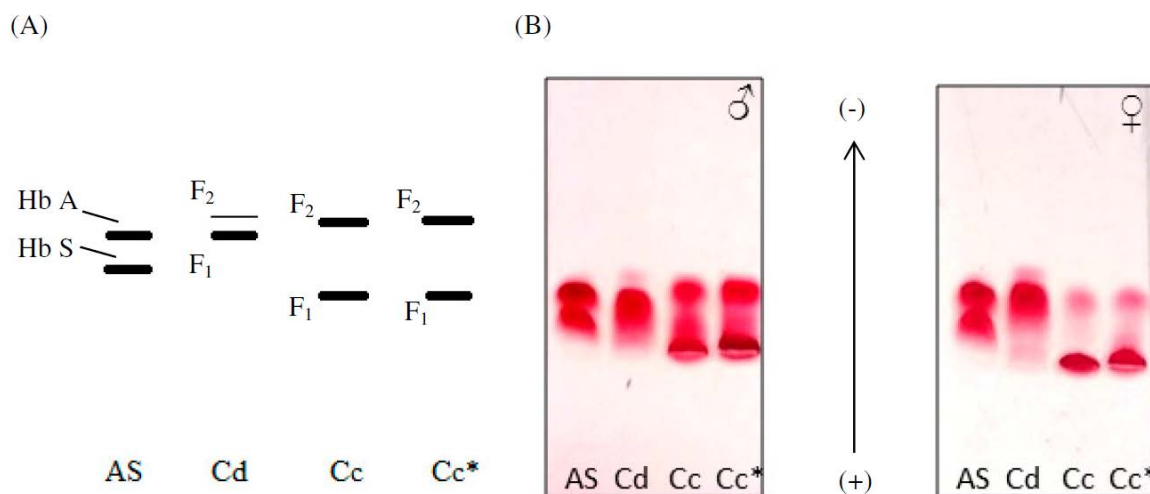


Figura 2. Eletroforese de hemoglobinas em pH ácido em gel de Ágar-fosfato. (A) Modelo com a representação dos padrões de corrida eletroforética para padrão humano AS, *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e Morfotipo 1 (B) Padrões de corrida eletroforética para o padrão humano AS e espécimes machos e fêmeas de *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e morfotipo 1. Cd - *C. denticulatus*; Cc - *C. carbonarius*; Cc* - Morfotipo 1. Fonte: Elaborado pelo autor.

O perfil cromatográfico de *C. denticulatus* apresentou quatro picos, sendo um pico majoritário e três picos menores, enquanto que para *C. carbonarius* e o morfotipo 1, observamos perfis cromatográficos semelhantes, compostos por cinco picos, um majoritário e quatro minoritários. Pode-se verificar que a fração majoritária de *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e do morfotipo possuem intervalo de tempo de retenção de 4.5 a 5.5 minutos e valor percentual de 68,4%, 60,4% e 54,2%, respectivamente.

Segundo Melo et al. (2003), *C. denticulatus* e *C. carbonarius* apresentam dois componentes de hemoglobina, HbA e HbD, e em estudos cromatográficos realizados com *Geochelone gigantea*, dois picos foram detectados, sendo o componente majoritário representado pela HbA, e o minoritário pela HbD (SHISHIKURA; TAKAMI, 2001). Acreditamos que os componentes majoritários e minoritários correspondam ao perfil observado pelos pesquisadores, no entanto, com resolutividade maior, devido ao refinamento das metodologias aplicadas no presente estudo.

Apesar de a literatura nos informar que *C. denticulatus* e *C. carbonarius* possuem dois componentes de hemoglobinas, é evidente a diferença do perfil cromatográfico das duas espécies (**Figura 3 A e B**), podendo essa diferença ser devido a alguma característica da molécula de hemoglobina, como carga elétrica, tamanho e afinidade de

ligação das proteínas, resultando em um comportamento cromatográfico diferente para as espécies (NELSON; COX, 2011).

A semelhança dos perfis cromatográficos de *C. carbonarius* e do morfotipo 1 sugere alto grau de conservação desta proteína funcional, e pode ser justificada devido ao alto grau de conservação das hemoglobinas em vertebrados, evidenciado pelo uso da mesma como objeto de estudos evolutivos em vertebrados (PETRUZZELLI et al., 1996).

A diferenciação obtida por meio do perfil cromatográfico entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1 em relação a *C. denticulatus*, valida a técnica como método adicional para elucidação de questões taxonômicas em Testudinidae. A utilização de ferramentas adicionais à taxonomia do grupo, permite melhor caracterização de espécies e populações, viabilizando a identificação de possíveis unidades de significância evolutiva. Além das vantagens supracitadas, destacamos a resolução para diferenciação do perfil de hemoglobinas em espécies de jabutis, além do baixo custo e rapidez, quando comparadas com técnicas de biologia molecular.

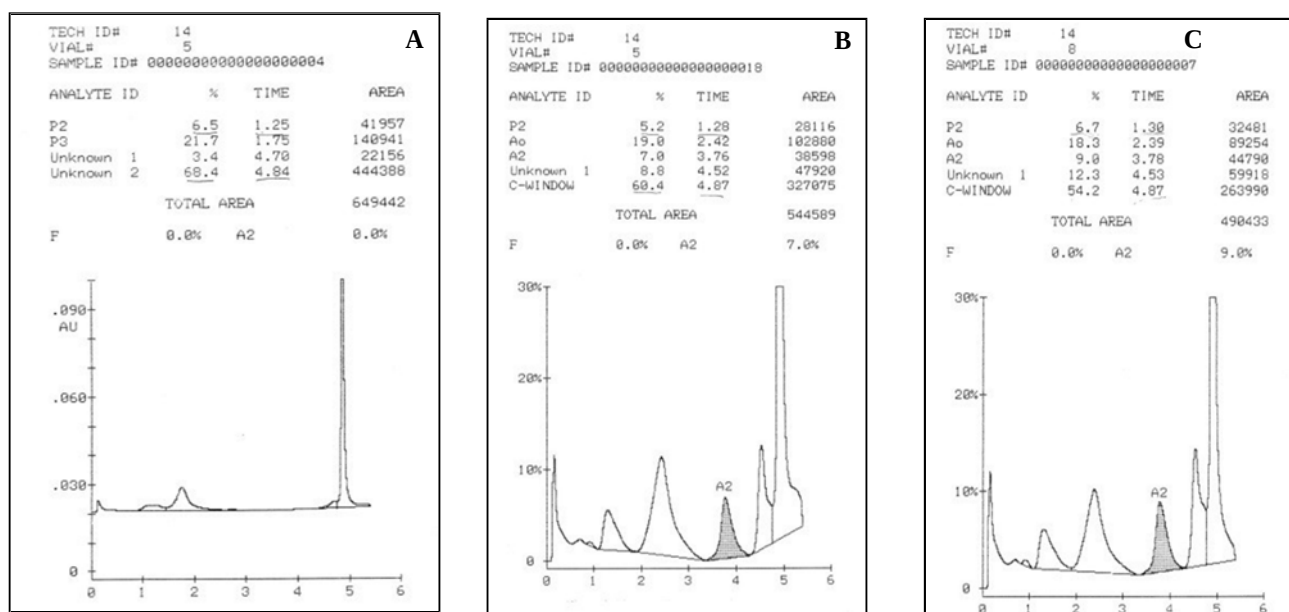


Figura 3. Foto de Cromatograma com perfil de Hb, obtido a partir de amostras de sangue total. A) *C. denticulatus* B) *C. carbonarius* e C) Morfotipo 1, evidenciando os padrões dos picos de cada grupo. Equipamento utilizado - HPLC - VARIANT (BIORAD), com colunas de troca iônica e sistema de tampões fosfato.

Com o intuito de verificar quais os componentes de globina estão envolvidos na formação das moléculas funcionais, realizamos eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH ácido, e o perfil eletroforético dos três grupos apresentou vários padrões de globinas, sendo três frações majoritárias (identificadas como F₁, F₂ e F₃) e três subfrações menores (**Figura 4**). As duas subfrações, localizadas na porção superior do gel de poliacrilamida, mostraram-se mais evidentes em *C. carbonarius* e no morfotipo 1, quando comparadas ao perfil de *C. denticulatus*. Em relação ao padrão para o padrão (Hb AS), as frações e subfrações dos três grupos migraram acima da posição da cadeia α^A , sendo a fração identificada por F₃, com migração similar a da cadeia beta^A. Não observamos distinção no perfil de hemoglobinas entre machos e fêmeas de *C. carbonarius* e o morfotipo 1, apenas para *C. denticulatus*, entretanto, como não há qualquer referência na literatura que discuta os fatores associados a essa diferença encontrada, esses resultados deverão ser melhor investigados.

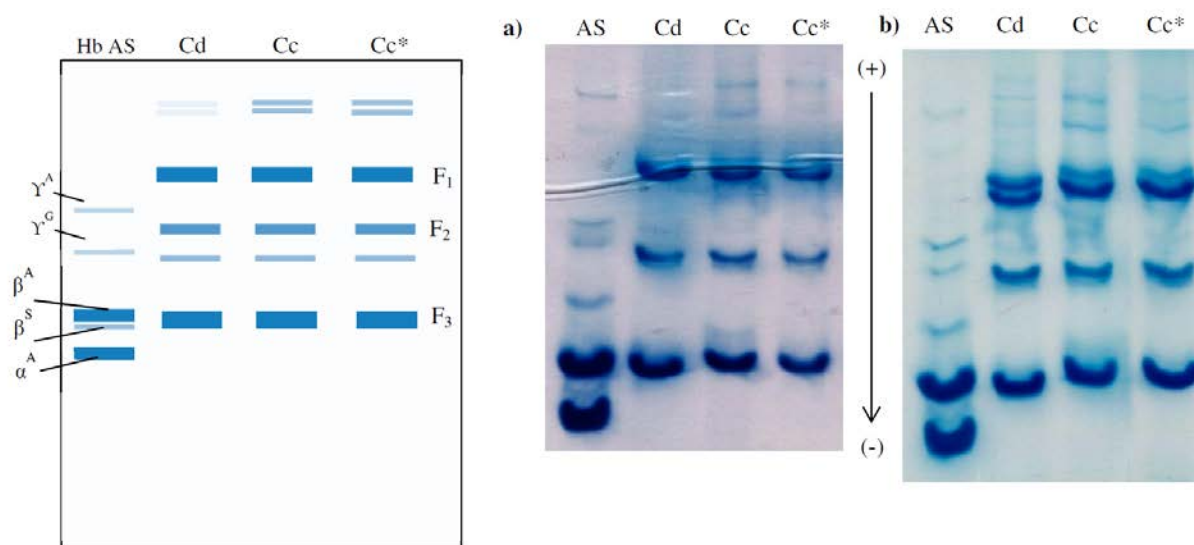


Figura 4. Representação esquemática e fotos dos géis de eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH ácido. a) Fêmeas, b) Machos. Padrão Hb AS Humana. Cd - *C. denticulatus*; Cc - *C. carbonarius*; Cc* - Morfotipo 1.

No perfil eletroforético em pH alcalino, para as duas espécies e para o morfotipo, as cadeias globínicas migraram formando duas bandas (**Figura 5**), sendo a banda superior posicionada acima da posição da cadeia β^A do controle, e a banda inferior posiciona entre α^A e β^A do controle. As bandas de *C. denticulatus* apresentaram-se mais definidas entre si em comparação com os demais grupos; a banda inferior de *C. carbonarius* mostrou ser a

fração majoritária, enquanto que para o morfotipo, a banda superior apresentou-se como a banda majoritária.

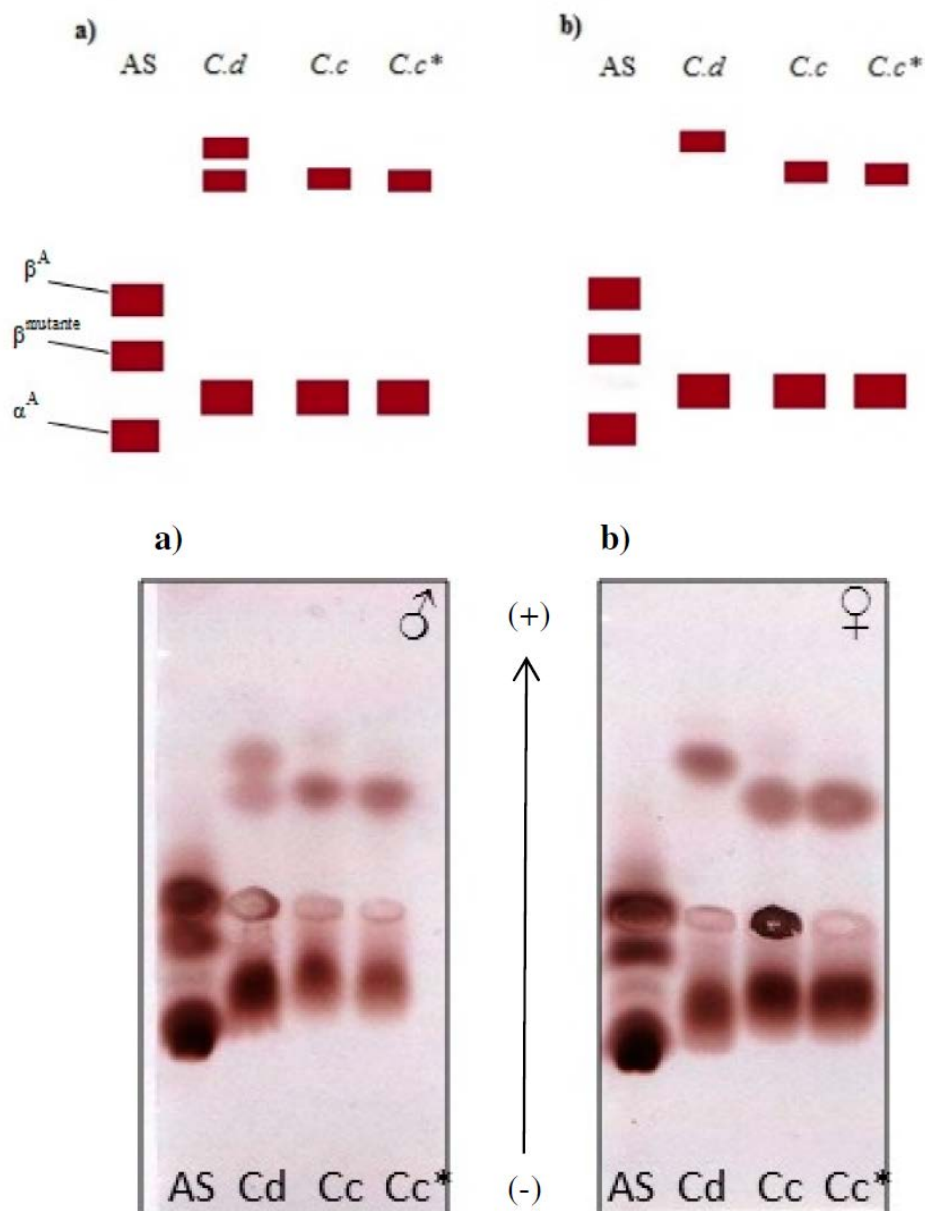


Figura 5. Esquema e fotos das fitas de eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH alcalino. a) Machos, b) Fêmeas. Padrão Hb AS Humana. Cd - *C. denticulatus*; Cc - *C. carbonarius*; Cc* - Morfotipo 1.

