

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Múltipla paternidade e razão sexual da população reprodutiva de
Dermochelys coriacea (Vandeli, 1761) do Espírito Santo**

Gabriela Sarnaglia Caliaro Bispo

Vitória, ES

Agosto, 2024

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S243m Sarnaglia Caliaro Bispo, Gabriela, 1995-
Múltipla paternidade e razão sexual da população reprodutiva de *Dermodochelys coriacea* (Vandeli, 1761) do Espírito Santo / Gabriela Sarnaglia Caliaro Bispo. - 2024.
(recurso não paginado). : il.

Orientadora: Sarah Maria Vargas.

Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Tartaruga-de-couro. 2. marcadores microsatélites. 3. poliandria. 4. poliginia. 5. diversidade genética. 6. genética da conservação. I. Maria Vargas, Sarah. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

GABRIELA SARNAGLIA CALIARI BISPO

**Múltipla paternidade e razão sexual da população reprodutiva de
Dermochelys coriacea (Vandeli, 1761) do Espírito Santo**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de concentração Biologia Animal.

Orientador(a): Prof. Dr. Sarah Maria Vargas

Vitória, ES

Agosto, 2024



Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO CURSO DE MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DO CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – ATA Nº 235– 27/08/2024

No dia vinte e sete do mês de agosto de dois mil e vinte e quatro, em sessão remota, conforme Portaria Normativa nº 08 da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFES de 01 de julho de 2021, procedeu-se a avaliação da dissertação da aluna **Gabriela Sarnaglia Caliaro Bispo**. Às catorze horas, a Profª Drª Sarah Maria Vargas – UFES, Orientadora e Presidente da Comissão Examinadora de Defesa de Dissertação, deu início aos trabalhos, convidando a compor a banca o Prof. Dr. Albert David Ditchfield – UFES (Examinador Interno) e a Profª Drª Camila Clozato Lara – UFPR (Examinadora Externa). A seguir, a presidente solicitou à mestranda que fizesse uma explanação de seu trabalho intitulado “**Múltipla paternidade e razão sexual da população reprodutiva de Dermochelys coriacea (Vandeli, 1761) do Espírito Santo**”. Finda a apresentação, a presidente passou a palavra aos examinadores, que procederam à arguição da candidata. Ao final, a Comissão em sessão reservada deliberou pela **APROVAÇÃO** da referida dissertação nos termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e alertou que a aprovada somente terá direito ao título de Mestre após entrega da versão final de sua dissertação, em meio digital, à Secretaria do Programa. Encerrada a sessão, eu, Profª Drª Sarah Maria Vargas, presidente da Comissão Examinadora, lavrei a presente ata que vai assinada digitalmente, por mim e pelos demais componentes da Comissão.

Profª Drª Sarah Maria Vargas (UFES)
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Albert David Ditchfield (UFES)
Examinador Interno

Profª Drª Camila Clozato Lara (UFPR)
Examinadora Externa





ata de aprovação - Gabriela Sarnaglia Caliarì Bispo

Data e Hora de Criação: 28/08/2024 às 08:15:58

Documentos que originaram esse envelope:

- ata de aprovação - Gabriela Sarnaglia Caliarì Bispo.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)



Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: 48b276d39fe1b604569d2540ef9bc23a643b98037092a529639878db8bb3b3b7

[SHA512]:

66a5456c7e853b4875f3d4a5b5419114f17fb8d6591d94cbd7e6bd68021496316ff384adbb75abba3d22070904e004cf3ba64e89c335cc69252c4859f4dad4

97

Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



ASSINADO - Camila Clozato Lara (camila.lara@ifpr.edu.br)

Data/Hora: 28/08/2024 - 09:47:00, IP: 200.17.101.66

[SHA256]: f0046bea20ba881dfb4d96e341849296437e5bb5da75b155e3b15426f3eff257



ASSINADO - Sarah Maria Vargas (sarah.vargas@ufes.br)

Data/Hora: 28/08/2024 - 10:55:59, IP: 200.137.65.103, Geolocalização: [-20.275156, -40.303967]

[SHA256]: ff5b46aad688119b0d3bc9f3f9780cb51a33f1a4a7c4ada467192128a78471c2



ASSINADO - Albert David Ditchfield (trachops@gmail.com)

Data/Hora: 28/08/2024 - 10:24:14, IP: 179.105.88.8, Geolocalização: [-20.356217, -

40.278213][SHA256]:

27630157df88fba7f03214e7f2fc49b2cc388b974dcbe1148293073d7742193b

Histórico de eventos registrados neste envelope

28/08/2024 10:55:59 - Envelope finalizado por sarah.vargas@ufes.br, IP 200.137.65.103

28/08/2024 10:55:59 - Assinatura realizada por sarah.vargas@ufes.br, IP 200.137.65.103

28/08/2024 10:55:53 - Envelope visualizado por sarah.vargas@ufes.br, IP 200.137.65.103

28/08/2024 10:24:14 - Assinatura realizada por trachops@gmail.com, IP 179.105.88.8

28/08/2024 10:24:07 - Envelope visualizado por trachops@gmail.com, IP 179.105.88.8

28/08/2024 09:47:00 - Assinatura realizada por camila.lara@ifpr.edu.br, IP 200.17.101.66

28/08/2024 09:46:05 - Envelope visualizado por camila.lara@ifpr.edu.br, IP 200.17.101.66

28/08/2024 08:16:35 - Envelope registrado na Blockchain por thayse.bomfim@ufes.br, IP 200.137.65.103

28/08/2024 08:16:35 - Envelope encaminhado para assinaturas por thayse.bomfim@ufes.br, IP 200.137.65.103

28/08/2024 08:15:58 - Envelope criado por thayse.bomfim@ufes.br, IP 200.137.65.103

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Departamento de Ciências Biológicas e ao Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo pela formação gratuita e de qualidade.

Ao PPGBAN, à coordenação do programa, aos professores, servidores e colegas pelo apoio ao longo dos anos de curso.

Aos órgãos nacionais e estaduais financiadores de pesquisa científica – CAPES, CNPq e FAPES pela estrutura e o investimento que permitiram que esse trabalho fosse desenvolvido.

Aos parceiros da Fundação Projeto TAMAR e à Paula Rodrigues Guimarães pelo apoio na coleta de dados, que foi fundamental para elaboração deste trabalho.

À minha orientadora, Sarah Maria Vargas, pela oportunidade, pelos muitos ensinamentos, assistência, dedicação e paciência que foram fundamentais para minha trajetória.

Aos amigos e parceiros de trabalho do Laboratório de Genética e Evolução Molecular (LGEM) por todo apoio, palavras de incentivo e pelos momentos de descontração.

Agradeço a Juliana de Freitas Justino, pelo apoio técnico de excelência, pela disponibilidade e pelos momentos leves com boas risadas.

Agradeço aos meus pais e irmãos, pelo esforço na minha criação, pelo carinho, cuidado e por se fazerem presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos amigos próximos, pelo acolhimento, carinho e momentos divertidos que deixam a vida leve.

À minha esposa, Renata, por todo amor e companheirismo, por me fazer dar muitas risadas e pelo cuidado constante. A caminhada fica mais tranquila segurando a sua mão.

À banca examinadora Albert David Ditchfield e Camila Clozato pela disponibilidade, atenção e colaboração.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição das condições da PCR e das fluorescências utilizadas para a amplificação dos seis marcadores microssatélites utilizados no estudo.....	18
Tabela 2: Relação dos marcadores nucleares microssatélites, sequência dos primers, tamanho dos alelos e dados de diversidade genética para as 12 fêmeas analisadas.....	20
Tabela 3- Informações dos 15 ninhos analisados nesse estudo, incluindo: número de filhotes amostrados, o número estimado de machos contribuindo em cada ninho (Colony) presença ou ausência de MP.....	22
Tabela 4- Taxa de poliandria e poliginia encontrada em estudos posteriores utilizando a espécie <i>Dermochelys coriacea</i>	24
Tabela A: Descrição dos genótipos dos pais, para os seis marcadores, gerados através do método Full-Likelihood no programa Colony 2.0 (Jones, 2010).....	36
Tabela B: Descrição dos genótipos das fêmeas para os seis marcadores.....	36
Tabela C: Descrição dos genótipos dos filhotes dos 15 ninhos, para os seis marcadores.....	37
Tabela D: Informações sobre os pais inferidos (Colony), número de filhotes, número de filhotes por pai e ninhos de origem.....	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: A. Estoques genéticos da tartaruga-de-couro no mundo (N = 9, 2 não definidos).
B. As sete Unidades Regionais de Manejo para a tartaruga-de-couro no mundo, sendo 22: Noroeste Atlântico, 23: Sudoeste do Atlântico, 24: Sudeste do Atlântico, 25 Sudoeste do Índico, 26: Nordeste do Índico, 27: Oeste do Pacífico e 28: Leste do Pacífico. B. Modificado de Wallace *et al.* (2023).....13
- Figura 2: Mapa de localização da área de amostragem. Pontos em vermelho representam o local do primeiro flagrante das 12 fêmeas amostradas para o presente estudo.....16
- Figura 3: Frequência alélica para os seis marcadores utilizando as 12 fêmeas analisadas.....21
- Figura 4: Contribuição relativa dos 17 machos estimados pelo Colony (cada macho está representado por uma cor) para os filhotes genotipados dos 15 ninhos estudados. As barras representam as descendências geradas pelos 17 pais em porcentagem. Os asteriscos indicam os 7 machos que apresentaram comportamento de poliginia.....23