Espécimes machos de *C. denticulatus* apresentaram uma banda adicional, quando comparado às fêmeas da mesma espécie, localizada abaixo da banda superior. Essa diferença entre machos e fêmeas para o padrão de migração de uma globina específica deverá ser melhor investigado para reforçar a hipótese de um possível dimorfismo sexual para cadeias globínicas nessa espécie.

Répteis possuem dois ou mais componentes principais de Hb e outros componentes menores com mobilidade diferente. Em *C. carbonarius* e *C. denticulatus*, são conhecidas as Hb A, composta por duas cadeias α^A e duas cadeias β , e Hb D, constituída por duas cadeias α^D e duas β , as quais exibem afinidade intrínseca ao oxigênio e baixa sensibilidade para efeitos alostéricos, na maioria das vezes modulado pela diminuição do pH. As cadeias α^D , também encontradas em aves, cobras e lagartos, são consideradas Hb embrionárias que persistem na fase adulta, conferindo a esses animais, alta capacidade de captação de oxigênio (FUSHITANI et al., 1996; MELO et al., 2003; RÜCKNAGEL et al., 1984; RÜCKNAGEL; BRAUNITZER, 1988).

O estabelecimento do perfil hemoglobínico das espécies *C. denticulatus*, *C. carbonarius*, e do morfotipo 1, possibilitou a observação de diferenças na motilidade das hemoglobinas entre as espécies *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, duas espécies conhecidamente distintas, o que demonstra que a técnica utilizada nesse estudo pode ser utilizada para estudos de filogenia, em conjunto com outras metodologias. Os resultados aqui demonstrados são inéditos na literatura, e, por isso, contribuem para maior conhecimento sobre as espécies abordadas.

Conclusões

O perfil cromatográfico e eletroforético de *C. carbonarius* e do morfotipo 1 mostraram-se semelhantes entre si, indicando que, em relação ao perfil hemoglobínico, o morfotipo 1 apresenta um ancestral comum a *C. carbonarius*. O perfil cromatográfico de *C. denticulatus* mostrou ser diferente dos outros grupos, indicando que tal metodologia apresenta potencial como ferramenta em estudos taxonômicos. A migração das globinas de *C. denticulatus* difere entre machos e fêmeas, indicando possível dimorfismo sexual.

A cromatografia líquida de alta performance evidenciou diferentes tempos de retenção nas frações de globina de *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, mas não entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1.

Capítulo 6

9. Capítulo 6. Análise Molecular de um Fragmento do Gene *citocromo b* em Testudinidae Brasileiros

Resumo

Os alinhamentos realizados permitiram observar certo grau de homogeneidade entre as amostras sequenciadas de *C. denticulatus* e as sequencias disponíveis na literatura, indicando baixa variabilidade genética em relação a esse fragmento para a espécie. Em relação a *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2, as amostras sequenciadas diferiram daquelas disponíveis nos bancos de dados, indicando estrutura genética mais variável, possivelmente devido ao fato de que não se consideram divisões taxonômicas dentro de *C. carbonarius*. A análise filogenética utilizada, não apresentou sinal filogenético efetivo para a diferenciação de *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2, mas os diferenciou de *C. denticulatus*, indicando que a diferenciação de *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2, se deu posteriormente a separação de *C. denticulatus* e *C. carbonarius*. A politomia observada para *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2 não é excludente à hipótese de que representam espécies distintas, muitos problemas têm sido identificados no uso do gene *citocromo b* em análises filogenéticas, dentre os quais está a composição de bases, a taxa de variação entre linhagens, a saturação na terceira base do códon e a limitada variação nas primeiras e segundas bases do códon, resultando em pouca informação para problemas evolutivos, e poucos sítios informativos na terceira posição do códon no nível populacional. O uso do *citocromo b* como parâmetro de análise taxonomica se justifica pela presença de regiões conservadas e variáveis, as quais contem sinais que podem ser utilizados em análises filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos. No entanto, o fragmento utilizado no presente estudo não apresentou sinal filogenético satisfatório, permitindo apenas a observação da monofilia do gênero *Chelonoidis*, e a clara diferenciação da espécie *C. denticulatus* em relação a *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2. É possível que a inclusão de dados morfológicos, comportamentais e de perfil de hemoglobinas em uma matriz mista com os dados moleculares, permita a separação dos morfotipos 1 e 2 como espécies monofiléticas, resolvendo a politomia apresentada. Entretanto, para a realização dessa análise, será necessário a obtenção desses dados para grupos externos, o que permitirá análises filogenéticas mais robustas, que permitiram maior resolução taxonômica ao estudo.

Palavras Chave: Testudines, *citocromo b*, *Chelonoidis*, filogenia.

Introdução

A Floresta Tropical Amazônica foi fragmentada em meados do Pleistoceno, abrindo um corredor central de colonização em habitats de floresta seca ou cerrado, sugerindo que flutuações climáticas e de vegetação desempenharam importante papel na formação da biodiversidade da América do Sul, nas regiões mais próximas aos trópicos (VARGAS-RAMÍREZ; MARAN; FRITZ, 2010).

A Floresta Amazônica contínua permitiu o fluxo gênico entre os espécimes de *C. denticulatus*, estabelecendo populações geneticamente homogêneas. Já, a espécie *C. carbonarius*, por preferir áreas abertas, como, por exemplo, de cerrado, evoluiu por processo vicariante, resultando em grupos com estrutura genética distinta. Essa diversidade foi moldada pela dispersão ocorrida após a redução nas florestas tropicais e subsequente vicariância causada pela reexpansão florestal, levando à fragmentação de populações em ilhas de caatinga. Tais fatos sugerem forte correlação entre o habitat e diferenciação filogeográfica nessas espécies (VARGAS-RAMÍREZ; MARAN; FRITZ, 2010).

Estudos em genética populacional de *C. carbonarius* e *C. denticulatus* relatam haplótipos de DNA mitocondrial de *C. denticulatus* em quatro indivíduos de *C. carbonarius*, com coloração e tamanho diferentes do padrão da espécie. Essas características sugerem a presença dos haplótipos como resultado de polimorfismo ancestral mantido na população, durante a separação destas espécies (FARIAS et al., 2007; JEROZOLIMSKI, 2005).

Métodos de estudo moleculares são eficazes para reconstrução filogenética e têm sido empregados em abordagens evolutivas, tais como nos estudos de fluxo gênico, especiação, sistemática e estrutura de populações (AVISE, 1994). A mitocôndria, com seu genoma próprio e fracamente envolvido com o genoma nuclear (ATTARDI, 1985), mostra evolução de algumas regiões de 1 a 10 vezes mais rápida do que a do DNA nuclear (NEDBAL; FLYNN, 1998). Essa característica permite sua utilização como marcador molecular em estudos de microevolução (AVISE, 2000). O tamanho reduzido, a ocorrência de múltiplas cópias dentro das células e o fácil isolamento são apenas algumas das vantagens para o uso do genoma mitocondrial em estudos filogenéticos. Destaca-se também, a herança materna com ausência ou frequência mínima de recombinação, tornando mais diretas as reconstruções filogenéticas, e a extensiva variação intraespecífica, geralmente relacionada às simples

substituições de bases com algumas, geralmente pequenas, inserções ou deleções (AVISE et al., 1987).

O *citocromo b* é considerado um excelente marcador, amplamente usado como ferramenta em filogenias moleculares e é provavelmente o gene mitocondrial melhor conhecido em relação à estrutura e função de seu produto protéico (ESPOSTI et al., 1993).

Ao contrário da região controle, sequências do *citocromo b*, por sua conservação e raras inserções ou deleções, são facilmente alinháveis, mesmo entre espécies às vezes muito distantes. Com o advento da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* ou PCR) (SAIKI et al., 1988) e o aumento da disponibilidade de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para mtDNA (KOCHER et al., 1989; TTWG, 2007b), o sequenciamento tem sido cada vez mais a técnica predominante nesses estudos, permitindo acesso à variação genética no nível do DNA de forma rápida e direta. Atualmente, encontra-se grande volume de dados na literatura e em bancos de dados, facilitando a comparação de resultados entre espécies (CRAWFORD et al., 2014; KVIST, 2000). Assim, considerando a ampla utilização desse gene de mtDNA, e a disponibilidade do mesmo em bancos de dados referentes às espécies em estudo, foi selecionado o gene mitocondrial *citocromo b* como o marcador molecular a ser utilizado.

A Filogeografia estuda os princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens, pois associa a biogeografia, a genética populacional e a filogenia molecular, no estudo dos polimorfismos de genes em populações de uma espécie ou entre espécies próximas (AVISE, 1998). Estudos de filogeografia comparativa têm sido valiosos para o desenvolvimento e teste de hipóteses sobre processos evolutivos históricos com impacto na composição da biodiversidade atual, relacionando-a com a biogeografia, principalmente por meio das diferenças entre sequências de DNA (AVISE, 2000). Análises de padrões filogeográficos intraespecíficos conduzem a observação de barreiras e estruturas físicas, levando a um maior avanço no conhecimento dos processos biogeográficos históricos (EIZIRIK, 2001).

Apesar da filogeografia ter sido usada comumente como ferramenta para esclarecer padrões históricos e evolutivos entre populações de uma espécie, as aproximações filogeográficas também podem ser úteis em conjunto com estudos genéticos populacionais,

para inferir processos demográficos históricos como fluxo gênico, tamanho efetivo populacional, sequências de colonização, gargalos de garrafa e também para determinar os limites entre espécies e identificar unidades de significância evolutiva (AVISE et al., 1987; AVISE, 2000, 2009; FREELAND, 2005; VAZQUEZ; DOMINGUEZ, 2002, 2007).

A literatura tem indicado a utilização de metodologias diversas em associação, na elucidação de questões taxonômicas em quelônios, não só para a descrição de novas espécies, mas também em estudos sobre diversidade e distribuição morfológica e genética desses animais (PADIAL et al., 2010; PARHAM et al., 2006). Grupos de quelônios com distinção morfológica são muitas vezes reconhecidos como espécies, pois tais dados fornecem evidências de linhagens evolutivas independentes (STUART; PARHAM, 2004). Por outro lado, incongruências nesses aspectos argumentam contra o reconhecimento de novas espécies apenas com um único conjunto de dados, sejam eles moleculares, morfológicos, comportamentais ou bioquímicos (PARHAM et al., 2006).

Apesar do extenso uso de filogenias baseadas no uso de mtDNA para a reconstrução de padrões filogeográficos (AVISE, 2000), poucos estudos em filogeografia tem utilizado tais metodologias para os Testudinidae Brasileiros.

Este capítulo teve por o objetivo, analisar um fragmento de DNA mitocondrial (mtDNA), utilizando como parâmetro de análise o gene *citocromo b*, por meio de análise comparativa, no intuito de explorar o potencial discriminativo da variabilidade genética no gênero *Chelonoidis*.

Materiais e Métodos

Inicialmente testou-se metodologias para extração de DNA a partir de materiais conservados em Museus, tais como ossos e pele; entretanto, tais metodologias não apresentaram resultados significantes, pois o *status* de preservação das amostras era inadequado, resultando em amostras de DNA pouco concentradas e altamente fragmentadas, impossibilitando sua utilização para a amplificação do fragmento do gene mitocondrial *citocromo b*.

Para resolver esse viés de amostragem, foram utilizados dados morfológicos, coloração e escudação do crânio como referência, e os animais dos zoológicos, foram classificados como *C. carbonarius*, *C. denticulatus*, morfotipo 1 ou 2 por meio de análises estatísticas de variância e multivariadas (Análise de fatores e análise de componentes principais). Apenas os animais que apresentaram valores estatísticos similares as medidas observadas nas amostragens em museus foram selecionados para amostragem de DNA.

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas a partir de sangue periférico de 5 casais de *C. carbonarius*, *C. denticulatus* e dos morfotipos 1 e 2, coletadas nos Zoológicos Municipais de São José do Rio Preto e Araçatuba - SP. De cada espécime, foi coletado aproximadamente 2 mL de sangue, por meio da veia marginocostal, conforme descrito por Silva e colaboradores (2012). As amostras foram mantidas refrigeradas até o momento da extração de DNA, não excedendo 24 horas.

Para a obtenção do DNA, utilizou-se o protocolo para extração pelo método de Fenol - Clorofórmio (SAMBROOK, 1989), com alteração no volume de sangue total (400 µL) utilizado.

As amostras foram estocadas a -20° C, e a partir destas, foram obtidas as soluções de trabalho nas concentrações desejadas para cada teste de amplificação. Este banco de DNA foi utilizado ao longo do projeto, e será utilizado posteriormente para outros projetos do Centro de Estudos de Quelônios.

Desenho dos Oligonucleotídeos Iniciadores (*primers*)

O desenho dos *primers* é uma etapa essencial na execução de projetos que envolvam biologia molecular, uma vez que problemas na escolha de pares *primers* inviabilizam todo o projeto, ou geram resultados não relacionados à pergunta científica envolvida. Esta etapa do trabalho requer conhecimento prévio da sequência de DNA de interesse, da região onde o mesmo deve se anelar, do tamanho de fragmento que será gerado e do grau de conservação da região na qual os *primers* irão se anelar.

Para a obtenção dos pares *primers*, inicialmente realizou-se um levantamento na literatura de possíveis sequências a serem utilizadas; porém, nenhuma delas apresentou

resultados satisfatórios quando testados *in silico* com sequências disponíveis em bancos de dados (NCBI). Dessa forma, fez-se necessário o desenho de pares *primers* a partir das sequências de fragmentos do *citocromo b*, disponíveis no GenBank.

O desenho dos pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para fragmentos do gene do *citocromo b* para o gênero *Chelonoidis* foi dividido em quatro fases: busca e escolha das sequências de interesse em bancos de dados; alinhamento das sequências com identificação, seleção da sequência consenso mais conservada e teste *in silico* dos pares de *primers* (GARCÊS; LIMA, 2004).

Foram obtidas sequências de DNA mitocondrial das espécies *Chelonoidis carbonarius* ([EF490394.1](#), [EF490392.1](#), [EF490390.1](#), [EF490388.1](#), [EF490386.1](#), [EF490395.1](#), [EF490393.1](#), [EF490391.1](#), [EF490389.1](#), [EF490387.1](#)) e *Chelonoidis denticulatus* ([EF490400.1](#), [EF490398.1](#), [EF490396.1](#), [EF490401.1](#), [EF490399.1](#), [EF490397.1](#)), disponíveis no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), e posteriormente armazenadas no formato FASTA. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando-se do programa *ClustalW* (HIGGINS et al., 1994), por meio do pacote *BioEdit Sequence Alignment Editor* v.7.0. 5.3 (HALL, 2001).

Após a realização dos alinhamentos, verificou-se a presença de regiões consenso entre as duas espécies, e essas regiões foram selecionadas como locais ideais para o desenho dos pares de *primers*, uma vez que, sendo conservadas, aumentam significativamente a chance de amplificar a sequência de interesse nas duas espécies em estudo, e nos morfotipos avaliados.

Em seguida, uma sequência do fragmento do *citocromo b* de *C. carbonarius* foi submetido ao *software* livre PRIMER 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), no intuito de obter pares de *primers* dentro dos parâmetros ideais de temperatura de anelamento e concentrações ideais de pares de base.

Optou-se por fragmentos menores que 1 kb, pois a maioria dos sequenciadores apresenta um comprimento de leitura abaixo deste tamanho, ou quando o fazem, geram muito ruído de fundo, perdendo informações nas extremidades. O produto gerado a partir do PRIMER 3 foi de 967 pb, o que ainda poderia causar perda de informações das extremidades quando sequenciado, e considerando que as regiões mais informativas do *citocromo b* não

são conhecidas, optou-se por desenhar dois pares de *primers*, um interno e um externo, conforme descrito abaixo:

Sequência de *C. carbonarius* utilizada no desenho dos pares de *primers*:

>*Chelonidis carbonarius*

TACGAAAAACCCACCCAATAATTAAGATTATCAACAACATTCATTGACCTGC
CCAGTCCATCCAACATCTCTGCCTGATGAACTTCGGATCACTATTAGGCATCT
GCCTAATCCTACAAACCGTTACCGGAATCTTCCTAGCAATGCACTATTCATCAA
ACATCTCACTGGCATTCTCATCAATCGCCCATATTACCCGAGATGTGCAATACG
GATGACTCATCCGAAATATACATGCTAACGGAGCCTCCATCTTCTTCATATGTA
TCTACCTTCAATCGGCCAGGACTTTACTATGGCTCCTACCTATATAAAGAAA
CCTGAAACACAGGAATTATTATATTACTCCTAGTCATAGCCACCGCATTTCGTAG
GCTACGTCCTACCATGAGGCCAAATATCGTTCTGAGGTGCTACCGTCATCACCA
ACCTACTTTTCAGCCATTCCCTACATCGGCAACACCCTAGTACAATGAATCTGAG
GAGGTTTCTCAGTAGACAACGCCACCCTGACCCGCTTCTTTACCTTCCATTTCCT
ACTACCCTTCACCATCATAGGACTAGCAATCGTACACCTACTCTTCCTCCACGA
GACAGGATCAAACAACCCAACAGGATTAAACTCAAACACCGATAAAATTCCCT
TCCACCCATACTTCTCCTACAAAGACTTACTAGGACTAACCTTAATACTAACCC
TACTGTAACTCTAACATTATTCTCCCCAAACCTCCTAGGAGATCCAGATAATT
TCACACCAGCCAACCCCTATCAACTCCACCTCATATTAAACCAGAATGATATT
TCCTATTTCGCTACGCAATCCTTCGATCCATCCCAAACAACTAGGAGGCGTAC
TCGCCCTTCTACTCTCCATCCTAGTACTATTCATGATGCCAACCCTACACACATC
AAAACAACGTTCAACTATATTTTCGACCCTTAAACCAAATTCTACTCTGATGCCT
AATAGCTGACCTTCTAATACTCACATGAATTGGAGGCCAACCAGTCGAAAATC
CATTCATTATCATCGGTCAAATAGCCTCTATCCTATACTTCACCATCCTCCTGAT
CCTTATACCCATAGCAGGAATAATTGAAAACAAAATACTAACTTGAAATATT
CTAGTAGCTTAATACTAAAGCATTGGTCTTGTAACCAAACTGA

As regiões sublinhadas correspondem às regiões consenso entre diversas sequências de *C. carbonarius* e *C. denticulatus* depositadas em bancos de dados (NCBI), e que foram utilizadas como alvo para desenho dos pares de *primers*, com a finalidade de facilitar

amplificações cruzadas entre as espécies e morfotipos. Segue abaixo a descrição dos oligonucleotídeos iniciadores descritos neste trabalho:

Primers externos:

CYTB_967_F: 5'-TCCAACATCTCTGCCTGATG-3' - Representado em cinza

CYTB_967_R: 5'-ATGGATTTTTCGACTGGTTGG-3' - Representado em vermelho

Primers internos:

CYTB_750_F: 5'- ACATCGGCCGAGGACTTTAC-3' - Representado em azul

CYTB_227_R: 5'- CGGCCGATGTGAAGGTAG-3' - Representado em verde

Fragmentos do *citocromo b* gerados a partir da utilização dos pares de primers desenhados:

- **967bp** - Gerado a partir da utilização dos *primers* CYTB_967_F e CYTB_967_R.
- **750bp** - Gerado a partir da utilização dos *primers* CYTB_750_F e CYTB_967_R.
- **227bp** - Gerado a partir da utilização dos *primers* CYTB_967_F e CYTB_227_R.

***bp: pares de base (*base pairs*)**

As amostras obtidas foram enviadas para sequenciamento, sendo amplificados os fragmentos de 750 e de 227 pb, e posteriormente os mesmos tiveram sua qualidade avaliada pelo programa PHRED/PHRAP/CONSED (GORDON et al., 1998) e, posteriormente, as fitas sense e anti-sense foram alinhadas utilizando o programa CLUSTALW, por meio do pacote *BioEdit*.

Padronização da Amplificação de Fragmentos do *citocromo b* (967bp, 752bp e 227bp).

O *citocromo b* é considerado o gene mais conservado do genoma mitocondrial, e por sua conservação e raras inserções ou deleções, são facilmente alinháveis, mesmo entre espécies às vezes muito distantes. Essas características, associadas à crescente

disponibilização de sequencias deste gene em bancos de dados, têm levado à utilização do *citocromo b* em estudos filogenéticos.

Desta forma, este trabalho incluiu a padronização das condições ideais de amplificação de fragmentos do *citocromo b* (967 pb, 750 pb e 227 pb), por meio da técnica de reação da cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR), no intuito de obter marcadores moleculares que possam ser utilizados na identificação das espécies *C. carbonarius*, *C. denticulatus* e de morfotipo 1 e 2. Os dados obtidos a partir desta metodologia poderão, associados aos dados morfológicos e biogeográficos, gerar informações que auxiliarão na elucidação dos problemas taxonômicos nos Testudines brasileiros.

Para os testes iniciais de amplificação, utilizaram-se apenas as amostras de DNA de *C. denticulatus*. Inicialmente testou se a amplificação *in vitro* baseando-se no protocolo abaixo descrito:

Para 1 amostra		
Água Mili-Q	4,95	µL
Tampão da Taq 10x	1	µL
DNTPs (5 mM)	1	µL
Primer F (10 mM)	1	µL
Primer R (10 mM)	1	µL
MgCl ₂ (3mM)	0,6	µL
Taq <i>Platinum</i> (5U/µL)	0,2	µL
DNA (200 ng/ µL)	0,25	µL
Volume Total	10	µL

Para a confirmação *in vitro* da eficiência dos pares *primers* na amplificação dos fragmentos de 967 pb, 750 pb e 227 pb, utilizamos nesse teste a concentração de 3mM de MgCl₂, o que potencializa a atuação da Taq polimerase, e facilita amplificação dos fragmentos de interesse. As amplificações foram realizadas utilizando-se de um termociclador (Axygen - Maxygene).

No intuito de melhorar a amplificação e reduzir as amplificações inespecíficas, testou-se a redução da concentração de MgCl₂ para 2mM.

Analisando-se os géis, observou-se a redução do número de bandas inespecíficas e de dímeros de *primers*, em todos os fragmentos, principalmente nas temperaturas mais elevadas do gradiente (**Figuras 1 e 2**).

Para 1 amostra		
Água Mili-Q	5,55	μL
Tampão da Taq 10x	1	μL
DNTPs (5 mM)	1	μL
Primer F (10 mM)	0,8	μL
Primer R (10 mM)	0,8	μL
MgCl ₂ (3mM)	0,4	μL
Taq <i>Platinum</i> (5U/μL)	0,2	μL
DNA (200 ng/ μL)	0,25	μL
Volume Total	10	μL

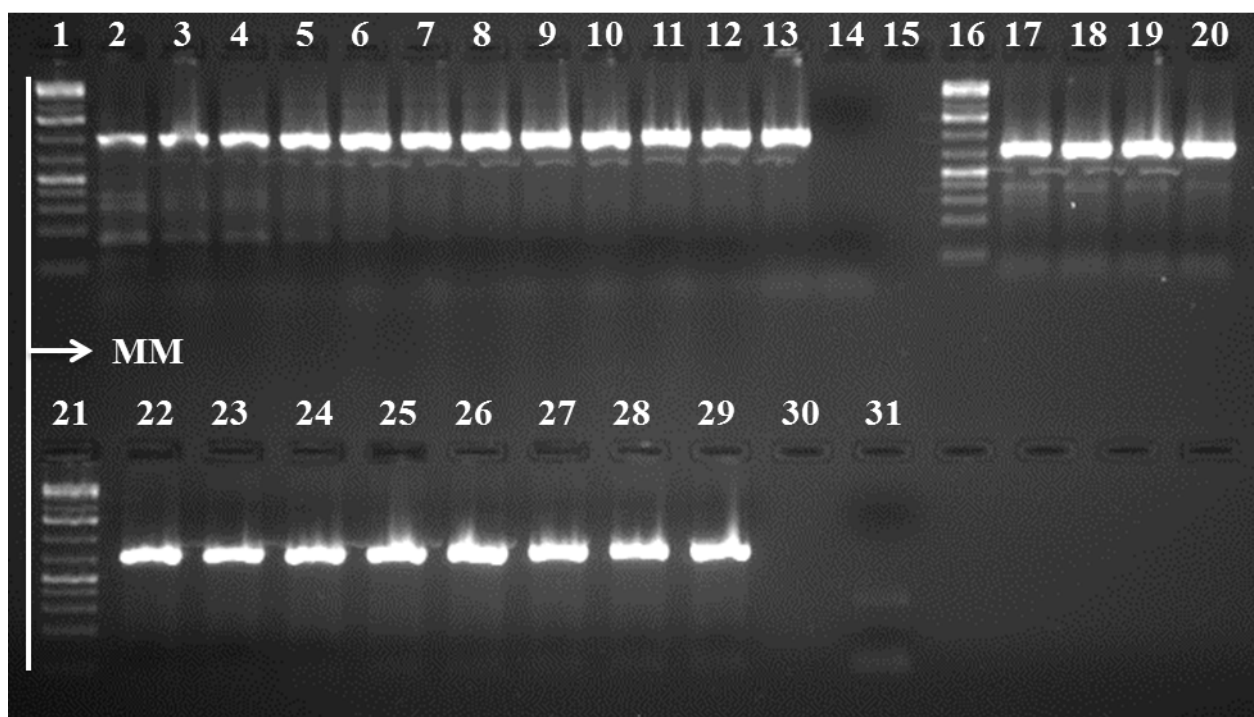


Figura 1. Foto degel de agarose à 2% referente à amplificação do fragmento de 967 e 750 pb do *citocromo b* utilizando amostras de *C. denticulatus*. Os poços 2 ao 13 referem-se às amplificações do fragmento de 967 pb. Os poços 17 ao 29 referem-se às amplificações do fragmento de 750 pb. Os poços 14 e 31 referem-se ao controle das reações. **MM:** marcador molecular 1Kb (Poços 1, 16 e 21).

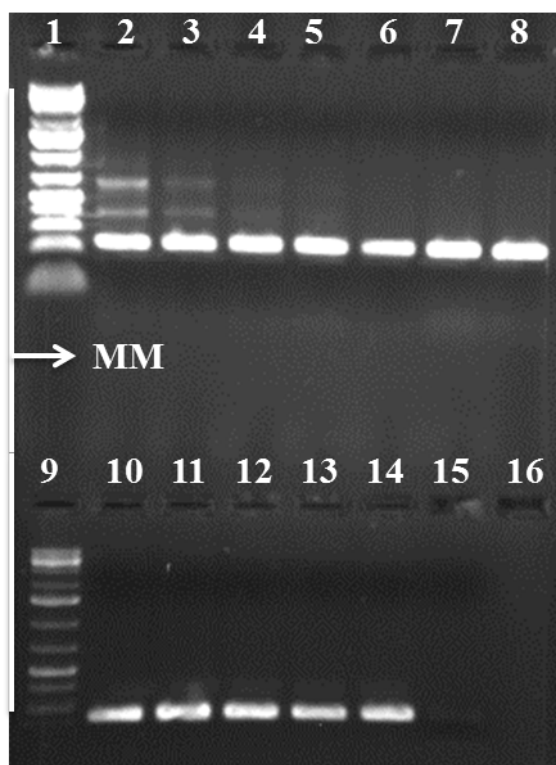


Figura 2. Foto de gel de agarose à 2% referente à amplificação do fragmento de 227 pb do *citocromo b* utilizando amostras de *C. denticulatus*. Os poços 2 a 14 referem-se às às amplificações do fragmento de 227 pb. O poço 16 refere-se ao controle das reações. **MM:** marcador molecular 1 Kb (poço 1).

Os melhores resultados para todos os grupos foram observados nas temperaturas de anelamento entre 64 e 65° C.

Com a padronização da amplificação dos fragmentos do *citocromo b* concluída para a espécie *C. denticulatus*, testou-se os mesmos protocolos para a espécie *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2, e todos os grupos apresentaram resultados satisfatórios.

A partir da padronização obtida, foi realizado o preparo das amostras e envio das mesmas para sequenciamento. Os resultados preliminares obtidos a partir de amostras de *C. denticulatus* indicaram troca de quatro bases em relação à fita consenso no fragmento de 750 pb (**Figura 3**).

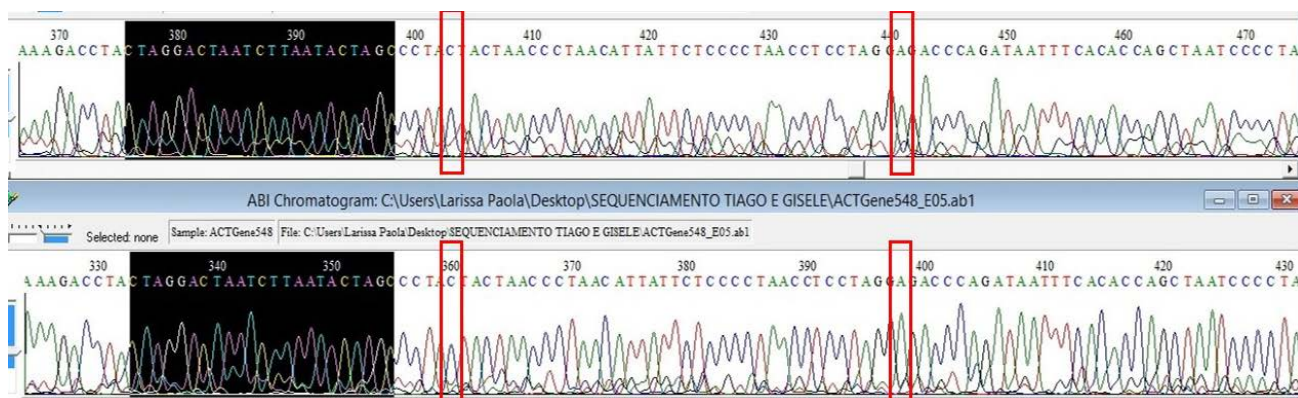


Figura 3. Resultado do sequenciamento do fragmento de 750 pb do *citocromo b* utilizando amostras de *C. denticulatus*, evidenciando a troca de quatro bases em relação à fita consenso.

Foram encontradas dificuldades técnicas referentes ao sequenciamento das amostras, uma vez que o laboratório terceirizado para o serviço, apresentou por duas vezes, problemas técnicos com os sequenciadores, e por duas vezes, as amostras sequenciadas enviadas pela empresa não estavam satisfatórias, necessitando o reenvio das mesmas. Após a obtenção e verificação dos fragmentos de mtDNA sequenciados, não foi possível utilizar as amostras de 750 pares de base, pois as mesmas não apresentaram boa qualidade, impossibilitando os alinhamentos dos fragmentos entre os grupos avaliados. Dessa forma, as análises foram realizadas com os fragmentos de 227 pares de bases.