SUMÁRIO:

ABSTRACT.....	7
RESUMO.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
METODOLOGIA.....	16
Amostragem.....	16
Protocolos laboratoriais.....	17
Análise de dados.....	18
RESULTADOS.....	19
DISCUSSÃO.....	23
CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	36

ABSTRACT:

Assessing sea turtles' mating patterns and behavior is challenging, as they are difficult to observe due to their coastal and oceanic habitats. Molecular biology techniques, such as microsatellite marker genotyping, have been useful in filling some of these observational gaps. Microsatellite markers have been used in population genetics studies due to their high variability and high mutation rate. Because of this characteristic, these markers are applicable in paternity studies as there is a low probability that individuals share the same alleles at different loci. This methodology has been widely explored to investigate multiple paternity in sea turtles, analyzing the possibility of more than one male contributing to each clutch. The present study investigated the level of multiple paternity and the sex ratio of the reproductive population of the leatherback turtle *Dermochelys coriacea*, a “critically endangered” species, at beaches close to the river Doce mouth, in Linhares, Espírito Santo State, Brazil. This was the first study of multiple paternity in a Brazilian leatherback turtle population. Fifteen clutches from two consecutive seasons (2019/20 and 2020/21) were examined using six microsatellite markers. The results revealed multiple paternity in 60% of the clutches, and 41% of polygyny, with 1 to 6 males per clutch, and a sex ratio of 1.42 males for each female. This study provides a basis for future comparisons with other populations in Brazil to estimate the reproductive sex ratio of the species on the Brazilian coast, providing scientific support to understand male gene flow better and to prioritize conservation measures for leatherback sea turtles.

Keywords: Leatherback turtle, microsatellite markers, polyandry, polygyny, genetic diversity, conservation genetics.

RESUMO:

Acessar os padrões de acasalamento e o comportamento de tartarugas marinhas é um desafio, pois são animais de difícil observação devido aos habitats costeiros e oceânicos. Técnicas de biologia molecular, como genotipagem de marcadores microssatélites, têm sido úteis em preencher algumas dessas lacunas observacionais. Marcadores microssatélites têm sido utilizados em estudos de genética de populações devido à alta variabilidade e alta taxa de mutação. Por possuírem essa característica, esses marcadores são aplicáveis em estudos de paternidade, uma vez que a probabilidade de que os indivíduos compartilhem o mesmo conjunto de alelos em diferentes loci é baixa. Essa metodologia tem sido amplamente explorada para investigar a múltipla paternidade de tartarugas marinhas, analisando a possibilidade de contribuição de mais de um macho por ninhada. O presente estudo teve como objetivo investigar o nível de múltipla paternidade e a razão sexual da população reprodutiva da tartaruga-de-couro *Dermochelys coriacea*, uma espécie “criticamente ameaçada de extinção”, em praias da Foz do Rio Doce, em Linhares, Espírito Santo, Brasil. Este foi o primeiro trabalho dessa natureza para uma população brasileira da espécie. Foram examinados 15 ninhos de duas temporadas consecutivas (2019/20 e 2020/21), utilizando seis marcadores microssatélites. Os resultados obtidos revelaram múltipla paternidade em 60% dos ninhos, 41% de poliginia, com 1 a 6 machos por ninho, e uma razão sexual de 1,42 machos para cada fêmea. O estudo oferece uma base para futuras comparações com outras populações do Brasil para estimar a razão sexual reprodutiva da espécie na costa brasileira, fornecendo subsídios científicos para entender melhor o fluxo gênico dos machos e para priorizar as medidas de conservação da espécie.

Palavras-chave: Tartaruga-de-couro, marcadores microssatélites, poliandria, poliginia, diversidade genética, genética da conservação.

INTRODUÇÃO

A tartaruga-de-couro

A espécie *Dermochelys coriacea*, conhecida popularmente como tartaruga-de-couro é a maior das tartarugas marinhas e a única representante viva da família Dermochelyidae, que se divergiu de outras tartarugas entre os períodos Cretáceo e Jurássico, cerca de 100 a 150 milhões de anos atrás (Zangerl, 1980; Bowen *et al.*, 1996). A espécie destaca-se por suas características biológicas distintas das demais tartarugas marinhas podendo medir dois metros de comprimento e pesar até 912 quilogramas (Zug & Parham, 1996), o que torna esses animais um dos maiores répteis, e certamente, as maiores tartarugas do mundo (Spotila, 2004). Os organismos da espécie possuem carapaça notavelmente diferente, composta por uma pele espessa e resistente, sobre uma estrutura óssea, ao contrário da carapaça dura observada em outras espécies (Dutton *et al.*, 1999., Spotila, 2004).

Um outro aspecto importante desses animais é a biologia reprodutiva. Os machos de tartaruga-de-couro se deslocam para áreas próximas às praias de nidificação pouco antes do início da temporada reprodutiva e buscam acasalar com o maior número possível de fêmeas e tendem a retornar às mesmas praias onde tiveram sucesso reprodutivo no ano anterior (James *et al.*, 2005). As fêmeas da espécie podem atingir a maturidade sexual entre 5,4 e 13 anos (Girondot *et al.*, 2021). A tartaruga-de-couro, assim como outras espécies de tartarugas marinhas, são promíscuas e as fêmeas são capazes de armazenar espermatozoides em seus ovidutos e utilizá-los em fertilizações posteriores (Crim *et al.*, 2002; Spotila, 2004). Os acasalamentos costumam ocorrer perto das áreas de nidificação das fêmeas, que desovam entre 70 e 120 ovos, sendo que parte desse quantitativo são de ovos são inviáveis e não desenvolvem filhotes (Spotila, 2004)

Essas tartarugas são carnívoras e se alimentam basicamente de água-viva (Hays *et al.*, 2018). São altamente migratórias, sua distribuição geográfica é ampla, sendo encontradas em águas tropicais e subtropicais ao redor do mundo, podendo atravessar oceanos inteiros em busca de alimento, áreas de reprodução e locais de desova (Pritchard, 1976; Dutton *et al.*, 1999; Eckert *et al.*, 2012). A tartaruga-de-couro é parcialmente endotérmica, capaz de tolerar águas mais frias do que outras tartarugas marinhas (Dutton

et al., 1999, Spotila, 2004). Características biológicas como o fluxo sanguíneo e uma espessa camada de óleos e gorduras na pele são capazes de manter a temperatura corporal mais alta do que o ambiente ao seu redor (Spotila, 2004). Sendo assim, esses animais possuem a mais ampla distribuição geográfica entre as tartarugas, considerando que o habitat tropical (com temperaturas mais elevadas) parece ser um fator-chave na limitação dos movimentos dos organismos da família Cheloniidae (Dutton *et al.*, 1999, Bowen *et al.*, 1994).

O conhecimento sobre a distribuição, os movimentos e as rotas migratórias dessa espécie pelágica foi, por muito tempo, baseado principalmente em observações pontuais, dados de capturas acidentais na pesca, recaptura de indivíduos (fêmeas) marcados ou levantamentos aéreos costeiros (Eckert *et al.*, 2006). Os avanços na telemetria por satélite possibilitaram uma investigação mais acurada dos movimentos e da utilização do habitat oceânico pelas tartarugas-de-couro (Morreale *et al.*, 1996). Por mais que esses animais sejam capazes de atingir águas muito profundas, o monitoramento por satélite se torna eficiente, pois as tartarugas precisam atingir a superfície para respirar, e nesse momento, o sinal do transmissor chega ao satélite que calcula a localização do indivíduo (Morreale *et al.*, 1996; Eckert *et al.*, 2006).

As tartarugas-de-couro no Brasil

Apesar da tartaruga-de-couro ser uma espécie altamente migratória e ocupar várias áreas ao longo da costa brasileira em rotas migratórias e para se alimentar (Almeida *et al.*, 2011; Fossette *et al.*, 2014), no Brasil existem apenas duas áreas com registros de desovas regulares, e a maior população regularmente monitorada ocorre no litoral do Espírito Santo (ES) (Thomé *et al.*, 2007; Colman *et al.*, 2019). Embora considerada a maior população de desova do Brasil, ela apresenta um baixo quantitativo de indivíduos quando comparada a populações que desovam nas ilhas indonésias, por exemplo, onde foram registrados cerca de 3601 ninhos registrados em 2003 na praia de Jamursba Medi (Hitipeuw *et al.*, 2007). Enquanto que para o ES foram registrados apenas 172 fêmeas desovando entre 1999 e 2020 (Vargas *et al.*, 2022) e registro de 1316 ninhos entre 1988 e 2017 (Colman *et al.*, 2019). Os dados reprodutivos da população do ES mostram que a temporada reprodutiva ocorre entre setembro e março, o intervalo entre as desovas dentro da mesma temporada é de 8 a 15 dias, com média de 5 a 6 desovas por fêmeas por

temporada e com razão sexual de filhotes ligeiramente enviesada, tendendo a maior produção de fêmeas (média de 64,1% fêmeas) (Colman 2018, Colman *et al.* 2019). O intervalo de remigração mais comum para as fêmeas de desova registrado é de 2 anos, mas intervalos de 3, 4, 6 e 8 também foram registrados (Colman *et al.* 2019). A outra população de desova monitorada da espécie no Brasil é encontrada no litoral do Piauí e ocorre entre maio e julho. Ela possui 8 fêmeas registradas entre 2014 e 2019 e apenas 50 de ninhos, aproximadamente, registrados entre 2008 e 2019 (Magalhães *et al.* 2022). Alguns eventos esporádicos de desova já foram registrados em outros estados do Brasil como Rio de Janeiro (Barate *et al.*, 2002), Paraná e Santa Catarina (Soto *et al.*, 1997), mas as razões são desconhecidas, visto que os filhotes não se desenvolvem em praias com temperatura de areia muito baixas (Barata *et al.* 2002).