As relações filogenéticas construídas sob o critério de máxima verossimilhança foram estimadas utilizando-se o programa *Treefinder* (JOBB, 2008), com robustez de 1000 pseudoréplicas não paramétricas de *bootstrap*. Além das sequências obtidas neste trabalho também foram utilizadas sequências de *Cyclemys oldhamii* (GRAY, 1863) depositadas no (NCBI), e utilizadas como grupo externo para enraizamento da filogenia.

Resultados e Discussão

Os alinhamentos realizados permitiram observar certo grau de homogeneidade entre as amostras sequenciadas de *C. denticulatus* e as sequências disponíveis na literatura, indicando baixa variabilidade genética em relação a esse fragmento para a espécie. Em relação a *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2, as amostras sequenciadas diferiram daquelas disponíveis nos bancos de dados, indicando estrutura genética mais variável, possivelmente

devido ao fato de que não se consideram divisões taxonômicas dentro de *C. carbonarius* (**Apêndice A**). Esses dados reforçam a necessidade de se entender como esse grupo está distribuído ao longo do território brasileiro, evidenciando e caracterizando-os com base em estudos multidisciplinares. Essas observações são condizentes com a literatura, que sugere forte correlação entre o habitat e diferenciação filogeográfica nessas espécies (VARGAS-RAMÍREZ; MARAN; FRITZ, 2010).

A análise filogenética utilizada, não apresentou sinal filogenético efetivo para a diferenciação de *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2, mas os diferenciou de *C. denticulatus*, indicando que a diferenciação de *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2, se deu posteriormente a separação de *C. denticulatus* e *C. carbonarius* (**Figura 4**).

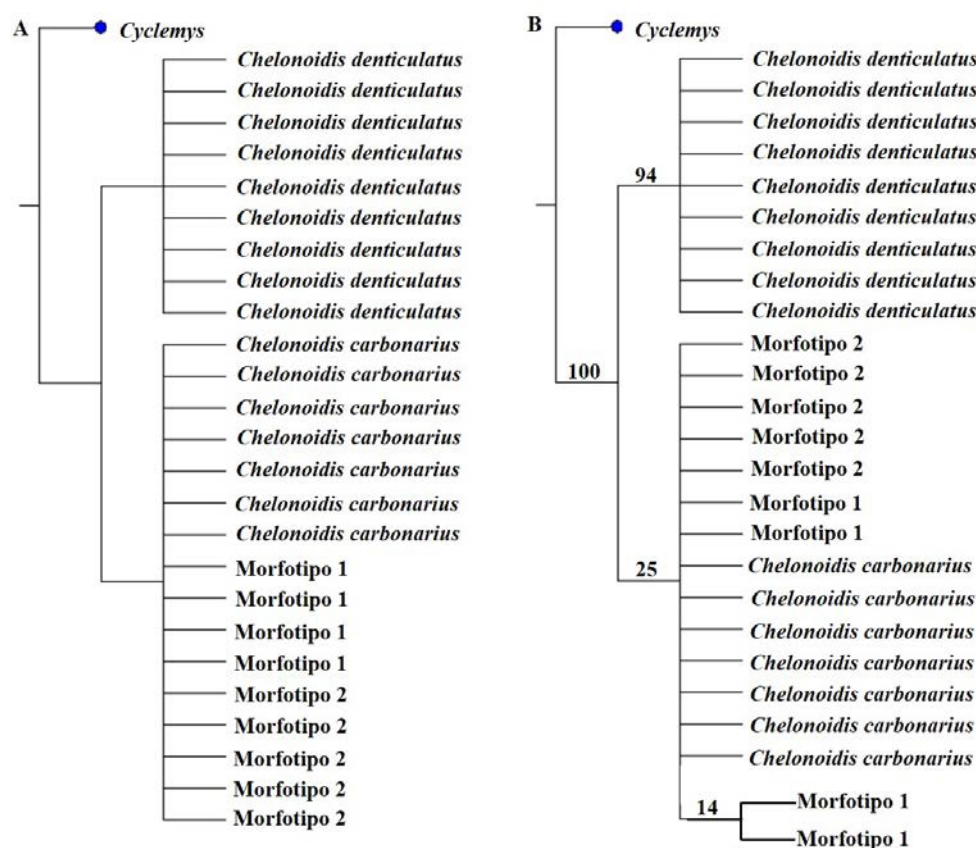


Figura 4. A. Árvore filogenética de um fragmento de mtDNA de 227 pb baseada no método de verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 réplicas não paramétricas de *bootstrap* (41 árvores possíveis, e concatenadas). B. Análise de suporte (Índice de Consistência - 74; Índice de Retenção - 84).

Estimativas do período de divergência entre *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, baseada no sequenciamento de um fragmento de 430 pares de bases do *citocromo b* e assumindo a taxa evolutiva média de 0,4% por milhão de anos, indica que este evento deve ter ocorrido no início do Mioceno, cerca de 22,5 milhões de anos atrás (JEROZOLIMSK, 2005). Desta forma, assim como sugerido para outros táxons da região amazônica (MORITZ et al., 2000), a divergência molecular entre *C. denticulatus* e *C. carbonarius* parece não corroborar com a “Teoria dos Refúgios Pleistocênicos” (HAFFER, 1969), já que estas espécies se diferenciaram em um período anterior ao das flutuações climáticas ocorridas durante esse período do Quaternário. Entretanto, a diferenciação de *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2, provavelmente foram influenciadas por vários ciclos de alterações na extensão e distribuição das principais fisionomias vegetais, associados a oscilações climáticas, que devem ter sido acompanhadas por expansões e retrações de suas populações.

A politomia observada para *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2 indica que são necessários mais dados genéticos para resolver a relação entre os grupos avaliados; contudo, não é excludente à hipótese de que representam espécies distintas. Muitos problemas têm sido identificados no uso do gene *citocromo b* em análises filogenéticas, dentre os quais está a composição de bases, a taxa de variação entre linhagens, a saturação na terceira base do códon e a limitada variação nas primeiras e segundas bases do códon, resultando em pouca informação para problemas evolutivos, e poucos sítios informativos na terceira posição do códon no nível populacional (LOVEJOY; De ARAÚJO, 2000; MEYER, 1993, 1994; ROCHA-OLIVARES et al., 1999; TSIGENOPOULOS; BERREBI, 2000).

O uso do *citocromo b* como parâmetro de análise taxonomica se justifica pela presença de regiões conservadas e variáveis, as quais contêm sinais que podem ser utilizados em análises filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos. No entanto, o fragmento utilizado no presente estudo não apresentou sinal filogenético satisfatório, permitindo apenas a observação da monofilia do gênero *Chelonoidis*, e a clara diferenciação da espécie *C. denticulatus* em relação a *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2. É possível que a inclusão de dados morfológicos, comportamentais e de perfil de hemoglobinas em uma matriz mista com os dados moleculares, permita a separação dos morfotipos 1 e 2 como espécies monofiléticas, resolvendo a politomia apresentada. Entretanto, para a realização dessa análise, será

necessário a obtenção desses dados para grupos externos, o que permitirá análises filogenéticas mais robustas, possibilitando o aumento da resolução taxonômica do estudo.

Conclusões

- A espécie *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2 apresentam maior variabilidade genética em relação ao fragmento do gene *citocromo b*, quando comparados à *C. denticulatus*;
- A análise filogenética utilizada, não apresentou sinal filogenético efetivo para a diferenciação de *C. carbonarius* e dos morfotipos 1 e 2;
- A politomia observada para *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2 não é excludente à hipótese de que representam espécies distintas, uma vez que muitos problemas têm sido identificados no uso do gene *citocromo b* em análises filogenéticas.
- É possível que a inclusão de dados morfológicos, comportamentais e de perfil de hemoglobinas em uma matriz mista, com os dados moleculares, permita a separação dos morfotipos 1 e 2 como espécies monofiléticas.

Discussão Geral

10. Discussão Geral

Esta discussão tem por objetivo, correlacionar os parâmetros avaliados, com finalidade de inferir a história evolutiva, os processos demográficos e históricos que moldaram a diversidade do gênero *Chelonoidis* no Brasil.

Estudos multidisciplinares envolvendo Testudinidae brasileiros são incipientes na literatura, e considerando a problemática envolvendo o grupo, estudos dessa natureza permitem melhor caracterização das populações de jabutis, auxiliando a elucidação de questões taxonômicas, história natural e ações de conservação.

As distribuições geográficas das espécies de *Chelonoidis* brasileiros, disponíveis na literatura, atualmente, refletem, além da distribuição espacial dos registros de ocorrência, deficiências na amostragem em determinadas regiões. Além disso, como não havia até o momento, registros oficiais dos morfotipos 1 e 2 na literatura, parte significativa das amostragens atribuídas a espécie *C. carbonarius* são na verdade, áreas de ocorrências de morfotipos, e não ao padrão típico da espécie. Outro fator relevante que limita o registro real de ocorrências das espécies de *Chelonoidis* no Brasil é a baixa densidade populacional, decorrente de atividade antrópica intensa, como tráfico, poluição industrial, perda de habitats e caça dos ovos e de adultos para consumo. Outro fator que compromete a confiabilidade dos dados de ocorrências de jabutis é a utilização desses como animais de estimação, pois comumente ocorrem solturas de espécimes não endêmicos a região pela população, ou até mesmo pela Polícia Ambiental e IBAMA.

Com base nos dados obtidos pela avaliação dos espécimes depositados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), foi possível referendar a área de ocorrência do morfotipo 1 para o estado do Amazonas. Entretanto, observou-se a ocorrência deste morfotipo também para a região Centro-Oeste, nos estados de Tocantins, Mato Grosso do Sul e Goiás, e na região Norte, também nos estados do Acre e Rondônia. Esses dados apontam o morfotipo 1 como a espécie de jabuti com distribuição geográfica mais ampla.

Nos espécimes avaliados no Museu Paraense “Emílio Goeldi”, observamos animais que diferiam, tanto para o padrão típico da espécie *C. carbonarius*, quanto para o morfotipo 1, sendo então, classificados como morfotipo 2. Porém, o baixo número de animais acima de

25 cm de CCC, não possibilitou a realização de análises estatísticas, apenas inferências biogeográficas, padrão de escudação da região cefálica e coloração. Os dados de distribuição geográfica e segundo comunicação pessoal da Dra. Ana Lúcia da Costa Prudente e sua equipe (Museu Paraense “Emílio Goeldi”), o morfotipo 2 tem ocorrência também no estado do Maranhão e Piauí, mas mesmo ao longo de anos de coletas por toda Amazônia, o grupo de pesquisa nunca encontrou animais como o morfotipo 2 no estado do Amazonas, e nem o morfotipo 1 no estado do Pará. Tais informações sugerem a ocorrência de algum evento de isolamento geográfico durante a separação desses dois grupos, possivelmente relacionado com a formação de refúgios ao longo do Pleistoceno.

A espécie *C. denticulatus* ocorre em todos os estados da Amazônia Legal, além de apresentar registros isolados para o domínio da Floresta Atlântica, nos Estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro, e para a região do Brasil central, nos Estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Na região Nordeste, apresenta ocorrência no estado da Bahia. Entre as hipóteses possíveis para explicar a diferenciação geográfica observada para a espécie, destaca-se a de que os ancestrais das populações de *C. denticulatus* que se estabeleceram no domínio da Mata Atlântica, alcançaram esta região durante um período de maior conectividade com o domínio da floresta Amazônica. Registros palinológicos indicam que a região do Brasil central já foi mais úmida e coberta por florestas tropicais (LEDRU, 1993). A distribuição atual de táxons irmãos de ambientes florestais na Amazônia e na Mata Atlântica, como, por exemplo, espécies de roedores do gênero *Rhipidomys* (COSTA, 2003), também indica a existência de florestas mais extensas, na região em que hoje está o Cerrado, unindo as florestas Amazônica e Atlântica.

O padrão morfológico típico da espécie *C. carbonarius* apresenta ocorrência restrita ao Nordeste do país, entretanto, os principais registros atribuídos à espécie não são válidos, uma vez que, com base nas características morfológicas e de coloração apresentadas, correspondem a morfotipos, e não ao padrão típico da espécie. Nenhuma das coleções herpetológicas visitadas possuíam animais com o padrão típico da espécie, sendo possível o estabelecimento da área de ocorrência da mesma, apenas por meio da análise dos dados disponíveis na literatura, e ainda assim, poucos trabalhos dispõem de descrições detalhadas

e fotos dos animais utilizados, permitindo dessa forma a utilização dessas informações (VINKE et al, 2008).

Foram identificadas regiões de simpatria entre o morfotipo 1 e *C. denticulatus*, nos estados do Amazonas, Acre, Rondônia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Tocantins e Goiás. Apenas no estado da Bahia encontrou-se simpatria entre *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, e para o morfotipo 2, ocorreu simpatria com *C. denticulatus* apenas nos estados do Pará, Maranhão e Piauí. Não foi observado simpatria entre os morfotipos avaliados e *C. carbonarius*, e nem entre os morfotipos 1 e 2, indicando a existência de exclusão competitiva entre os grupos, já que a vegetação e rios não representam barreiras geográficas que explique a atual distribuição dos grupos.

A avaliação das características físicas das vocalizações demonstrou ser eficiente como parâmetro taxonômico, uma vez que apresentou diferenças estatisticamente significativas entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1. As diferenças observadas indicam possíveis mecanismos de isolamento reprodutivo entre os grupos avaliados, pois a vocalização em Testudinidae é considerada um mecanismo de atração para fêmeas (GALEOTTI et al., 2005a), devendo desta forma, representar um sinal espécie específico que pode auxiliar na rejeição da fêmea por parceiros de espécies simpátricas. Considerando a importância de padrões de vocalização no reconhecimento espécie específico, e que tais características apresentam-se conservadas entre grupos taxonomicamente próximos, assumimos diferenças nas características físicas de vocalização como indicativas de mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos, representando dessa forma, um indicativo de diferenciação taxonômica entre o morfotipo 1 e *C. carbonarius*.

Apesar do uso de animais de cativeiro sem procedência confirmada, os mesmos foram comparados em relação à morfologia, padrão de escudação da região cefálica e coloração, com amostras de animais depositados em coleções herpetológicas, e categorizados com base nessa comparação.

O padrão de vocalização obtida para os grupos analisados indicam correlação entre frequência e número de notas, com o tamanho dos animais, pois jabutis do mesmo gênero com menor porte possuem maior frequência e menor número de notas por vocalização (SACCHI et al., 2003; GALEOTTI et al., 2005a). Essa característica pode estar relacionada

às diferenças no uso do habitat nos dois grupos avaliados, onde *C. carbonarius*, atribuída a ambientes mais abertos, tem um padrão de vocalização com maior capacidade de dispersão, possibilitando a atração de maior número de fêmeas, uma vez que o ambiente não apresenta barreiras físicas para a propagação do som. Já o morfotipo 1, atribuído a ambientes florestados, possui um padrão de vocalização com frequências menores, e maior número de notas, características que conferem melhor custo energético, uma vez que o ambiente mais denso prove barreiras físicas a propagação sonora. Esses dados indicam que *C. carbonarius* e o morfotipo 1 tiveram sua história evolutiva em habitats distintos, reforçando a hipótese de que não correspondem a uma única unidade taxonômica.

Estes dados são de grande utilidade para fins de conservação, pois apesar da espécie *C. carbonarius* não estar inclusa na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (IUCN, 2014), vale ressaltar que a literatura não considera a existência de outras espécies ou unidades de significância evolutiva dentro do gênero *Chelonoidis*. Os dados apresentados no presente trabalho indicam a necessidade de se reavaliar o real status de conservação dos Testudinidae no Brasil, levando em consideração a existência de diferenças regionais quanto ao *status* de conservação (CASTAÑO-MOURA, 2002).