As únicas áreas de desova regular reconhecidas para espécie no Brasil ocorrem no ES (Thomé *et al.* 2007, Colman *et al.* 2019) e PI (Magalhães *et al.* 2022), mas há registros de indivíduos se alimentando ao longo da costa do Brasil como em Arraial do Cabo, no Rio de Janeiro (Mello-Fonseca *et al.*, 2023), registro de encalhes, de isótopos estáveis e de telemetria que indicam o uso das águas do sul do Atlântico Sudoeste (sul do Brasil, Argentina e Uruguai) como áreas de alimentação (Almeida *et al.*, 2011; Colman, 2018; Monteiro *et al.*, 2016). Além de ocuparem essas áreas com frequência, as tartarugas-de-couro que desovam no ES também se movimentam para a costa do África com certa frequência e vice-versa (Almeida *et al.*, 2011; Fossette *et al.*, 2014). As águas do sul do Atlântico Sudoeste também são usadas como área de alimentação para as populações de desova das populações da África (Fossette *et al.*, 2014) e constituem estoques mistos que agregam animais de várias áreas de desova diferentes (Vargas *et al.*, 2019), permitindo o encontro de machos e fêmeas e possibilitando a cópula.

Ameaças

O status de conservação mundial da *Dermochelys coriacea*, é preocupante sendo classificado como "Vulnerável" pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) (Wallace *et al.* 2013). No Brasil a população é classificada como " criticamente Ameaçada" e incluída no registro de espécies ameaçadas do governo brasileiro (Brasil, 2022).

Espécies ameaçadas, geralmente apresentam populações reduzidas, o que pode levar a um *vórtex* de extinção, onde as pequenas populações se tornam ainda mais vulneráveis a diversos fatores negativos que aceleram a diminuição do tamanho populacional (Gilpin & Soulé, 1986). Além disso, densidades populacionais baixas também podem produzir comportamentos reprodutivos alterados, como poliginia ou poliandria, que potencialmente pode compensar o número reduzido de parceiros (Gilpin & Soulé, 1986).

Em geral, espécies de tartarugas marinhas enfrentam ameaças constantes, devido às ações humanas (Hamann *et al.*, 2010). A poluição química, física, biológica e a fotopoluição afetam diretamente esses organismos (ICMBIO, 2018). O acelerado desenvolvimento costeiro, atividades pesqueiras desenfreadas, o consumo de carne e ovos, enfermidades e mudanças climáticas são exemplos claros dos riscos que esses animais enfrentam (ICMBIO, 2011). Considerando todos esses fatores de risco, é essencial desenvolver estratégias de manejo e conservação das espécies de tartaruga marinha, tendo em vista que o sexo desses organismos é definido pela temperatura, o que significa que a temperatura de incubação do ninho influencia diretamente o sexo do embrião (Marcovaldi *et al.*, 1997). Temperaturas acima da média pivotal (onde há formação igual de ambos os sexos) geralmente resultam em mais fêmeas, enquanto temperaturas abaixo dessa média tendem a gerar mais machos (Hawkes *et al.*, 2009).

Estudos genéticos e sua aplicação na conservação

Estudos usando o DNA mitocondrial (DNAMt) indicam que população do Brasil é geneticamente distinta das outras populações do Atlântico (Dutton *et al.*, 2013, Vargas *et al.*, 2019) e do Indo-Pacífico (Walace *et al.* 2023). Estas distintas populações são conhecidas também como estoques genéticos (Vargas *et al.*, 2019; Wallace *et al.*, 2023) (Figura 1A). Atualmente as tartarugas-de-couro que ocupam as águas do oceano Atlântico são divididas em quatro Unidades Regionais de Manejo (URMs - Noroeste Atlântico, Sudoeste do Atlântico, Sudeste do Atlântico e Sudoeste do Índico) as quais se sobrepõem em diversas partes do oceano principalmente em áreas de alimentação (Wallace *et al.*, 2023 – Figura 1B). Essas URMs indicam entidades regionais as quais grupos de indivíduos compartilham trajetórias geográficas e ambientes similares, e são usadas para delimitar áreas de interesse para conservação (Wallace *et al.*, 2023).

Além de ajudar na delimitação dos estoques genéticos e das URMs, os dados genéticos também são usados para calcular a diversidade genética das populações (Vargas *et al.*, 2022, Dutton *et al.*, 2013) e para entender a origem de animais nas áreas de

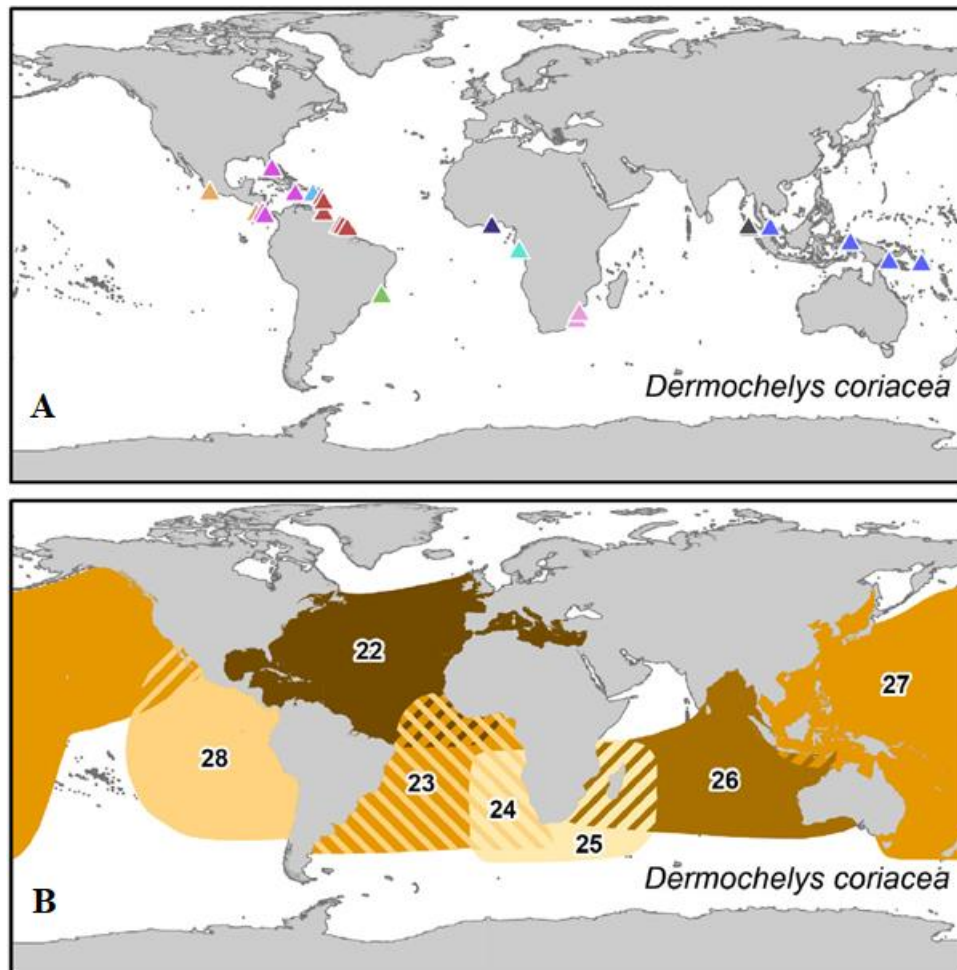


Figura 1: **A.** Estoques genéticos da tartaruga-de-couro no mundo (N = 9, 2 não definidos). **B.** As sete Unidades Regionais de Manejo para a tartaruga-de-couro no mundo, sendo 22: Noroeste Atlântico, 23: Sudoeste do Atlântico, 24: Sudeste do Atlântico, 25 Sudoeste do Índico, 26: Nordeste do Índico, 27: Oeste do Pacífico e 28: Leste do Pacífico. B. Modificado de Wallace *et al.*, (2023).

alimentação e de animais encalhados (estoques mistos) (Vargas *et al.*, 2008, 2019). A população de desova do ES, por exemplo, possui um dos menores valores de diversidade para marcadores nucleares quando comparada a outras populações de desova já estudadas do mundo. Apesar de apresentar diversidade relativamente baixa, o trabalho não mostrou sinais de endogamia para essa população (Vargas *et al.*, 2022).

Acessar os padrões de acasalamento e o comportamento de organismos marinhos, por exemplo, é um desafio, pois eles são de difícil observação devido aos habitats

costeiros e oceânicos. Sendo assim, muitos aspectos naturais não são conhecidos devido, justamente, à dificuldade de monitoramento desses animais (Moore *et al.*, 2002). As fêmeas de tartarugas marinhas, quando adultas, exibem o comportamento de retornar à praia onde nasceram para nidificar, demonstrando o hábito conhecido como filopatria. Os machos, em contraste, passam o ciclo de vida nos oceanos, o que dificulta o estudo e a observação do acasalamento das tartarugas marinhas (Hays *et al.*, 2010). Assim, presume-se que o acasalamento ocorra durante os períodos de migração (Fitzsimmons *et al.*, 1997).

Uma forma de preencher algumas dessas lacunas observacionais é o uso de marcadores nucleares (Karl, 2008). Trabalhos usando apenas o DNAm oferecem uma boa base com relação a estrutura populacional e a diversidade, mas para a inferência de outros aspectos reprodutivos, como a identificação de parentesco, por exemplo, esses marcadores não são aplicáveis devido a forma de transmissão do DNAm, que não recupera os dados paternos (Sato & Sato, 2013). Já os marcadores nucleares fornecem informações importantes para a inferência de comportamentos relacionados à reprodução, identificação de indivíduos e também de dinâmica populacional (Karl, 2008; Stewart & Dutton 2011; Figgner *et al.*, 2016).

A técnica de genotipagem de marcadores microssatélites (regiões repetitivas em tandem de 1 a 6 nucleotídeos no DNA nuclear) é utilizada em estudos de genética de populações devido a variabilidade dos microssatélites, que apresentam alta taxa de mutação (Ellegren, 2004). Por possuírem essas características, esses marcadores são aplicáveis em estudos de paternidade, uma vez que a probabilidade de que os indivíduos compartilhem o mesmo conjunto de alelos em diferentes loci é baixa (Ellegren, 2004, Selkoe & Toonen, 2006). Essa metodologia tem sido amplamente explorada para investigar a múltipla paternidade, que se refere à contribuição de mais de um macho por ninhada (Rieder *et al.* 1998; Dutton & Davis, 1998; Stewart & Dutton, 2011, 2014; Figgner *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2018). A múltipla paternidade, teoricamente, pode trazer benefícios evolutivos para as tartarugas marinhas, favorecendo a variabilidade genética, e assim aumentar o valor adaptativo, ou *fitness*, da espécie, o que seria uma estratégia interessante para populações em declínio (Stewart & Dutton, 2011; Pearse & Avise, 2001).

Muitos trabalhos têm investigado a presença da múltipla paternidade em tartarugas marinhas e encontrado evidências dessa característica reprodutiva tanto na

família *Cheloniidae* (Moore *et al.*, 2002, Lasala, 2011, Tedeschi *et al.*, 2015, Turkozan *et al.*, 2019), quanto para a espécie *Dermochelys coriacea*, onde alguns autores, como Rieder e colaboradores (1998) e Dutton & Davis (1998) não encontraram evidência de múltipla paternidade em ninhos da espécie localizados na Costa Rica (Figgner *et al.*, 2016). Já em estudos mais recentes, foram detectados até três pais para a prole em ninhos da espécie na ilha de St. Croix (Ilhas Virgens Americanas, EUA - Stewart e Dutton, 2014) e em Playa Gandoca, Costa Rica (Figgner *et al.*, 2016). Ao contrário do comportamento poliândrico, a poliginia, que envolve machos contribuindo para mais de um ninho, tem sido raramente documentada em tartarugas marinhas (Gaos *et al.*, 2018; Turkozan *et al.*, 2019). Para tartaruga de couro, esse comportamento parece fazer parte do seu sistema de acasalamento (Crim *et al.*, 2002).

Por ser um componente singular da biodiversidade marinha, compreender os padrões reprodutivos da espécie é fundamental não apenas para explicar sua persistência ao longo de milhares de anos, mas também para embasar discussões sobre sua conservação (Moore *et al.*, 2002). Entender como a tartaruga-de-couro se reproduz, incluindo seus locais de desova e comportamentos associados, fornece dados valiosos para o desenvolvimento de estratégias para manejo e proteção da espécie (Moore *et al.*, 2002).

O presente trabalho teve como objetivo estimar o nível de múltipla paternidade em uma população brasileira da espécie *Dermochelys coriacea* através de amostras oriundas das praias de Povoação e Regência, litoral norte do estado do Espírito Santo, Brasil, e estimar a razão sexual da população reprodutiva, já que os padrões de reprodução masculina e a participação paterna nos ninhos afeta diretamente a diversidade genética das populações (Moore *et al.*, 2002).

METODOLOGIA

Amostragem

As amostras de tecidos biológicos das fêmeas e filhotes foram coletadas durante as temporadas de reprodução de 2019/2020 e 2020/2021, em parceria com a Fundação Projeto TAMAR, que monitora as praias, desde a porção sul do rio Doce (base de Comboios) e ao norte (base de Povoação), buscando os rastros das fêmeas e os ninhos depositados nas praias adjacentes à foz do Rio Doce, no distrito de Linhares, Norte do estado do Espírito Santo (Figura1).

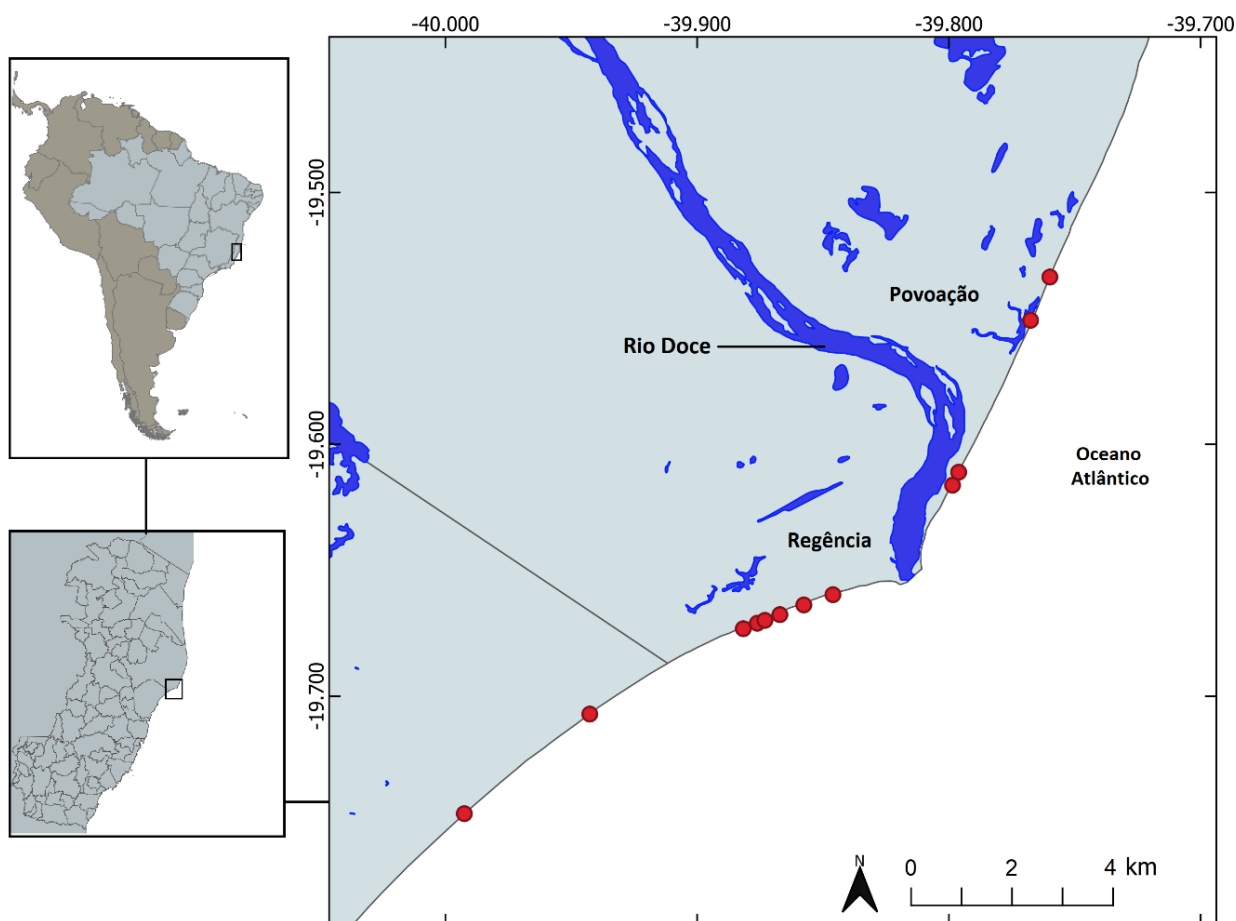


Figura 2: Mapa de localização da área de amostragem. Pontos em vermelho representam o local do primeiro flagrante das 12 fêmeas amostradas para o presente estudo.

A coleta de tecido das fêmeas ocorreu entre os meses de outubro e dezembro, durante as duas temporadas de nidificação, no período de monitoramento noturno, quando

eram flagradas durante o processo de desova (Licença de coleta # 71630-1 e acesso SisGen #A7D39D1). Após a oviposição e cobertura do ninho, foram coletadas amostras biológicas da região proximal da nadadeira anterior das fêmeas adultas com o auxílio de punches de 6 mm, sendo posteriormente armazenadas em tubos criogênicos identificados, contendo álcool a 95%. Todas as fêmeas foram marcadas com tags fornecidas pela Fundação Projeto TAMAR, garantindo que cada fêmea fosse amostrada apenas uma vez em cada temporada reprodutiva. Os ninhos foram devidamente marcados e protegidos com telas contra ação de predadores naturais.

O material biológico dos neonatos, natimortos e dos cordões umbilicais foi coletado no período (dezembro a março), após a eclosão dos ovos, que costuma ocorrer entre 70 e 80 dias depois da postura, com o auxílio de *punchs* de 3mm para os filhotes vivos ou bisturi para natimortos e cordões umbilicais e armazenado individualmente em tubos criogênicos identificados contendo álcool 95%.

Os tecidos coletados estão armazenados e identificados de acordo com procedimento padrão da coleção de tecidos do Laboratório de Genética e Evolução Molecular (LGEM/UFES).