A análise de preferência por vocalizações espécie específicos demonstrou que as fêmeas de *C. carbonarius* apresentam interesse por vocalizações emitidas por machos da mesma espécie, atribuindo as fêmeas papel importante no processo de isolamento reprodutivo entre esses grupos. Os dados morfológicos referentes a modificações nos escudos dérmicos da região anal e supra caudal reforçam essa hipótese, pois as diferenças observadas para as fêmeas, podem representar mecanismos que inviabilizam a cópula interespecífica, ou ao menos a torna mais difícil, dada as relações de tamanho, massa e forma entre os *Chelonoidis* brasileiros.

Outro dado referente aos padrões de vocalização relevante para a hipótese proposta, é que fêmeas do morfotipo 1 por vezes percebem as vocalizações, mas não demonstram interesse pela mesma, o que condiz com proposta de uso de habitats florestados para o grupo, onde a vocalização durante a cópula teria pouca influência para atração de fêmeas, pois o ambiente prove barreiras físicas que limitam a eficiência deste mecanismo de atração. Nesse

grupo, a defesa de território deve representar um mecanismo mais efetivo para o sucesso reprodutivo.

Por fim, os machos de ambos os grupos estudados não parecem responder aos estímulos sonoros, reforçando a hipótese de Galeotti et al. (2005b) de que a vocalização durante a cópula possui função de comunicação direcionado à fêmea.

Durante o período de observação não foram identificadas cópulas entre indivíduos classificados como *C. carbonarius*, morfotipo ou *C. denticulatus*, o que sugere a existência de mecanismos de isolamento reprodutivo entre os grupos, uma vez que os mesmos ocupavam áreas comuns, sem nenhum tipo de barreira física que impedissem a cópula entre os mesmos.

Os resultados para medidas de carapaça e plastrão, apontam *C. denticulatus* como a maior espécie, seguida de Morfotipo 1 e *C. carbonarius*. Estes diferem do proposto por Jerozolinski (2005), que encontrou indivíduos adultos de *C. denticulatus* com média corporal e carapaças menores que de *C. carbonarius*. Uma possível explicação reside na área de estudo deste autor, que corresponde ao território da aldeia *A'Ukre* - PA, onde as populações indígenas têm culturalmente o hábito de se alimentar de ambas espécies, o que pode ter influenciado na estrutura etária e no tamanho médio dos espécimes avaliados. Além disso, a população avaliada por Jerozolinski como sendo *C. carbonarius*, corresponde à população do morfotipo 2.

Dados semelhantes em relação a proximidade do tamanho médio entre *C. denticulatus* e *C. carbonarius* já foram relatados na literatura por diversos autores (CASTAÑO-MORA; LUGO-RUGELES, 1981; FRETEY, 1977; JEROZOLIMSKI, 2005; MOSKOVITS, 1988; PRITCHARD; TREBBAU, 1984), diferindo dos dados encontrados no presente estudo, no qual essa diferença foi acentuada. Tais dados sugerem que algumas das populações de *C. carbonarius*, como próximas a *C. denticulatus* em relação ao tamanho, correspondam na realidade populações do morfotipo 1, e que diversos autores têm citado erroneamente o morfotipo 1 como *C. carbonarius*, ou simplesmente considerando-as como uma única unidade taxonômica.

Realizou-se análise de variância comparando cada sexo entre os três grupos avaliados em relação a 19 características morfológicas, e como resultado, obteve-se diferenças

estatisticamente significativa para a maioria dos caracteres relacionados ao tamanho e forma entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1, reforçando a hipótese de que tais grupos não correspondem a uma mesma unidade taxonômica.

Foram encontradas diferenças entre o padrão de dimorfismo entre os três grupos avaliados. A espécie *C. carbonarius* e o morfotipo 1 apresentaram padrões de dimorfismo sexual distintos. Na espécie *C. carbonarius*, as fêmeas são maiores que os machos em nove das 11 características sexualmente dimórficas encontradas, padrão inverso do grupo Morfotipo 1, em que os machos são maiores que as fêmeas em oito das 11 características sexualmente dimórficas. Esse padrão foi semelhante ao encontrado para *C. denticulatus*, em que os machos são maiores que as fêmeas em nove das 13 características sexualmente dimórficas da espécie.

Tendo em vista que padrões de dimorfismo entre espécies estão relacionados à atuação de diferentes pressões seletivas, tanto ecológicas como reprodutivas, é de se esperar que indivíduos de uma mesma espécie apresentem padrões de dimorfismo sexual semelhantes; porém, isto não foi observado no presente estudo para *C. carbonarius* e morfotipo 1. Esses dados sugerem que estes dois grupos sofreram pressões seletivas diferentes ao longo de sua história evolutiva, provavelmente habitando ambientes diferentes.

O morfotipo 1 apresentou um padrão de dimorfismo semelhante a *C. denticulatus*, sugerindo que ambas sofreram pressões seletivas e habitaram ambientes semelhantes ao longo da sua história evolutiva. Dados obtidos no presente estudo sobre a distribuição geográfica do morfotipo 1 sugerem que essa hipótese pode ser verdadeira, pois segundo comunicação pessoal da Dra. Ana Lúcia da Costa Prudente e sua equipe (Museu Paraense “Emílio Goeldi”), e relatos encontrados nos livros de registro do Museu Paraense “Emílio Goeldi”, a maioria dos animais foram coletados em bordas de matas. Tendo em vista que o morfotipo 1 é considerado atualmente como *C. carbonarius*, os dados aqui apresentados reforçam a hipótese da existência de uma nova espécie de *Chelonoidis* no Brasil.

Os padrões de dimorfismo sexual encontrados no presente estudo, são concordantes com os padrões macroevolutivos descritos por Rensch (1960), que propõe que há aumento do tamanho médio da espécie quando o dimorfismo sexual é maior em machos, e menor, quando as fêmeas possuem tamanho médio maior. Esse padrão é influenciado por seleção

sexual ou por seleção pelo aumento da fecundidade, para machos e fêmeas respectivamente. O sexo que alcança o maior tamanho médio, nesse contexto, é o que recebe maior pressão seletiva, direcionando o padrão evolutivo em relação ao tamanho da espécie. Este estudo é o primeiro a relatar diferenças intragenéricas para este padrão macroevolutivo em Testudinidae brasileiros.

Diversos trabalhos sugerem a existência de híbridos entre *C. carbonarius* e *C. denticulatus*, porém, encontramos grande número de animais correspondentes ao morfotipo 1, e os mesmos reproduzem entre si, gerando filhotes com padrões de coloração e dos escudos pré-frontais semelhantes aos padrões dos adultos. Dessa forma, pode-se inferir que a existência destes se deve a variações em nível de populações e não a eventos de hibridação.

As medidas referentes a região da placa anal nas fêmeas apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre *C. carbonarius* e morfotipo 1, diferindo do padrão encontrado para os machos, que não apresentaram diferenças. Esse dado pode estar relacionado a diferentes pressões seletivas sobre os caracteres sexualmente dimórficos nas fêmeas, indicando um possível processo de isolamento reprodutivo em função da diferenciação das regiões entre as placas anais e supra caudal nas fêmeas do morfotipo 1, já que essas diferenças não têm relação com tamanho e massa, e que tais regiões têm influência direta na dinâmica de movimentação caudal para cópula.

Os dados taxonômicos obtidos no presente estudo são relevantes para fins conservacionistas, pois apesar de *C. carbonarius* não estar inclusa na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (IUCN, 2014), essa classificação considera não haver subdivisões genéticas ou morfotipos na espécie, dessa forma, o *status* de conservação do morfotipo 1 ainda é incerto. Considerando as diferenças biogeográficas e os indícios de que não correspondem ao mesmo táxon, não podemos assumir que possuem o mesmo *status* de conservação, pois na Colômbia, por exemplo, a espécie é listada como criticamente ameaçada (CASTAÑO-MOURA, 2002).

Em vista das diferenças morfológicas significativas encontradas, até o momento para o morfotipo 1, assumimos que presença de morfotipos de *C. carbonarius*, correspondem na verdade a uma nova espécie, uma vez que apresentam características morfológicas biogeográficas distintas em relação ao padrão da espécie.

A citogenética clássica, utilizada no intuito de diferenciar os grupos *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e o morfotipo 1 não apresentou dados consistentes que viabilizassem o uso da mesma como parâmetro efetivo na diferenciação dos grupos. A coloração convencional por Giemsa revelou um número diplóide $2n= 52$ cromossomos para todos os grupos avaliados, sendo condizente com a literatura (BENIRSCHKE et al., 1976; BICKHAM, 1976; BICKHAM; BAKER, 1975; FORBES, 1966; GOLDSTEIN; LIN, 1972; SAMPAIO et al., 1971). Esses dados refletem o carácter conservado do cariótipo da família Testudinidae.

As técnicas de bandamento cromossômico avaliadas apresentaram baixa reprodutibilidade e constância nos padrões obtidos, não demonstrando sensibilidade e resolução suficientes para permitir a diferenciação entre grupos próximos, com base no padrão de bandamento, não sendo, portanto, um bom marcador citotaxonômico para quelônios (BICKHAM et al., 1980; HAIDUK, BICKHAM, 1982; MORITZ, 1984; NOLETO et al., 2006; ORTIZ et al., 2005).

As dificuldades técnicas associadas a estudos citogenéticos em quelônios surgem desde a coleta de sangue, pois alguns locais para amostragem propiciam maior probabilidade de contaminação da amostra, o que inviabiliza a cultura de linfócitos. No intuito de minimizar esse viés, padronizamos métodos de coleta de sangue menos invasivos para Testudinidae e Chelidae (SILVA et al., 2012).

Outro fator que dificulta esse tipo de estudo é a padronização de métodos de obtenção de metafases, pois os métodos eficientes geralmente implicam em eutanasiar o animal, o que deve ser evitados a todo custo. Uma estratégia eficiente, adequada e menos invasiva ao estudo de quelônios é a cultura de linfócitos a partir de sangue periférico. Entretanto, dificuldades na padronização da cultura se tornam muitas vezes, elementos desencorajadores em estudos citogenéticos em répteis (GUERRA, 2004). De forma geral, a obtenção de cromossomos metafásicos em quelônios não é tida como fácil, pois além das dificuldades em se obter bons índices mitóticos, a presença de um grande número de microcromossomos dificulta o pareamento dos pares homólogos e o reconhecimento de padrões de bandamento cromossômico. No intuito de minimizar essas dificuldades, padronizamos um método simples para cultura de linfócitos de Testudinidae (SILVA et al., 2011), o que permitiu a obtenção de índice mitótico satisfatório.

A diferenciação obtida por meio do perfil cromatográfico de hemoglobinas entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1 em relação a *C. denticulatus*, valida a técnica como ferramenta adicional para elucidação de questões taxonômicas em Testudinidae. A utilização de ferramentas adicionais à taxonomia do grupo, permite melhor caracterização de espécies e populações, viabilizando a identificação de possíveis unidades de significância evolutiva. Além das vantagens supra citadas, a utilização do perfil cromatográfico como ferramenta taxonômica, oferece uma ferramenta com boa resolução para diferenciação de espécies de jabutis, e a baixo custo e de maneira rápida, quando comparada com técnicas de biologia molecular.

As semelhanças observadas entre os perfis de hemoglobina de *C. carbonarius* e o morfotipo 1 em relação a *C. denticulatus*, indicam que a separação entre esses grupos é relativamente recente, e pode ser justificada devido ao alto grau de conservação da estrutura tridimensional e da função biológica da hemoglobina em vertebrados (PETRUZZELLI et al., 1996).

Observou-se em machos de *C. denticulatus* um possível padrão de dimorfismo sexual, evidenciado pela presença de uma banda extra, observada em eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH alcalino, entretanto, esses dados devem ser melhor investigados com o aumento do número amostral.

O presente estudo permitiu concluir que existem diferenças na mobilidade das hemoglobinas entre *C. denticulatus*, *C. carbonarius* e do morfotipo 1 na eletroforese em pH alcalino, porém, o comportamento das cadeias de globina é semelhante entre os três grupos. A cromatografia líquida de alta performance evidenciou diferentes tempos de retenção nas frações de globina de *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, mas não entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1.

Os dados referentes as análises do perfil de hemoglobinas indicam proximidade filogenética entre *C. carbonarius* e o morfotipo 1. Apesar de não ter havido diferenças entre esses dois grupos, apenas entre esses e *C. denticulatus*, esta análise não é excludente para a validação taxonômica do morfotipo 1 como nova espécie. Os dados encontrados indicam que ambas compartilham de um ancestral comum posterior a separação de *C. denticulatus* e *C. carbonarius*, dada a característica altamente conservada das hemoglobinas.

Os dados referentes a análise molecular de um fragmento do *citocromo b*, permitiram observar certo grau de homogeneidade entre as amostras sequenciadas de *C. denticulatus* e as sequencias disponíveis na literatura, indicando baixa variabilidade genética em relação a esse fragmento para a espécie. Em relação a *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2, as amostras sequenciadas diferiram daquelas disponíveis nos bancos de dados, indicando estrutura genética mais variável, possivelmente devido ao fato de que não se consideram divisões taxonômicas dentro de *C. carbonarius*.

A análise filogenética utilizada não apresentou sinal filogenético efetivo para a diferenciação de *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2, mas os diferenciou de *C. denticulatus*, indicando que a diferenciação de *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2, se deu posteriormente a separação de *C. denticulatus* e *C. carbonarius*.

A politomia observada para *C. carbonarius* e os morfotipos 1 e 2 não é excludente à hipótese de que representam espécies distintas, pois muitos problemas têm sido identificados no uso do gene *citocromo b* em análises filogenéticas, dentre os quais está a composição de bases, a taxa de variação entre linhagens, a saturação na terceira base do códon e a limitada variação nas primeiras e segundas bases do códon, resultando em pouca informação para problemas evolutivos, e poucos sítios informativos na terceira posição do códon no a nível populacional.

É possível que a inclusão de dados morfológicos, comportamentais e de perfil de hemoglobinas em uma matriz mista com os dados moleculares, permita a separação dos morfotipos 1 e 2 como espécies monofiléticas, resolvendo a politomia apresentada. Entretanto, para a realização dessa análise, será necessário a obtenção desses dados para grupos externos, o que permitirá análises filogenéticas mais robustas, que permitiram maior resolução taxonômica ao estudo.

Em vista as diferenças no padrão biogeográfico, vocalização e preferência sonoro específica e morfológicas encontradas, sugerimos que o morfotipo 1 deva ser considerado como uma nova espécie. Esta, será descrita com base nas normas da Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica e submetida a publicação em periódico internacional. Dados referentes ao morfotipo 2 devem ser melhor caracterizados, aumentando o número de amostras e utilizando-se de abordagens multidisciplinares.

Dados referentes ao real *status* conservacionista das populações naturais de jabutis devem ser revistos, uma vez que a pressão antrópica sobre estas é elevada, principalmente na região Norte do país, onde parte significativa da população tradicionalmente consome carne e ovos desses animais indiscriminadamente, sem que haja algum plano de conservação ou recuperação das populações naturais por órgãos públicos ou privados. É muito provável que os jabutis já estejam em *status* de ameaça mais preocupante que o relatado na literatura.

Referências

11. Referências

ALLENDORF, F.W, et al. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends in Ecology and Evolution**, v.16, p.613-622, 2001.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. **Cytogenetic markers in Neotropical freshwater fishes**. In: MALABARBA, L.R; REIS, R.E; VARI, R.P; LUCENA, R.P; LUCENA, Z.M.S; LUCENA, C.A.S. Phylogeny and classification of neotropical fishes. Editora da Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, Brasil, p.583-588, 1998.

ALTER, B. P. et al. Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the $G\gamma/A\gamma$ ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis. **British Journal of Haematology**, v.44, p.527-532, 1980.

ALTMANN J. Observational study of behavior: sampling methods. **Behaviour**, v.49, p.227-267, 1974.

ANDERSON, R.A; VITT, L.J. Sexual selection versus alternative causes of sexual dimorphism in teiid lizards. **Oecologia**, v.84, p.145-157, 1990.

ANDREATA, A.A; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. Karyological characterization of four Neotropical fish species of the genus *Hisonotus* (Teleostei, Loricariidae, Hypoptopomatinae) from distinct Brazilian river basins. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.62-66, 2006.

ATTARDI, G. Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy. **International Review of Cytology**, v.93, p.93-145, 1985.

AUFFENBERG, W. Sex and species discrimination in two sympatric South American tortoises. **Copeia**, v.3, p.335-342, 1965.

AUFFENBERG, W. A New Fossil, with Remarks on the Origin of South American Testudinines. **Copeia**, v.2, p.106-117, 1971.

AUFFENBERG, W. Checklist of fossil land tortoises (Testudinidae). Bulletin of the Florida State Museum. **Biological Sciences**, v.18, p.22-251, 1974.

AVISE, J.C; ARNOLD, J; BALL, R.M.Jr; BERMINGHAM, E; LAMB, T; NEIGEL, J.E; REEB, C.A; SAUNDERS, N.C. Intraespecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.18, p.489-522, 1987.

AVISE, J.C; BOWEN, B.W; LAMB, T; MEYLAN, A.B; BERMINGHAM, E. Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. **Molecular Biology and Evolution**, v.9, p.457-473, 1992.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman & Hall, Inc. USA. p.511, 1994.

AVISE, J.C. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. **Molecular Ecology**, v.7, p.371-379, 1998.

AVISE, J.C. **Phylogeography: The history and formation of species**. Harvard University Press; Cambridge, MA, p.447, 2000.

AVISE, J.C. Retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v.36, p.3-15, 2009.

AYRES, J. M; CLUTTON-BROCK, T.H. River boundaries and species range size in Amazonian primates. **American Naturalist**, v.140, p.531-537, 1992.

BALLARD, J.W.O; WITLOCK, M.C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v.13, p.729-744, 2004.

BALLASINA D. Salviamo le tartarughe. **Bologna: Edagricole**, 1995.

BARBOUR, T. Observations on Antilean tortoises and terrapins. **Copeia**, p.111-113, 1934.

BELL, T. **A Monograph of the Testudinata**, London, 1825.

BENIRSCHKE, R.J; QUINN, A.D; SEKULOVICH, R.E. Chromosomal studies in *Geochelone* (Testudinidae-Reptilia). **Chromosome**, v.12, p.14-16, 1976.

BERRY, J.F; SHINE, R. Sexual size dimorphism and sexual selection in turtles (Order Testudines). **Oecologia**, v.44, p.185-191, 1980.

BICKHAM, J.W; BJORNDAL, K.A; HAIDUK, M.W; RAINEY, W.E. The karyotype and chromosomal banding patterns of the green turtle (*Chelonia mydas*). **Copeia**, v.3, p.540-543, 1980.

BICKHAM, J.W. A cytosystematic study of turtles in the genera *Clemmys*, *Mauremys* and *Sacalia*. **Herpetologica**, v.31, p.198-204, 1975.

BICKHAM, J.W., BAKER, R.J. Karyotypes of some neotropical turtles. **Copeia**, v.4, p.1-6, 1976.

BONINI-DOMINGOS, C.R. **Metodologias Laboratoriais para o Diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias**. HN Editora, São José do Rio Preto, 2006.

BONINI-DOMINGOS, C.R; SILVA, M.B; ROMERO, R.M; ZAMARO, P.J.A; ONDEI, L.S; ZAGO, C.E.S; MOREIRA, S.B; SALGADO C.G. Description of electrophoretic and chromatographic hemoglobin profile of *Rhinoclemmys punctularia*. **Genetics and Molecular Research**, v.6, p. 415-421, 2007.

BONNET, X.F; LAGARDE, B.T; HENEN, J; CORBIN, K.A; NAGY, G; NAULLEAU, K; BALHOUL, O; BUONGIORNO-NARDELLI, M; AMALDI, F. Autoradiographic detection of molecular hybrids between rRNA and DNA in tissue sections. **Nature**, v.225, p.946-947, 2001.

BOWEN, B.W; NELSON, W.S; AVISE, J.C. A molecular phylogeny for marine turtles: Trait mapping, rate assessment, and conservation relevance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, p.5574-5577, 1993.

BRADBURY J.W; VEHRENCAMP, S.L. **Principles of animal communication**. Sunderland, MA: Sinauer, 1998.

BRITES, V.L.C. **Hematologia, bioquímica do sangue, parasitologia, microbiologia, algas epizoárias e histopatologia de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudinata, Chelidae), expostos a diferentes influências antrópicas no rio Uberabinha, Minas Gerais.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, p.196, 2002.

BULL, J.J; LEGLER, J.M. Karyotypes of side-necked turtles (Testudines: Pleurodira). **Canadian Journal of Zoology**, v.58, p.828-841, 1980.

BUTLER, M.A; SCHOENER, T.W; LOSOS, J.B. The relationship between sexual size dimorphism and habitat use in Greater Antillean Anolis lizards. **Evolution**, v.54, p.259-272, 2000.

CADIMA, J; JOLLIFFE, I.T. Size and shape-related principal component analysis. **Biometrics**, v.52, p.710-716, 1996.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações.** Porto Alegre: Artmed, 2003.

CASTAÑO-MORA, O.V; LUGO-RUGELES, M. Estudio comparativo del comportamiento dos especies de morrocoy: *Geochelone carbonaria* y *Geochelone denticulata*, aspectos comparables de su morfología externa. **Cespedesia**, v.10, p.55-122, 1981.

CASTAÑO-MORA, O.V. **Libro rojo de reptiles de Colombia.** Instituto de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Conservación Internacional - Colombia, Bogotá, 2002.

CENSKY, E.J. *Geochelone carbonaria* (Reptilia: Testudines) in the west indies. **Biological Sciences**, v.51, p.108-114, 1988.

CONGDON, J.D; DUNHAM, A.E; VAN LOBEN SEALS, R.C. Delayed sexual maturity and demographics of Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*): implications for conservation and management of long-lived organisms. **Conservation Biology**, v.7, p.826-833, 1993.

COSTA, L.P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, v.30, p.71-86, 2003.

CRAWFORD, N.G et al. A phylogenomic analysis of turtles. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, in press, 2014.

DESSAUER, H.C; FOX, W; RAMIREZ, J.R. Preliminary attempt to correlate paper-electrophoretic migration of hemoglobins with phylogeny in Amphibia and Reptilia. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.71, p.11-16, 1957.

EIZIRIK, E; KIM, J; RAYMOND, M.M; CRAWSHAW, P.G; O'BRIEN, S.J; JOHNSON, W.E. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). **Molecular Ecology**, v.10, p.65-79, 2001.

ERNEST, C.H; BARBOUR, R.W. **Turtles of the World**. Washington D.C: Smithsonian Institution Press, 1989.

ESPOSTI, DM; DE VRIES, S; CRIMI, M; GHELLI, A; PATARNELLO, T; MEYER, A. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.271, p.1143-1243, 1993.

EZAZ, T; VALENZUELA, N; MIURA, I; GEORGES, A; BURKE, R.L; GRAVES, J.A.M. An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: Chelidae) with genetic sex determination. **Chromosome Research**, v.14, p.139-150, 2006.

FARIAS, I.P; ORTÍ, G; SAMPAIO, I; SCHNEIDER, H; MEYER, A. The Cytochrome b Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishs. **Journal of Molecular Evolution**, v.53, p.89-103, 2001.

FARIAS, I.P, et al. Population genetics of the Amazonian tortoises, *Chelonoidis denticulata* and *C. carbonaria* (Cryptodira: Testudinidae) in an area of sympatry. **Amphibia-Reptilia**, v.28, p.357-365, 2007.

FENOCCHIO, A.S; BERTOLLO, L.A.C. Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. **Cytobios**, v.69, p.41-46, 1992.

FORBES, W.C Jr. **A cytological study of the Chelonia**. PhD Dissertation, University Connecticut, Storrs, 1996.

FREELAND, J.R. **Molecular ecology**. John Wiley & Sons, England, 2005.

FRETEY, J. **Les chéloniens de Guyane française**. 1. Etude préliminaire. Univ. Paris, 1977.

FUSHITANI, K. et al. The amino acid sequences of two α chains of hemoglobins from Komodo dragon *Varanus komodoensis* and phylogenetic relationships of amniotes. **Molecular Biology and Evolution**, v.13, p.1039-43, 1996.

GALEOTTI, P; SACCHI, R; ROSA, D.P, et al. Female preference for fast-rate, high-pitched calls in Hermann's tortoises *Testudo hermanni*. **Behavioral Ecology**, 2004.

GALEOTTI, P, et al. Do Mounting vocalization in tortoises have a communication function? A comparative analysis. **Herpetological Journal**, 2005a.

GALEOTTI, P, et al. Courtship displays and mounting calls are honest, condition-dependent signals that influence mounting success in Hermann's tortoises. **Canadian Journal of Zoology**, v.83, p.1306-1313, 2005b.

GARCÊS, S.P.S; LIMA, A.O.S. **Desenho e Validação in silico de Primers Intragenéricos**. II Workshop de Técnicas de Informática Aplicadas ao Meio Ambiente, Congresso Brasileiro de Computação, 2004.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K; PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. 1. Ed. São Paulo: Livraria Varela Ltda, 1994.

GARLA, R.C; SETZ, E.Z.F; GOBBI, N. Jaguar (*Panthera onca*) Food Habits in Atlantic Rain Forest of Southeastern Brazil. **Biotropica**, v.33, p.691-696, 2001.

GHISELIN, M.T. **The economy of nature and the evolution of sex**. University of California Press, Berkeley, California, U.S.A, 1974.

GIBBONS, J.W; KEATON, G.H; SCHUBAUER, J.P; GREENE, J.L; BENNETT, D.H; MCAILIFFE, J.R; SHARITZ, R.R. Unusual population size structure in freshwater turtles on barrier islands. **Georgia Journal of Science**, v.37, p.155-159, 1979.

GIBBONS, J.W. Why do turtles live so long? **BioScience**, v.37, p.262-269, 1987.

GIBBONS, J.W; LOVICH, D.J.E. Sexual dimorphism in turtles with emphasis on the slider turtle (*Trachemys scripta*). **Herpetological Monographs**, v.4, p.1-29, 1990.

GOLDSTEIN, S; LIN, C.C. Somatic cell hybrids between cultured fibroblast from the Galapagos tortoise and the golden hamster. **Experimental Cell Research**, v.73, p.266-269, 1972.

GORDON, D; ABAJIAN, C; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.

GOSNELL, A.S; RIVERA, G; BLOB, R.W. A Phylogenetic Analysis of Sexual Size Dimorphism in Turtles. **Herpetologica**, v.65, p.70-81, 2009.

GOULART, C.E.S. **Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis**. Ed. L.F. Livros de Veterinária LTDA, v.1, p.21-56, 99-108, 131-144, 2004.

GRATZER, W.B; ALLISON, A.C. Multiple haemoglobins. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v.35, p.459-506, 1960.

GREWAL, S.I.S; JIA S. Heterochromatin revised. **Nature Review**, v.8, p.35-46, 2007.

GUERRA, M. **FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Sociedade Brasileira de Genética, v.1, 2004.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, v.165, p.131-137, 1969.

HAIDUK, M.W; BICKHAM, J.W. Chromosomal homologies and evolution of testudinoid turtles with emphasis on the systematic placement of *Platysternon*. **Copeia**, v.1, p.60-66, 1982.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. Oxford, v. 41, p. 95-98, 2001.

HARDY, M.E; GRADY, J.M; ROUTAN, E.J. Intraspecific phylogeography of the slender madtom: the complex evolutionary history of the Central Highlands of the United States. **Molecular Ecology**, v.11, p.2393-2403, 2002.

HART, J.A. Impact and Sustainability of Indigenous Hunting in the Ituri Forest, Congo-Zaire: A Comparison of Unhunted and Hunted Duiker Populations. *In*: ROBINSON, J.G; BENNETT, E.L, editors. **Hunting for Sustainability in Tropical Forests**. Columbia University Press, New York, 2000.

HIGGINS, D; THOMPSON, J; GIBSON, T; THOMPSON, J.D; HIGGINS, D.G; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.

HIGHFIELD, A.C. **Encyclopedia of Keeping and Breeding Tortoises and Freshwater Turtles**. London, Carapace Press, v.1, 1996.

HOWELL, W.M; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal develop: step method. **Experimentia**, v.36, p.104-105, 1980.

IUCN, 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. <www.iucnredlist.org>. Acesso em 25 de Janeiro de 2015.

IVERSON, J. B. **A Checklist With Distribution Maps of the Turtles of the World**. Paust Printing, Richmond, Indiana, <http://emys.geo.orst.edu>, 1986.

IVES, I; SPINKS, P.Q; SHAFFER, H.B. Morphological and genetic variation in the endangered Sulawesi tortoise *Indotestudo forstenii*: evidence of distinct lineages?. **Conservation Genetics**, v.9, p.709-713, 2008.

JACKSON, D.C; RAUER, E.M; FELDMAN, R.A; REESE, S.A. Avenues of extrapulmonary oxygen uptake in western Painted Turtles (*Chrysemys picta bellii*) at 10uC. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.139, p.221-227, 2004.

JEROZOLIMSKI, A. **Ecologia de populações silvestres dos jabutis *Geochelone denticulata* e *G. carbonaria* (Cryptodira: Testudinidae) no território da aldeia A`Ukre Sul do Pará**. Instituto de Biociências Departamento de Ecologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2005.

JOBB, G. **TREEFINDER**, version of October 2008. (<http://www.treefinder.de>), 2008.

KAY, R.F; MADDEN, R.H; CIFELLI, R.L; FLYNN, J.J. **Vertebrate Paleontology in the Neotropics**. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C, 1997.

KINNEY, C; ABISHAHIN, G; YOUNG, B.A. Hissing in rattlesnakes: redundant signaling or inflationary ephiphenomenon? **Journal of Experimental Zoology**, 1998.

KOCHER, T.D; THOMAS, W.K; MEYER, A; EDWARDS, S.V; PÄÄBO, S; VILLABLANCA, F.X; WILSON, A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, p.6196-6200, 1989.

KREBS, C.J. **Ecology: The experimental analysis of distribution and abundance**. Addison Wesley Longman, Inc. Quarta edição, 1994.

KUCHLING, G. **The reproductive biology of Chelonia**. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1999.

KVIST, L. **Phylogeny and Phylogeography of European Parids**. Academic Dissertation of the Faculty of Science, University of Oulu, 2000.

LAMB, T; LYDEARD, C; WALKER, R.W; GIBBONS, J.W. Molecular phylogeny of map turtles (*Graptemys*): A comparison of mitochondrial restriction site versus sequence data. **Systematic Biology**, v.43, p.543-559, 1994.