Protocolos laboratoriais

O DNA das amostras de tecido epitelial das fêmeas e dos filhotes, e de cordão umbilical dos filhotes foi extraído utilizando o protocolo de extração salina de Bruford *et al.*, (1992). As extrações foram verificadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com corante GelRed™ (BIOTIUM) e visualizadas por transluminador UV L-PIX Touch (Loccus©). As amostras foram quantificadas através do espectrofotômetro NanoDropND-100 (Thermo Scientific) e posteriormente diluídas para 50 ng/μL. As amostras com boa qualidade (não fragmentado ou contaminado) e quantidade de DNA foram utilizadas para as análises subsequentes.

Os seis microssatélites escolhidos para genotipagem (Tabela 1) foram todos isolados para a espécie estudada e amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) a qual foi realizada utilizando para cada amostra 1x Tampão, 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen®), 0,2 mM DNTP's, 0,16 μM para cada primer (forward e reverse), 0,16 μM fluorescência, 0,5 U Taq Platinum (Invitrogen®) e 1 μL DNA (50 ng/μL). Todas as PCRs foram realizadas em termociclador Veriti™ (Applied Biosystems). Os controles,

positivo e negativo, foram aplicados a cada reação de PCR para assegurar a não contaminação dos reagentes. O material amplificado foi aplicado a um multiplex, em que o mix continha 7,0 µl de formamida altamente deionizada (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems), 0,5 µl de GeneScan 500 LIZ® size standard e 0,5 µL dos produtos amplificados de cada um dos seis marcadores moleculares. O material foi genotipado em Analisador Automático de DNA ABI Prism 3500 (Thermo Fisher Scientific). Todos estes procedimentos ocorreram no Núcleo de Biodiversidade Genética Luiz Paulo de Souza Pinto (NuBiGen) da UFES.

Tabela 1: Descrição das condições da PCR e das fluorescências utilizadas para a amplificação dos seis marcadores microssatélites utilizados no estudo

Locus	Condição da PCR	Fluorescência	Referência
LB145	1x (94°C, 2'), 50x (94°C, 10"; 55°C, 20"; 72°C, 20"), 8x (94°C, 30", 53°C, 30", 72°C, 30"), 1x (72°C, 30') 10°C ∞	FAM	Roden & Dutton, 2010
DERM 05		PET	
DERM 11		NED	
DERM 22	1x (95°C, 5'), 20x (95°C, 30", 60°C -0,5°C/ciclo, 30"; 72°C, 1'), 24x (95°C, 30", 50°C, 30", 72°C, 1')	NED	Alstad <i>et al.</i> , 2011
DERM 38	1x (72°C, 30') 10°C ∞	VIC	
DERM 48		FAM	

Análise de dados

As análises de múltipla paternidade foram realizadas utilizando um número máximo de 20 e um mínimo de 6 filhotes por ninho. Os picos dos alelos obtidos foram analisados no Programa Geneious (Kearse *et al.*, 2012). Uma porcentagem dos filhotes estudados (10%) foi genotipada em duplicada para os seis marcadores para o cálculo da taxa de erro da genotipagem. Os alelos visualizados no programa foram registrados tanto manualmente, quanto automaticamente. Para a leitura dos alelos, foi feita uma padronização alélica com todas as fêmeas de *Dermochelys coriacea* presentes no banco de dados do LGEM.

Os dados de heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), probabilidades de identidade (PI - medida estatística utilizada para determinar a probabilidade de dois indivíduos,

escolhidos ao acaso, terem exatamente o mesmo genótipo em um locus específico - Waits & Paetkau (2005)) e de exclusão (PE - probabilidade de que um indivíduo que não é o pai biológico seja excluído como tal com base em seu genótipo – Chakraborty & Stivers (1996)) foram gerados utilizando o software GenAlEx (Peakall & Smouse, 2012) considerando apenas as fêmeas amostradas. A análise dos genótipos para verificar a presença de alelos nulos foi realizada com o programa R (Ihaka & Gentleman, 1996), utilizando o pacote PopGenReport e o equilíbrio de ligação entre todos os pares de loci foi testado com o pacote Poppr do programa R (Kamvar, 2014).

Os alelos maternos foram determinados diretamente por meio da genotipagem das amostras das fêmeas e apenas os descendentes com pelo menos um alelo materno para cada marcador estudado foi considerado para as análises posteriores. Os alelos paternos foram inferidos a partir de genótipos dos descendentes uma vez contabilizados os alelos maternos nos descendentes. A presença de um alelo paterno extra, indicando um pai adicional em apenas um descendente na progênie de uma mãe, foi classificado como uma mutação (Zbinden *et al.*, 2007).

O programa COLONY 2.0 (Jones, 2010) foi utilizado para a identificação de parentesco e obtenção dos genótipos paternos, onde as fêmeas e suas respectivas proles foram analisados juntas, utilizando os seguintes parâmetros: sistema de acasalamento poligâmico, consanguinidade, clones, espécies dióicas e diplóides. Foi determinado o método de análise Full-Likelihood (FL), sendo este considerado o mais preciso segundo Wang (2012), no parâmetro alta precisão de probabilidade. As corridas foram executadas assumindo a taxa de erro de exclusão alélica de 0.0000 e taxa de erro de genotipagem de 0.0001. A razão sexual foi estimada através da divisão do número total de machos evidenciados pelo número total de fêmeas amostradas.

RESULTADOS

Foram coletadas amostras de duas fêmeas entre as seis flagradas na temporada 2019/20 e 10 entre as 15 flagradas na temporada 2020/21 (Figura 2). Além das amostras das fêmeas, foram coletadas amostras de 46 filhotes dos dois ninhos (21 e 25 de cada ninho) das duas fêmeas amostradas na temporada 2019/20 e 181 filhotes (entre 6 e 25 de cada ninho) de 13 ninhos das 10 fêmeas amostradas, pois três fêmeas tiveram dois ninhos amostrados na temporada 2020/21.

Dentre as 227 amostras de filhotes coletadas, foram genotipadas com sucesso 201 amostras de filhotes (90, 9%) dos 15 ninhos, sendo que para alguns filhotes no máximo um locus foi aceito como *missing data* (Tabela C – Material Suplementar). Vinte e seis filhotes genotipados foram excluídos das análises por uma das três razões a seguir: (1) quando nenhum dos alelos maternos eram encontrados nos filhotes de determinado ninho, evidenciando potenciais mutações nos alelos maternos, (2) quando houve evidência de potenciais mutações nos alelos paternos (ver metodologia) e (3) quando o indivíduo genotipado apresentou *missing data* para mais de um loci. O número de filhotes analisados por ninho variou de 5 a 20, com média de 13,4 filhotes por ninho (Tabela 3). Dessa forma, no total, foram analisadas amostras de 12 fêmeas, 15 ninhos e 201 filhotes para seis loci de marcadores microssatélites, sendo 36 filhotes de dois ninhos da temporada 2019/20 e 165 de 13 ninhos da temporada de 2020/2021 (Tabelas 2 e 3).

As 12 fêmeas tiveram os alelos definidos sem nenhum *missing data* para os seis loci analisados (Tabela B – Material Suplementar) e seus genótipos foram utilizadas para determinar as frequências alélicas na população reprodutiva (Figura 2) e para os cálculos de número de alelos, heterozigosidades e Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 2). O número de alelos por loci dos marcadores microssatélites utilizados variou de 5 a 9 (Tabela 2) e não houve evidência de desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para nenhum loci após correção de Bonferroni. As heterozigosidades observadas e esperadas por loci para o conjunto de dados das fêmeas variou de 0.58 a 1.00 e 0.69 a 0.86, respectivamente (Tabela 2). A taxa de erro foi zero para os seis marcadores utilizados e não houve evidência de desequilíbrio de ligação entre os pares de loci analisados.

Tabela 2: Relação dos marcadores nucleares microssatélites, sequência dos primers, tamanho dos alelos e dados de diversidade genética para as 12 fêmeas analisadas

Locus	Primer (5' - 3')	Range (pb)		Na	Ho	He	pEHW		
		Eperado	Observado						
lb145	GGCCTCCACACAAATAAATAAA CATTCACCTTACGCAGAAGAA	121	197	139	175	9	1,00	0,83	1,00
derm48	GTTTCTAAAAGAAGAGACGCAAGAT AGACGGAGCACATACAAGATA	354	380	354	386	5	0,75	0,69	1,00
derm38	CCTAATGTCGACAGGCAACC GTTTCCCACCCAGTCTAGAAGGTC	180	234	177	209	6	0,58	0,78	0,17
derm22	GCTTCCTAAACAGAATGCCAAG GTTTGAGAGAAATTCAGCCCAGCA	225	285	229	269	5	0,92	0,75	0,97
derm11	TACTACATTAAC TTCCAGCAG GTTTGCCGTCTTAAATTCTTTATGT	348	400	340	388	8	1,00	0,86	1,00
derm05	TGTCTCAGTGTTGGGCTCTA GTTTCTAACTTGACCTTTGGGAATC	228	280	230	272	7	0,92	0,79	0,77

Na= Número de alelos, He: Heterozigosidade esperada, Ho: heterozigosidade observada e *p*-valor do desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni.

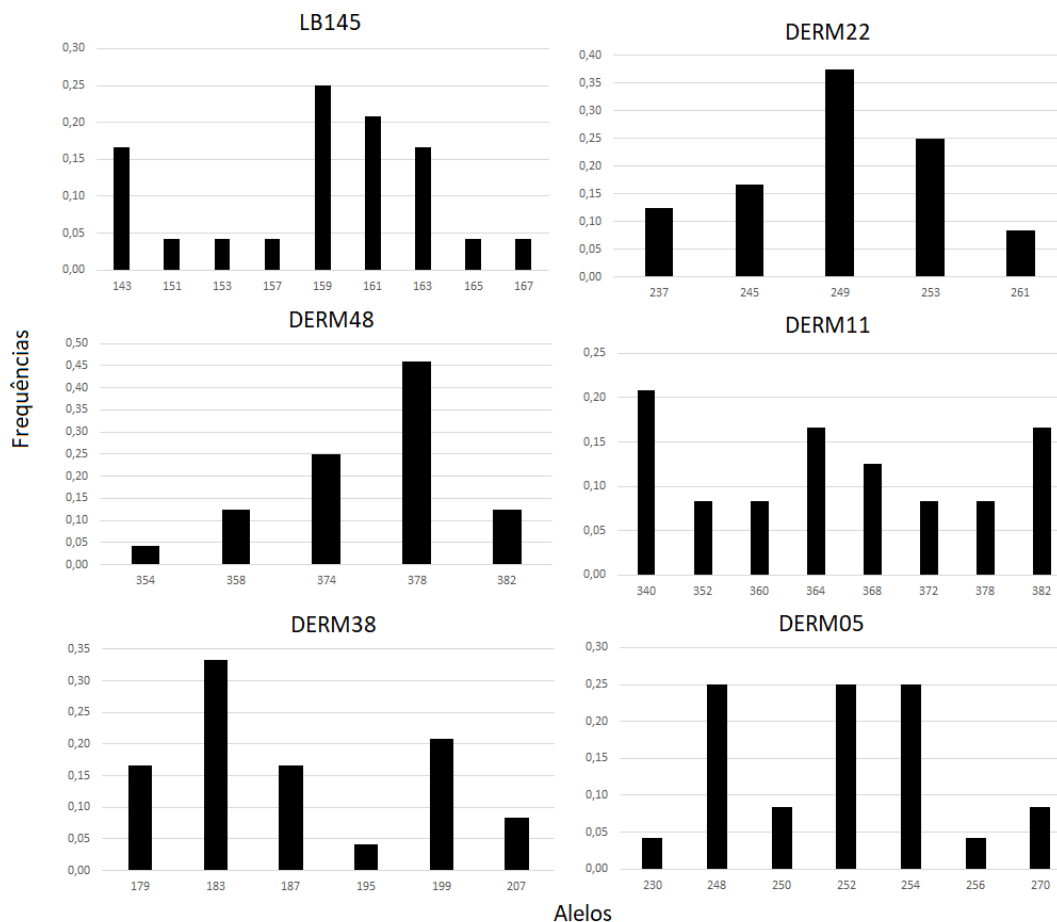


Figura 3: Frequência alélica para os seis marcadores utilizando as 12 fêmeas analisadas

A probabilidade de identidade (PI) e a probabilidade de exclusão (PE), para o conjunto de dados das fêmeas em fase reprodutiva do Espírito Santo (Vargas *et al.* 2022 – N=29), considerando os seis marcadores foi de $5,7 \times 10^{-8}$ e 0,97, respectivamente.

O teste de alelos nulos utilizando todo o conjunto amostral (N=201) apresentou resultados satisfatórios para cinco dos seis marcadores utilizados e uma taxa um pouco mais elevada (8%) para o marcador Lb145.

A poliandria, ou MP, ocorreu em 9 de 15 ninhinhos, ou seja, em 60% dos ninhinhos estudados. O número total de machos inferidos foi de 17 (Tabela A, Material suplementar), o número de machos por ninho variou de dois a cinco e a média de machos por ninho foi de 1,133 (Tabela 3).

A razão sexual reprodutiva dentro da população foi de uma fêmea para cada 1,417 machos. Esse valor foi calculado dividindo-se o número total de machos identificados (N=17) pelo de número de fêmeas amostradas nas duas temporadas (N=12).

Dos 17 machos inferidos, sete apresentaram poliginia, ou seja, 41,17% do total contribuiu geneticamente para prole de mais de uma fêmea na mesma temporada. Nove dos 17 pais encontrados contribuíram para os dois ninhos de fêmeas coletados consecutivamente (1 macho contribuiu para os 2 ninhos da fêmea 2704, 3 machos para os 2 ninhos da 2706 e 6 para os 2 ninhos da 2709), mas apenas três dos seis ninhos apresentaram múltipla paternidade (Figura 4). Três dos sete machos que apresentaram comportamento de poliginia contribuíram também para mais de um ninho da mesma fêmea (Pai 7, Pai 8 e Pai 13 - Figura 4).

ID Fêmea	Temporada	N filhotes coletados/ninho	N filhotes genotipados/ninho	N macho(s)	MP
SMV0682	2019/20	21	19	1	Não
SMV0689	2019/20	25	17	2	Sim
SMV2699	2020/21	22	20	2	Sim
SMV2700	2020/21	20	19	2	Sim
SMV2702	2020/21	16	14	2	Sim
SMV2703	2020/21	6	5	1	Não
SMV2704*	2020/21	12_10	12_10	1_1	Não/Não
SMV2706*	2020/21	12_8	11_8	1_2	Não/Sim
SMV2708	2020/21	20	19	1	Não
SMV2709*	2020/21	18_21	15_17	4_5	Sim/Sim
SMV2710	2020/21	6	5	2	Sim

SMV2711	2020/21	10	10	3	Sim
Total=12		Total= 15 ninh		N de pais =17	60%

Tabela 3- Informações dos 15 ninh

* Fêmeas com dois ninh

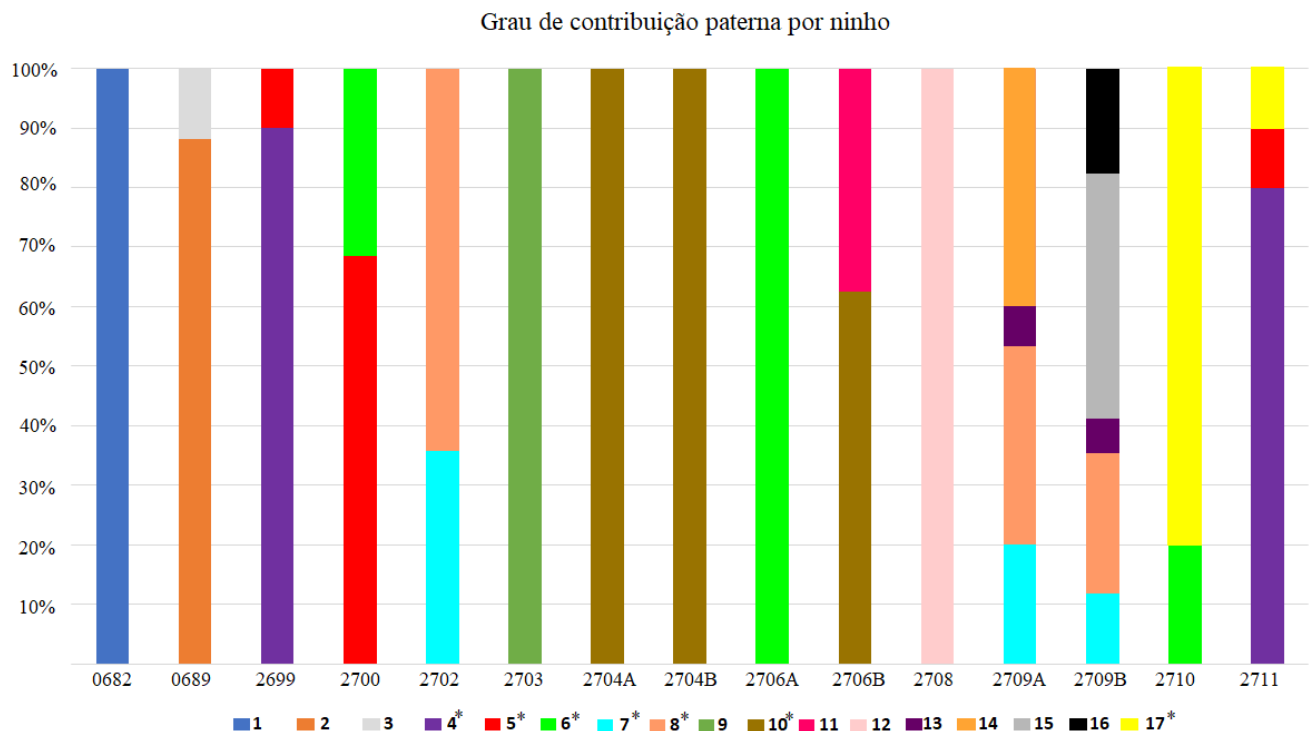


Figura 4: Contribuição relativa dos 17 machos estimados pelo Colony (cada macho está representado por uma cor) para os filhotes genotipados dos 15 ninh

DISCUSSÃO

Poliandria e Poliginia

O estudo demonstrou que existe um alto nível de múltipla paternidade (60%) para a população da espécie *Dermochelys coriacea* que desova em praias próximas à foz do Rio Doce, o que sugere que o sistema de acasalamento seja bastante poliândrico em comparação a estudos realizados em outras populações (Tabela 4). Para a espécie, a taxa

de múltipla paternidade do presente estudo torna-se a mais alta já registrada, tendo em vista que a taxa mais elevada já reportada foi de 41,7 % para a população de St. Croix no Atlântico Norte (Stewart e Dutton, 2011). Este foi o primeiro estudo sobre esse comportamento para a população da espécie no Brasil, que possui poucas fêmeas em estágio reprodutivo (Colman *et al.* 2019; Vargas *et al.*, 2022).