LAMBERT, M.R.K. Threats to Mediteranean (West Palaearctic) tortoises and their effects on wild populations: an overview. **Amphibia-Reptilia**, v.5, p.5-15, 1984.

LE, M; CHRISTOPHER, J; RAXWORTHY, W; MCCORD, M; LISA, M. A molecular phylogeny of tortoises (Testudines: Testudinidae) based on mitochondrial and nuclear genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.2, p.517-531, 2006.

LEDRU, M.P. Late quaternary environmental and climatic changes in central Brazil. **Quaternary Research**, v.39, p.90-98, 1993.

LEGLER, J.M. Tortoises (*Geochelone carbonaria*) in Panama: Distribution and Variation. **The American Midland Naturalist**, v.70, p.490-505, 1963.

LEICH, A.R; SCHWARZACHER, D; JAKSON, I.J; LEITCH, I.J. **In Situ Hybridization: A Practical Guide**. Royal Microscopical Society, p.19-108, 1994.

LEVAN, A; FREDGA, K; SANDBERG, A.A. Nomeclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v.50, p.201-220, 1964.

LOVEJOY, N.R; DE ARAUJO, M.L.G. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needle fishes of the genus *Potamorhaphis*. **Molecular Ecology**, v.9, p.259-268, 2000.

LOVICH, J. E. Possible demographic and ecologic consequences of sex ratio manipulation in turtles. **Chelonian Conservation Biology**, v.2, p.114-117, 1996.

LUISELLI, L. Comparative abundance and population structure of sympatric Afrotropical tortoises in six rainforest areas: the differential effects of "traditional veneration" and of "subsistence hunting" by local people. **Acta Oecologia**, v.24, p.157-163, 2003.

MADER, D.R. **Reptile Medicine and Surgery**, W.B. Saunders Company, p.68-69, 1996.

MARENGO-ROWE, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetato. **Journal of Clinical Pathology**, v.18, p.790-792, 1965.

MARQUES, O.A.V; SAZIMA, I. **História natural dos répteis da Estação Ecológica Juréia-Itatins**. In: MARQUES, O.A.V; DULEVA, W, editors. Estação Ecológica Juréia-Itatins. Ambiente físico, flora e fauna. Holos, Ribeirão Preto, 2004.

MARTINEZ, P.A; BOERIS, J.M; SÁNCHEZ, J; PASTORI, M.C; BOLZÁN, A.D; LEDESMA, M.A. Karyotypic characterization of *Trachemys dorbigni* (Testudines: Emydidae) and *Chelonoidis (Geochelone) donosobarrosi* (Testudines: Testudinidae), two species of Cryptodiram turtles from Argentina. **Genetica**, v.137, p.277-283, 2009.

MATSUDA, Y, et al. Highly conserved linkage between birds and turtles: Bird and turtle chromosomes are precise counterparts of each other. **Chromosome Research**, v.13, p.601-615, 2005.

MC BEE, K; BICKHAM, J.W; RHODIN, A.G.J; MITTERMEIER, R.A. Karyotypic variation in the genus *Platemys* (Testudines: Pleurodira). **Copeia**, v.2, p.445-449, 1985.

MEDEM, F. Recomendaciones Respecto a contar el Escamado y tomar las Dimensiones de Nidos, Huevos y Ejemplares de los Crocodylia e Testudines. **Lozania**, v.20, p.1-17, 1976.

MEDEM, F; CASTAÑO-MORA, O.V; LUGO-RUGUELES, M. Contribución al conocimiento sobre la reproducción y el crecimiento de los “morrocayos” (*Geochelone carbonaria* y *G. denticulata*; Testudines, Testudinidae). **Caldasia**, Bogotá, v.12, p.497-511, 1979.

MELO, M.B, et al. Molecular characterization of hemoglobin a-D chains from *Geochelone carbonaria* and *Geochelone denticulata* land turtles. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.134, p.389-395, 2003.

MEYER, A. **Evolution of mitochondrial DNA in fishes**. In: Hochachka, Mommsen (eds) Biochemistry and molecular biology of fishes, vol.2, Elsevier, Amsterdam, 1993.

MEYER, A. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. **Trends in Ecology and Evolution**, v.9, p.278-280, 1994.

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

MOORE, W.S; DEFILIPPIS, V.R. The window of taxonomic resolution for phylogenies based on mitochondrial cytochrome b. In: Mindell DP, editor. **Avian Molecular Evolution and Systematic**, Academic press; San Diego, p.84-119, 1997.

MORA, M; OLIVARES, A.L; VASSALO, A.L. Size, shape and structural versatility of the skull of the subterranean rodent *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha): functional and morphological analysis. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.78, p.85-96, 2003.

MOREIRA, G. Observações sobre *Geochelone denticulata* (Linnaeus, 1766) e *Geochelone carbonaria* (Spix, 1824) na bacia do Rio Uatumã, Amazônia Central. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v.7, p.183-188, 1991.

MOREIRA, G.R.S. Sympatry of the Turtles *Geochelone carbonaria* and *G. denticulata* in the Rio Uatumã Basin, Central Amazonia. **Journal of Herpetology**, v.23, p.183-185, 1989.

MORITZ, C; PATTON, J.L; SCHNEIDER, C.J; SMITH, T.B. Diversification of Rainforest Faunas: An Integrated Molecular Approach. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.31, p.533-563, 2000.

MORITZ, C. The evolution of a highly variable sex chromosome in *Gehyra purpurascens* (Gekkonidae). **Chromosoma**, v.90, p.90-111, 1984.

MOSKOVITS, D.K. **The behavior and ecology of two Amazonian tortoises, *Geochelone carbonaria* and *Geochelone denticulata*, in northwestern Brazil**. PhD thesis, University of Chicago, Chicago, 1985.

MOSKOVITS, D. K. Sexual Dimorphism and Population Estimates of the Two Amazonian Tortoises (*Geochelone carbonaria* and *G. denticulata*) in Northwestern Brazil. **Herpetologica**, v.44, p.209-217, 1988.

MOSKOVITS, D.K. Population and ecology of the tortoises *Geochelone carbonaria* and *G. denticulata* on the Ilha de Maracá. Maracá. **The Biodiversity and Environment of an Amazonian Rainforest**, p.263-284, 1998.

MROSOVSKY, N. Spectrographs of the sounds of leatherback turtles. **Herpetologica**, v.28, p.256-258, 1972.

NASCIMENTO, H.S.D. **Efeitos da Caça de Subsistência de Vertebrados Terrestres por Comunidades Indígenas: Um Estudo de Caso dos Kayapó de A'ukre, Amazônia Oriental**. Monografia. Universidade Estadual Paulista/UNESP, Rio Claro, 1997.

NEDBAL, M.A; FLYNN, J.J. Do combined effects of asymmetric process of replication and DNA damage from oxygen radicals produce a mutation-rate signature in the mitochondrial genome? **Molecular Biology and Evolution**, v.15, p.219-223, 1998.

NELSON, D.L; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ªed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NIBLICK, H.A; ROSTAL, C; CLASSEN, T. Role of male-male interactions and female choice in the mating system of the desert tortoise, *Gopherus agassizii*. **Herpetological Monographs**, v.8, p.124-132, 1994.

NOLETO, R.B; KANTEK, D.L.Z; SWARÇA, A.C; DIAS, A.L; FENOCCHIO, A.S; CESTARI, M.M. Karyotypic characterization of *Hydromedusa tectifera* (Testudines, Pleurodira). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.263-266, 2006.

OLSON, S. L; DAVID, N. The gender of the tortoise genus *Chelonoidis* (Fitzinger, 1835) (Testudines: Testudinidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v.126, p.393-394, 2014.

OLSSON, M; MADSEN, T. **Sexual selection and sperm competition in reptiles**. In: Sperm competition and sexual selection. Birkhaed, T. R; Møller, A.P, Eds. Stockholm: Morgan Kaufmann, 1998.

ORTIZ, M.L; RODRÍGUEZ, P.A; BUENO, M.L. Caracterización citogenética de la tortuga sabanera *Podocnemis vogli* (Reptilia: Testudinata: Podocnemididae). **Acta Biológica Colombiana**, v.10, p.19-33, 2005.

PADIAL, M.P; MIRALES, A; DE LA RIVA, I; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**, v.7, p.14, 2010.

PARHAM, J.F; MACEY, J.R; PAPENFUSS, T.J; FELDMAN, C.R; TÜRKOZAN, O; POLYMENI, R; BOORE, J.L. The phylogeny of Mediterranean tortoises and their close relatives based on complete mitochondrial genome sequences from museum specimens. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.38, p.50-64, 2006.

PETRUZZELLI, R, et al. Diving behaviour and haemoglobin function: the primary structure of the α and β -chains of the sea turtle (*Caretta caretta*) and its functional implications. **Biochemical Journal**, v.316, p.959-965, 1996.

POUGH, F.H; HEISER, J.B; MCFARLAND, W.N. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, p.386-409, 1993.

POUGH, F.H; ANDREWS, R.M; CADLE, J.E; CRUMP, M.L; SAVITZKY, A.H; WELLS, K.D. **Herpetology**. Prentice-Hall, Newark, NJ, 2001.

POUGH, F.H; ANDREWS, M.R; SAVITKY, H.A; WELLS, D.K. **Herpetology**, 2.ed. Prentice Hall, Inc. New Jersey, 2002.

POUGH, F.H; JANIS, C.M; HEISER, J.B. **A Vida dos Vertebrados**. 3ªed. São Paulo: Atheneu, p.409-477, 2003.

PRITCHARD, P.C.H. **Encyclopedia of Turtle**, ed. T.F.H. Publication Ltda, 1979.

PRITCHARD, P.C.H; TREBBAU, P. TREBBAU. **The Turtles of Venezuela**. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 1984.

QUIJADA-MASCAREÑAS, J.A; FERGUSON, K.E; POOK, C.E; DA GRAÇA, S.M; THORPE, R.S; WÜSTER, W. Amazonian biogeography: The neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus* complex) as an example. **Journal of Biogeography**, v.34, p.1296-1312, 2007.

QUINN, T.W. Molecular evolution of the mitochondrial genome. MINDELL, D. P. **Avian molecular evolution and systematics**. San Diego, Academic Press, p.3-28, 1997.

RENSCH, B. Evolution above the species level. New York, NY: Columbia University Press, 1960.

RIDLEY, M. **Evolução**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2006.

ROCHA-OLIVARES, A; ROSENBLATT, R.H; VETTER, R.D. Molecular evolution, systematics, and zoogeography of the rockfish subgenus *Sebastomus* (Sebastes, Scorpaenidae) based on mitochondrial cytochrome b and control region sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.11, p.441-458, 1999.

RODRIGUEZ-BAYONA, L.O; RYLANDER, M.K. Notes on the Biology of the Tortoise *Geochelone denticulata*, L. in Peru. **Amphibia-Reptilia**, v.5, p.323-327, 1984.

ROHILLA, M.S; RAO, R.J; TIWARI, P.K. Use of peripheral blood lymphocyte culture in the karyological analysis of Indian freshwater turtles, *Lissemys punctata* and *Geoclemys hamiltoni*. **Current Science**, v.90, p.1130-1134, 2006.

RÜCKNAGEL K.P; BRAUNITZER, G. Hemoglobins of reptiles. The primary structure of the major and minor hemoglobin component of adult Western Painted Turtle (*Chrysemys picta bellii*). **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v.2, p.123-31, 1988.

RÜCKNAGEL, K.P; REISCHL, E; BRAUNITZER, G. Hämoglobine der Reptilian. Expression von α D - Genen bei Schildkröten, *Chrysemys picta bellii* und *Phrynops hilarii* (Testudines). **Physiology and Chemistry Hoppe-Seyler's**, v.365, p.1163-1171, 1984.

SACCHI, R, et al. Vocalization and courtship intensity correlate with mounting success in marginated tortoises *Testudo marginata*. **Behaviour Ecology and Sociobiology**, 2003.

SACCHI, R; GALEOTTI, P; FASOLA, M; GERZELI, G. Larynx Morphology and Sound Production in Three Species of Testudinidae. **Journal of Morphology**, v.261, p.175-183, 2004.

SAIKI, RK; GELFAND, DH; STOFFEL, S; SCHARF, SJ; HIGUCHI, R; HORN, GT; MULLIS, KB; ERLICH, HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-491, 1988.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, v.3, 1989.

SAMPAIO, M.M; BARROS, R.M; AYRES, M; CUNHA, O.R. A Karyological study of two species of tortoises from the Amazon region of Brazil. **Cytologia**, v.36, p.199-204, 1971.

SCHNEIDER, R.G, et al. Differentiation of eletrophoretically hemoglobins - such as S, D, G and P or A2, C, E, and O by electrophoresis of the globin chains. **Clinical Chemistry**, v.20, p.1111-1115, 1974.

SEABRIGHT, M. Rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**, v.11, p.971-972, 1971.

SHAFTER, H.B. Turtles (Testudines). *In*: HEDGES, S.B; KUMAR, S. The Timetree of Life. New York, United States: Eds. **Oxford University Press**, 1.ed, v.55, p.398-401, 2009.

SHINE, R. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. **The Quarterly Review of Biology**, v.64, p.419-461, 1989.

SHISHIKURA, F; TAKAMI, K. The Amino Acid Sequences of the α - and β -Globin Chains of Hemoglobin from the Aldabra Giant Tortoises, *Geochelone gigantea*. **Zoological Science**, v.18, p.515-526, 2001.

SILVA, T.L; SILVA, M.I.A; VENANCIO, L.P.R; ZAGO, C.E.S; MOSCHETA, V.A.G; LIMA, A.V.B; VIZOTTO, L.D; SANTOS, J.R; BONINI-DOMINGOS, C.R; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Simple method for culture of peripheral blood lymphocytes of Testudinidae. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p.3020-3025, 2011.

SILVA, T.L; SILVA, M.I.A; VENANCIO, L.P.R; ZAGO, C.E.S; MOSCHETTA, V.A.G; LIMA, A.V.B; PEREIRA, T.L.C; BACCHI, J.B; VIZOTTO, L.D; BONINI-DOMINGOS, C.R; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Blood Sampling in Testudinidae and Chelidae. **Herpetological Review**, v.43, p.64-65, 2012.

SILVA, T.L. **Estudo morfológico e citogenético em duas espécies de jabuti do gênero *Chelonoidis* (Testudines)**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 116p, 2011.

SIQUEIRA, C.A.F; SOUZA-SILVA, J.A; MORAL, F.A.F. Análise de Marcadores Morfológicos Efetivos na Diferenciação de Espécies de *Geochelone* (Fitzinger, 1835) no Criadouro UNIVAP. Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica. São José dos Campos. **Anais de Trabalhos Completos do VIII Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica**. ISBN. São José dos Campos: Editora da UNIVAP, v.1, p.124-126, 2004.

SOUZA, F.L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines: Chelidae). **Phyllomedusa**, v.3, p.15-27, 2004.

STICKEL, L.F. Populations and Home Range Relationships of the Box Turtle, *Terrapene c. carolina* (Linnaeus). **Ecological Monographs**, v.20, p.351-378, 1950.

STORER, I.S, et al. **Zoologia Geral**. Companhia Editora Nacional, São Paulo: 6.ed, 2000.

STRYER, L. **Bioquímica**, 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 881p. 1992.

STUART, B.L; PARHAM, J.F. Molecular phylogeny of the critically endangered Indochinese box turtle (*Cuora galbinifrons*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.31, p.164-177, 2004.

SULLIVAN, B; RIGGS, A. Structure, function and evolution of turtle hemoglobins. II. Electrophoretic studies. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.23, p.449-458, 1967.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstring centromeric heterocromatin. **Experimental Cell Research**, v.75, p.304-306, 1972.

SWARÇA, A.C; CESTARI, M.M; GIULIANO-CAETANO, L; DIAS, A.L. Cytogenetic characterization of the large South American Siluriform fish species *Zungaro zungaro* (Pisces, Pimelodidae). **Chromosome Science**, v.5, p.51-55, 2001.

SWINGLAND, I; STUBBS, D. The ecology of a Mediterranean tortoise (*Testudo hermanni*): reproduction. **Journal of Zoology (London)**, p.595-610, 1985.

TAYLOR, E.B; MACPHAIL, J.D. Historical contingency and ecological determinism interact to prime speciation in sticklebacks, *Gasterosteus*. **Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences**, v.267, p.2375-2384, 2000.

TINBERGEN, N. Comparative studies of the behaviour of gulls. **Behaviour**, v.15, p.1-70, 1959.

TORSONI, M.A; OGO, S.H. Oxygenation properties of hemoglobin from turtle *Geochelone carbonaria*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.28, p.1129-31, 1995.

TORSONI, M.A; STOPPA, G.R; TURRA, A; OGO, S.H. Functional behavior of tortoise hemoglobin *Geochelone denticulata*. **Brazilian Journal of Biology**, v.62, p.725-733, 2002.

TRECO, F.R; MALABARBA, L.R; GIULIANO-CAETANO, L; DIAS, A.L. Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in Lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.6, p.87-92, 2008.

TRIVERS, R.L. **Parental investment and sexual selection** in: B. Campbell, editor. Sexual selection and the descent of man. Aldine Publishing Company, Chicago, p.139-179, 1972.

TSIGENOPOULOS, C.S; BERREBI, P. Molecular phylogeny of North Mediterranean freshwater barbs (genus *Barbus*: Cyprinidae) inferred from cytochrome b sequences: biogeographic and systematic implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.14, p.165-179, 2000.

TURTLE TAXONOMIC WORKING GROUP (BICKHAM, J.W; PARHAM, J.F; PHILIPPEN, H.D; RODIN, A.G.J; SHAFFER, H.B; SPINKS, P.Q; VAN DUK, P.P) Turtle taxonomy: Methodology, Recommendations, and Guidelines. **Chelonian Research Monographs**, v.4, p.73-84, 2007a.

TURTLE TAXONOMY WORKING GROUP (ENGSTROM, T.N; EDWARDS, T; OSENTOSKI, M.F; MYERS, E.M). A compendium of PCR primers for mtDNA, microsatellite, and other nuclear loci for freshwater turtles and tortoises in defining turtle diversity. **Chelonian Research Monographs**, v.4, p.124-141, 2007b.

TURTLE TAXONOMY WORKING GROUP (VAN DIJK, P.P; IVERSON, J.B; RHODIN, A.G.J; SHAFFER, H.B; BOUR, R). Turtles of the World: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution with maps and conservation status. In: RHODIN, A.G.J; PRITCHARD, P.C.H; VAN DIJK, P.P; SAUMURE, R.A, Eds. Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. **Chelonian Research Monographs**, n.5, 7ªed. p.329-479, 2014.

VANZOLINI, P.E. **On the Distribution of Certain South American Turtles (Testudines: Testudinidae & Chelidae)**. Smithsonian Herpetological Information Service, p.1-10, 1994.

VANZOLINI, P.E; WILLIAMS, E.E. The vanishing refuge: a mechanism for ecogeographic speciation. **Papéis Avulsos Zoologia**, v.34, p.251-255, 1981.

VARGAS-RAMÍREZ, M; MARAN, J; FRITZ, U. Red and yellow-footed tortoises, *Chelonoidis carbonaria* and *C. denticulata* (Reptilia: Testudines: Testudinidae), in South American savannahs and forests: do their phylogeographies reflect distinct habitats?. **Organisms Diversity and Evolution**, v.10, p.161-172, 2010.

VAZQUEZ-DOMINGUEZ, E. **Phylogeography, historical patterns and conservation of natural areas**. In: Protected areas and the regional planning imperative in North America (NELSON, G; DAY, J.C; SPORTZA, L.M; LOUCKY, J; VASQUEZ, C, Eds). University of Calgary Press, Canada, 2002.

VAZQUEZ-DOMINGUEZ, E. **Filogeografía y vertebrados**. In: La Ecología molecular de plantas y animales (EGUIARTE, L; SOUZA, V; AGUIRRE, X, Eds). INE, Mexico, 2007.

VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis oh human hemoglobins. **American Journal of Clinical Pathology**, v.49, p.440-442, 1968.

VINCENT, S. E; HERREL, A. Functional and ecological coordinates of ecologically-based dimorphisms in squamate reptiles. **Integrative and Comparative Biology**, v.47, p.172-188, 2007.

VINKE, S; VETTER, H; VINKE, T; VETTER, S. **South American Tortoises**. Chimaria, 2008.

WEAVER, W.G.J. Courtship and combat behavior in *Gopherus berlanderi*. **Bulletin of the Florida State Museum**, v.15, p.1-43, 1970.

WIKELSKI, M; TRILLMICH, F. Body size and sexual size dimorphism in marine iguanas fluctuate as a result of opposing natural and sexual selection: an island comparison. **Evolution**, v.51, p.922-936, 1997.

WILLEMSSEN, R.E; HAILEY, A. Variation of adult body size of the tortoise *Testudo hermanni* in Greece: proximate and ultimate causes. **Journal of Zoology (London)**, v.248, p.379-396, 1999.

WILLEMSSEN, R.E; HAILEY, A. Variation in adult survival rate of the tortoise *Testudo hermanni* in Greece: implications for evolution of body size. **Journal of Zoology (London)**, v.255, p.43-53, 2001.

WILLEMSSEN, E.R; HAILEY, A. Sexual dimorphism of body size and shell shape in European tortoises. **Journal of Zoology London**, v.260, p.353-365, 2003.

WILLIAMS, E.E. Two Species of Tortoises in Northern South America. **Breviora**. Museum of Comparative Zoology, Cambridge, Mass, 1960.

WOOD, R.C. Turtles. In: KAY, R.F; MADDEN, R.H; CIFELLI, R.L; FLYNN, J.J, editors. Vertebrate paleontology in the Neotropics: the Miocene fauna of La Venta, Colombia. Smithsonian Institution Press, Washington, 1997.

WÜSTER, W; FERGUSON, J.E; QUIJADA-MASCAREÑAS, J.A; POOK, C.E; SALOMÃO, M.G; THORPE, R.S. Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Molecular Ecology**, v.14, p.1095-1108, 2005.

YAMADA, K; NISHIDA-UMEHARA, MATSUDA, Y. Molecular and cytogenetic characterization of site-specific repetitive DNA sequences in the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*, Trionychidae). **Chromosome Research**, v.13, p.33-46, 2005.

ZANGERL, R; JOHNSON, R.G. The nature of shield abnormalities in the turtle shell. **Fieldiana Geology**, v.29, p.341-362, 1957.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**, Terceira edição. Prentice-Hall International, INC, London, 1996.

ZUG, G.R. **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. Academic Press, New York, NY, 1993.

12. Apêndice A. Alinhamento do fragmento de 227 pares de base do gene mitocondrial *citocromo b*.

Os alinhamentos abaixo, referem-se as sequencias do fragmento de 227 pares de base do gene mitocondrial *citocromo b*. Os nucleotídeos destacados representam: preto - regiões conservadas; cinza - regiões variáveis; branco - diferenças de uma base. Todas as amostras foram alinhadas em relação a sequencias referência da espécie *Cyclemys oldhamii*, depositadas em banco de dados (NCBI) e utilizada como grupo externo para a análise filogenética.

	*	20	*	40	
C.carb1	:	-----	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	24
C.carb4	:	-----	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	24
C.carb10	:	-----	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	24
C.carb11	:	-----	-----CTCACTG	:	7
C.carb12	:	-----	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	24
C.carb13	:	-----	CACTACTCACCAAACATCTCACTG	:	24
C.carb16	:	-----CTGGCAATA	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	33
C.dent1	:	AATCTTCCTGGCAATA	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	40
C.dent3	:	AATCTTCCTGGCAATA	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	40
C.dent4	:	AATCTTCCTGGCAATA	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	40
C.dent5	:	AATCTTCCTGGCAATA	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	40
C.dent6	:	AATCTTCCTGGCAATA	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	40
C.dent7	:	AATCTTCCTGGCAATA	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	40
C.dent8	:	AATCTTCCTGGCAATA	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	40
C.dent13	:	AATCTTCCTGGCAATA	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	40
C.dent15	:	AATCTTCCTGGCAATA	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	40
Morf1.1	:	-----CTGGCAATA	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	33
Morf1.2	:	----TTTCTGGCAATA	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	36
Morf1.3	:	-----	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	24
Morf1.4	:	----TTTCTGGCAATA	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	36
Morf2.1	:	-----	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	24
Morf2.2	:	-----	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	24
Morf2.4	:	-----GCAATA	CACTA T TCA T CAAACATCTCACTG	:	30
Morf2.5	:	-----	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	24
Morf2.6	:	-----	CACTACTCACCAAACATCTCACTA	:	24
C.odham.	:	AATTTTCCTAGCAATA	CACTA T TCA C CA G A T ATCTCACTA	:	40
			cactactcaccaaacatCTCACTa		

		*	60	*	80	
C.carb1	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 64
C.carb4	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 64
C.carb10	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 64
C.carb11	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 47
C.carb12	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 64
C.carb13	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 64
C.carb16	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 73
C.dent1	:	GCATTCTCATCAGTA	ACCCATATT	ACCCGAGAC	GTACAAT	: 80
C.dent3	:	GCATTCTCATCAGTA	ACCCATATT	ACCCGAGAC	GTACAAT	: 80
C.dent4	:	GCATTCTCATCAGTA	ACCCATATT	ACCCGAGAC	GTACAAT	: 80
C.dent5	:	GCATTCTCATCAGTA	ACCCATATT	ACCCGAGAC	GTACAAT	: 80
C.dent6	:	GCATTCTCATCAGTA	ACCCATATT	ACCCGAGAC	GTACAAT	: 80
C.dent7	:	GCATTCTCATCAGTA	ACCCATATT	ACCCGAGAC	GTACAAT	: 80
C.dent8	:	GCATTCTCATCAGTA	ACCCATATT	ACCCGAGAC	GTACAAT	: 80
C.dent13	:	GCATTCTCATCAGTA	ACCCATATT	ACCCGAGAC	GTACAAT	: 80
C.dent15	:	GCATTCTCATCAGTA	ACCCATATT	ACCCGAGAC	GTACAAT	: 80
Morf1.1	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 73
Morf1.2	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 76
Morf1.3	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 64
Morf1.4	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 76
Morf2.1	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 64
Morf2.2	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 64
Morf2.4	:	GCATTCTCATCAAT	CGCCCATATT	ACCCGAGAT	GTGCAAT	: 70
Morf2.5	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 64
Morf2.6	:	GCATTCTCATCAGTAG	CCCATATC	ACCCGAGAC	GTACAGT	: 64
C.odham.	:	GCATTCTCATCAGTGG	CCCACATCACT	CGAGAT	GTACAGT	: 80
		GCATTCTCATCAgTa	CCCAtAT	ACcCGAGAcGTaCA	T	

		*		100		*		120	
C.carb1	:	ACGGATGACTTATCCGAAATATACATGCCAACGGAGCCTC	:	104					
C.carb4	:	ACGGATGACTTATCCGAAATATACATGCCAACGGAGCCTC	:	104					
C.carb10	:	ACGGATGACTTATCCGAAATATACATGCCAACGGAGCCTC	:	104					
C.carb11	:	ACGGATGACTTATCCGAAATATACATGCCAACGGAGCCTC	:	87					
C.carb12	:	ACGGATGACTCATCCGAAATATACATGCCAACGGAGCCTC	:	104					
C.carb13	:	ACGGATGACTCATCCGAAATATACATGCCAACGGAGCCTC	:	104					
C.carb16	:	ACGGATGACTTATCCGAAATATACATGCCAACGGAGCCTC	:	113					
C.dent1	:	ACGGGTGACTTATTCGAAATATACATGCTAACGGGGCCTC	:	120					
C.dent3	:	ACGGGTGACTTATTCGAAATATACATGCTAACGGGGCCTC	:	120					
C.dent4	:	ACGGGTGACTTATTCGAAATATACATGCTAACGGGGCCTC	:	120					
C.dent5	:	ACGGGTGACTTATTCGAAATATACATGCTAACGGGGCCTC	:	120					
C.dent6	:	ACGGGTGACTTATTCGAAATATACATGCTAACGGGGCCTC	:	120					
C.dent7	:	ACGGGTGACTTATTCGAAATATACATGCTAACGGGGCCTC	:	120					
C.dent8	:	ACGGGTGACTTATTCGAAATATACATGCTAACGGGGCCTC	:	120					
C.dent13	:	ACGGGTGACTTATTCGAAATATACATGCTAACGGG-----	:	115					
C.dent15	:	ACGGGTGACTTATTCGAAATATACATGCTAACGGGGCCTC	:	120					
Morf1.1	:	ACGGATGACTCATCCGAAATATACATGCCAACGGAGCCTC	:	113					
Morf1.2	:	ACAGATGACTCATCCGAAATATACGTGCCAACGGAGCCTC	:	116					
Morf1.3	:	ACGGATGACTTATCCGAAATATACATGCCAACGGAGCCTC	:	104					
Morf1.4	:	ACGGATGACTCATCCGAAATATACATGCCAACGGAGCCTC	:	116					
Morf2.1	:	ACAGATGACTCATCCGAAATATACATGCCAACGGAGCCTC	:	104					
Morf2.2	:	ACAGATGACTCATCCGAAATATACATGCCAACGGAGCCTC	:	104					
Morf2.4	:	ACGGATGACTCATCCGAAATATACATGCTAACGGAGCCTC	:	110					
Morf2.5	:	ACAGATGACTTATCCGAAATATACATGCCAACGGAGCCTC	:	104					
Morf2.6	:	ACGGATGACTCATCCGAAATATACATGCCAACGGAGCCTC	:	104					
C.odham.	:	ACGGGTGACTTATCCGCAACATACATGCCAACGGGGCTTC	:	120					
		ACgG TGACT AT CGaAAtATACaTGC AACGG gcctc							

```

          *           140           *
C.carb1   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCC-- : 139
C.carb4   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 141
C.carb10  : CATCTTCTTCATATGTATCTAGCTTCACATCGGCCGA : 141
C.carb11  : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 124
C.carb12  : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCG- : 140
C.carb13  : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 141
C.carb16  : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 150
C.dent1   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 157
C.dent3   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTC----- : 146
C.dent4   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 157
C.dent5   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 157
C.dent6   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTC----- : 146
C.dent7   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 157
C.dent8   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCG- : 156
C.dent13  : ----- : -
C.dent15  : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 157
Morf1.1   : CATCTTCTTCATATGCATCTACCTTCACATCGGCCGA : 150
Morf1.2   : CATCTTCTTCATATGCATCTACCT----- : 140
Morf1.3   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 141
Morf1.4   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 153
Morf2.1   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 141
Morf2.2   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 141
Morf2.4   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 147
Morf2.5   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 141
Morf2.6   : CATCTTCTTCATATGTATCTACCTTCACATCGGCCGA : 141
C.odham.  : CATCTTCTTCATGTGTATTACCTTCACATCGGTCGA : 157
           catcttcttcatatgtatctaccttcacatcggccg

```