Tabela 4- Taxa de poliandria e poliginia encontrada em estudos posteriores utilizando a espécie *Dermochelys coriacea*

População	% Poliandria	% Poliginia	N° de loci	N fêmeas analisadas	Referência
St. Croix	Não observado	Não observado	6	4	Dutton <i>et al.</i> , 1998
Playa Grande	10%	(sem dados)	3	20	Crim <i>et al.</i> , 2002
St. Croix	41.7%	Não observado	7	12	Stewart & Dutton, 2011
St. Croix	23.6%	Não observado	7	58	Stewart & Dutton, 2014
Playa Gandoca	22.22%	Não observado	3	18	Figgner <i>et al.</i> , 2016
Foz do rio Doce (ES)	60%	41,17%	6	12	Presente estudo

* Cita um baixo nível de poliginia, mas não expõe os dados de forma clara.

Os dados genéticos obtidos para o conjunto dos seis marcadores utilizados fornecem robustez aos dados de paternidade obtidos, uma vez que os seis loci atendem as premissas do equilíbrio de Hardy-Weinberg, possuem quantidade de alelos e frequências alélicas que demonstram a diversidade destes marcadores (Figura 3), o que é um fator-chave para identificação de indivíduos e estudos de parentesco. Ademais, os loci combinados apresentaram uma PI de $5,7 \times 10^{-8}$, um valor baixo, indicando que os alelos são bem distribuídos na população. A PE também se mostrou satisfatória para o conjunto de dados, pois os loci combinados apresentaram um bom poder de exclusão (0,97).

Apesar de um marcador (Lb145) apresentar um valor um pouco mais alto para a taxa de alelos nulos, combinado com os demais marcadores, esse pareceu não alterar de forma significativa os resultados, uma vez que, um teste feito sem esse marcador gerou apenas mais um genótipo paterno diferente, levando a inferência de um pai a mais para o conjunto de dados. Além disso, muitos trabalhos publicados não apresentam uma estimativa segura para a taxa de alelos nulos (Dakin & Avise, 2004). Para o presente trabalho, a quantidade de homozigotos para o marcador não se mostrou prejudicial na identificação de parentesco.

A múltipla paternidade, do ponto de vista populacional, é um comportamento que pode favorecer a garantia de fertilização, aumento da viabilidade da prole e, conseqüentemente, gerando maior diversidade genética (Lee & Hays, 2004). Para os machos, a poliginia confere uma estratégia eficiente para maximizar a propagação de seus genes com um custo relativamente baixo em termos de energia e risco (Jennions & Petrie, 2000; Lee & Hays, 2004), potencialmente aumentando o número de descendentes, o que contribuiria diretamente para a sua maior aptidão evolutiva (Lee & Hays, 2004; Jensen *et al.*, 2006). O comportamento de acasalamento da fêmea com mais de um macho envolve um custo maior, pois aumenta o risco de mortalidade devido à exposição à predação, doenças transmitidas e perda de energia através do assédio intenso dos machos (Jennions & Petrie, 2000; Lee & Hays, 2004).

As tartarugas marinhas são animais solitários que não possuem cuidado parental ou comportamentos sociais complexos. Um único acasalamento geralmente é suficiente para fertilizar todos os ovos de uma fêmea durante uma temporada de nidificação (Lee & Hays, 2004). Portanto, não há benefícios diretos aparentes, como cuidados parentais ou presentes nupciais, associados à poliandria para as fêmeas (Figgner *et al.*, 2016). Sendo assim, esse comportamento parece favorecer a espécie como um todo, em vez de apenas o indivíduo, pois aumentam, potencialmente, a sobrevivência e o sucesso reprodutivo do grupo ou dos parentes próximos, mesmo que possam ser custosos para o indivíduo (Lee & Hays, 2004, Figgner *et al.* 2016).

Os dados obtidos no presente estudo não apontam a contribuição de um mesmo macho entre as duas temporadas, ou seja, os machos que fertilizaram as fêmeas na temporada 2019/20 parecem não ter contribuído geneticamente para a prole da temporada 2020/21, apesar de alguns estudos, com dados de telemetria, indicarem que os machos retornam para os *breeding grounds* (áreas de reprodução) anualmente (James *et al.* 2005 e Hays *et al.* 2014), as fêmeas retornam com um tempo maior (de 2 em 2 anos ou mais – Colman *et al.* 2019). Sendo assim, a análise de apenas dois ninhos na primeira temporada estudada pode não ter sido suficiente para indicar a contribuição de um mesmo macho em temporadas consecutivas. Dentro da temporada 2020/21, 7 machos copularam com mais de uma fêmea, gerando um índice de 41,17% de poliginia (Figura 4 e Tabela D), mas a contribuição de cada macho para geração dos filhotes dos diferentes ninhos com múltipla paternidade variou muito (o pai 3 gerou apenas 2 filhotes de um ninho e o pai 4 gerou 26 filhotes de 2 ninhos). Além disso os ninhos 689, 2699 e 2711 apresentam múltipla paternidade, porém há uma porcentagem muito maior de um macho sobre os outros. Esses

dados podem sugerir que as fêmeas realizam cópulas subsequentes, com machos diferentes antes da temporada de nidificação e quando atingem a fase reprodutiva do ciclo, os espermatozoides viáveis fecundam os óvulos em proporções variadas. Além disso, é possível que exista algum mecanismo de competição espermática, que afete o resultado da fertilização, sendo que o esperma de um macho prevaleça sobre o esperma de outros machos gerando a maior parte da prole em uma ninhada ou ao longo de todas as ninhadas em uma temporada de reprodução (FitzSimmons, 1998; Chevalier *et al.*, 1999). A competição espermática poderia explicar a dominância de contribuição de um macho em um ninho, a ausência de contribuição de machos em ninhos de uma mesma fêmea dentro de uma mesma temporada reprodutiva ou até a ausência de múltipla paternidade, pois mesmo que ocorram várias cópulas, isso não garantiria o sucesso da fertilização (FitzSimmons, 1998; Chevalier *et al.*, 1999; Figgner *et al.* 2016). Essas diferenças com relação a proporção de contribuição paterna por ninho podem se dar tanto devido a competição espermática, mas também devido à viabilidade dos espermatozoides armazenados, que talvez sofram influência do tempo em que passam armazenados no oviduto, sugerindo que quanto mais tempo armazenados mais chances de se tornarem inviáveis e assim machos que copulam mais próximo ao período da maturação dos óvulos trariam resultados mais dominantes sobre outros (Gist *et al.*, 2001).

A contribuição de diferentes machos para ninhos diferentes das mesmas fêmeas sugere competição espermática, como explicado anteriormente, mas outra hipótese é a possibilidade de que ocorram acasalamentos no intervalo internidal dentro da mesma temporada reprodutiva. Segundo dados obtidos por telemetria para a população do ES, as fêmeas nadam longas distâncias no intervalo entre desovas, dispersando mais de 160km de distância da praia de desova, o que possibilitaria o encontro com outros machos e cópula (Almeida *et al.*, 2011). Além da possibilidade de ocorrer competição espermática e/ou acasalamentos no período internidal, existe também o efeito da chance, onde, mesmo que vários machos tenham fertilizado a mesma fêmea, devido à amostragem de apenas uma parte dos filhotes de cada ninho, nem todos os pais tenham sido evidenciados nas nossas análises. Sendo assim, análises mais detalhadas, envolvendo um N maior de ninhos por fêmea e/ou mais filhotes por ninho, podem fornecer melhores inferências sobre estoque de espermatozoides, competição espermática e múltiplos acasalamentos dentro de uma temporada (Figgner *et al.*, 2016).

Até o momento, não há muitos dados detalhados de poliginia para tartaruga-de-couro, o que faz deste achado um dos primeiros registros do comportamento para a espécie. Apenas um trabalho relatou uma baixa taxa de poliginia para a população de *D. coriacea* de Playa Grande, na Costa do Pacífico, (Crim *et al.*, 2002), mas não deixou claro o valor encontrado. No entanto, em outras espécies de tartaruga marinha esse aspecto reprodutivo já foi bem observado. Gaos *et al.* (2018) encontraram um alto índice de poliginia para uma população pequena de *Eretmochelys imbricata* (31.8%) de El Salvador, no leste do Oceano Pacífico. Enquanto Turkozan *et al.* (2019) encontraram poliginia em 4.4% dos ninhos analisados de *Chelonia mydas* na Turquia, Mar Mediterrâneo. Dessa forma, não se sabe se o comportamento de poliginia é comum para as espécies ou não, mas esses dados reforçam o comportamento promíscuo, já conhecido, das tartarugas marinhas (Crim *et al.* 2002).

Razão sexual e sua importância para a conservação

A razão sexual encontrada para a população reprodutiva do ES foi de 1,41 machos por fêmea, porém há uma tendência de que haja mais nascimento de filhotes fêmeas do que machos para a população da tartaruga-de-couro que desova no ES (64,1%), quando observado dados de temperatura de incubação de ninhos (Colman, 2018). A discrepância entre esses dados pode sugerir que: (1) Apesar de nascerem mais fêmeas, há maior chance de sobrevivência de filhotes machos que se desenvolvem em temperaturas mais baixas, pois temperaturas muito altas podem ser fatais para o desenvolvimento dos embriões e dos ovos, o que pode aproximar as frequências de machos/fêmeas na população adulta (Lasala *et al.* 2018). (2) A razão sexual da população adulta de uma região pode não refletir exatamente a mesma razão sexual dos filhotes nascidos naquela região, pois as fêmeas podem copular com machos nascidos em outras localidades, em regiões de estoques mistos (Vargas *et al.* 2019) durante as rotas migratórias ou em áreas de alimentação, além dos machos originários da mesma região de desova delas. Nossos dados indicam que a segunda hipótese parece ser plausível, pois a ausência de endogamia para a população de fêmeas de tartaruga-de-couro do ES (Vargas *et al.* 2022) pode ser explicada pela fertilização das fêmeas do ES por machos de outros estoques genéticos. Além de evitar endogamia, esses eventos têm potencial de aumentar a diversidade genética das populações e contribuir para uma melhor saúde genética dessa população tão pequena, que historicamente sofrem com pesca incidental (Monteiro *et al.* 2016),

consumo de ovos e carne (Birky *et al.*, 2021), poluição dos oceanos (Sousa-Guedes *et al.*, 2023), entre outras ameaças que implicam diretamente na redução do tamanho populacional. Todas essas ameaças somadas ao aquecimento global devem ser consideradas quando o objetivo é a conservação de espécies ameaçadas, e estudos como este sendo produzidos ao longo do tempo podem indicar tendências de aumento ou diminuição da razão sexual e das populações reprodutivas e ajudar nas medidas de conservação ao proteger os animais, não apenas em seus locais de desova, mas também em corredores migratórios e áreas de alimentação. O banco de genótipos gerado no presente trabalho também poderá ser usado por outros trabalhos do tipo no Brasil, como no Piauí, e no mundo, para melhor entender os padrões de fluxo gênico em diferentes áreas reprodutivas das espécies.

CONCLUSÃO

Até hoje, existem lacunas no que diz respeito aos sistemas de acasalamento das tartarugas-de-couro, especialmente do ponto de vista dos machos. Além disso, informações básicas sobre onde são as áreas de acasalamento, comportamentos de corte e de cópula ainda são escassas. As evidências encontradas nesse estudo indicam taxa de poliandria na faixa de 60%, poliginia em 41% e razão sexual da população reprodutiva de 1,42 machos para cada fêmea. Esses dados enriquecem o conhecimento da biologia da espécie no Brasil, já que são as primeiras informações relacionadas à múltipla paternidade e razão sexual reprodutiva para a espécie no país. Esses novos *insights* sobre os padrões de acasalamento podem ajudar a gerenciar e avaliar a saúde genética dos estoques de *Dermochelys coriacea* em todo o mundo e podem ajudar a ajustar o foco dos esforços de conservação, uma vez que a diversidade genética desempenha um papel importante na sobrevivência futura desta espécie e na sua capacidade de se adaptar às ações antrópicas e a mudanças ambientais, como o crescente aquecimento global.

REFERÊNCIAS

- Almeida, A. P., Eckert, S. A., Bruno, S. C., Scalfoni, J. T., Giffoni, B., López-Mendilaharsu, M., & Thomé, J. C. (2011). Satellite-tracked movements of female leatherbacks, *Dermochelys coriacea* (Testudines, Dermochelyidae), from an endangered nesting population in Southeastern Brazil. *Endangered Species Research*, 15, 77–86.
- Alstad, T. I., Shamblin, B. M., Bagley, D. A., Ehrhart, L. M., & Nairn, C. J. (2011). Isolation and characterization of tetranucleotide microsatellites from the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *Conservation Genetics Resources*, 3(3), 457–460. <https://doi.org/10.1007/s12686-010-9378-z>
- Barata, P. C. R., & Fabiano, F. F. C. (2002). Evidence for leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*) nesting in Arraial do Cabo, State of Rio de Janeiro, and a review of occasional leatherback nests in Brazil. *Marine Turtle Newsletter*, 96, 13–16.
- Birky, C., Bidaisee, S., & Pichainarongk, S. (2021). Leatherback sea turtle meat and eggs consumption: Evaluation of public health significance in Grenada, West Indies. *World Journal of Agriculture and Soil Science*, 6(3), Article WJASS.MS.ID.000640.
- Bowen, B. W., Kamezaki, N., Limpus, C. J., Hughes, G. R., Meylan, A. B., & Avise, J. C. (1994). Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. *Evolution*, 48(6), 1820–1828. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1994.tb02217.x>
- Bowen, B. W., & Karl, S. A. (1996). Population structure, phylogeography, and molecular evolution. In P. L. Lutz & J. A. Musick (Eds.), *The Biology of Sea Turtles* (pp. 29-50). Boca Raton: CRC Press.
- Brasil. (2022). Portaria MMA nº 148 de 07 de junho de 2022. Altera os Anexos da Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014, da Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014, e da Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014, referentes à atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. *Diário Oficial da União*, 08.06.2022, Edição 108, Seção 1, p. 74. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148

_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf

Chakraborty, R., & Stivers, D. N. (1996). Paternity exclusion by DNA markers: effects of paternal mutations. *Journal of Forensic Sciences*, 41(4), 671-677. PMID: 8754581.

Colman, L. P., Thomé, J. C. A., Almeida, P., Baptistotte, C., Barata, P. C. R., Brederick, A. C., Ribeiro, F. A., Vila-Verde, L., & Godley, B. J. (2019). Thirty years of leatherback turtle *Dermochelys coriacea* nesting in Espírito Santo, Brazil, 1988–2017: Reproductive biology and conservation. *Endangered Species Research*, 39, 147–158.

Crim, J. L., Spotila, L. D., Spotila, J. R., O'Connor, M., Reina, R., Williams, C. J., & Paladino, F. V. (2002). The leatherback turtle, *Dermochelys coriacea*, exhibits both polyandry and polygyny. *Molecular Ecology*, 11, 2097–2106.

Dakin, E. E., & Avise, J. C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93(5), 504–509. doi:10.1038/sj.hdy.6800545

Eckert, S. A., Bagley, D., Kubis, S., Ehrhart, L., Johnson, C., Stewart, K., & DeFreese, D. (2006). Internesting and postnesting movements and foraging habitats of leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) nesting in Florida. *Chelonian Conservation and Biology*, 5(2), 239–248. doi:10.2744/1071-8443(2006)5[239]2.0.co;2

Eckert, K. L., Wallace, B. P., Frazier, J. G., Eckert, S. A., & Pritchard, P. C. H. (2012). Synopsis of the biological data on the leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*). U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Biological Technical Publication BTP-R4015-2012.

Figgenger, C., Chacón-Chaverri, D., Jensen, M. P., & Feldhaar, H. (2016). Paternity revisited in a recovering population of Caribbean leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 475, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.11.014>

FitzSimmons, N. N., Limpus, C. J., Norman, J. A., Goldizen, A. R., Miller, J. D., & Moritz, C. (1997). Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial DNA

markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(16), 8912–8917. doi:10.1073/pnas.94.16.8912

Gilpin, M. E., & Soulé, M. E. (1986). Minimum viable populations: processes of species extinction. In M. E. Soulé (Ed.), *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity* (pp. 19–34). Sunderland, MA: Sinauer.

Gist, H. D., Dawes, M. S., Turner, W. T., Sheldon, S., & Congdon, J. D. (2001). Sperm storage in turtles: A male perspective. *Journal of Experimental Zoology*, 292(2), 180–186. <https://doi.org/10.1002/jez.1153>

Goff, G. P., Lien, J., Stenson, G. B., & Fretey, J. (1994). The migration of a tagged leatherback turtle, *Dermochelys coriacea*, from French Guiana, South America to Newfoundland, Canada in 128 days. *Canadian Field-Naturalist*, 108, 72–73.

Girondot, M., Mourrain, B., Chevallier, D., & Godfrey, M. H. (2021). Maturity of a giant: Age and size reaction norm for sexual maturity in Atlantic leatherback turtles. *Marine Ecology Progress Series*, 42, Article e12631. <https://doi.org/10.1111/maec.12631>

Hamann, M., Godfrey, M., Seminoff, J., et al. (2010). Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endangered Species Research*, 11(3), 245–269. doi:10.3354/esr00279

Hays, G. C., Doyle, T. K., & Houghton, J. D. R. (2018). A paradigm shift in the trophic importance of jellyfish? *Trends in Ecology & Evolution*. doi:10.1016/j.tree.2018.09.001

Hays, G. C., Fossette, S., Katselidis, K. A., Schofield, G., & Gravenor, M. B. (2010). Breeding periodicity for male sea turtles, operational sex ratios, and implications in the face of climate change. *Conservation Biology*, 24(6), 1636–1643. doi:10.1111/j.1523-1739.2010.01531.x

Hitipeuw, C., Dutton, P. H., Benson, S., Thebu, J., & Bakarbesy, J. (2007). Population status and interesting movement of leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*, nesting on the northwest coast of Papua, Indonesia. *Chelonian Conservation and Biology*, 6(1), 28–36. [https://doi.org/10.2744/1071-8443\(2007\)6\[28:psaimo\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2744/1071-8443(2007)6[28:psaimo]2.0.co;2)

ICMBIO. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume IV*. Brasília, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018a. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoesdiversas/livro_vermelho_2018_vol4.pdf

James, M. C., Myers, R. A., & Ottensmeyer, C. A. (2005). Behaviour of leatherback sea turtles, *Dermochelys coriacea*, during the migratory cycle. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272, 1685-1691. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3110>

James, M., Eckert, S., & Myers, R. (2005). Migratory and reproductive movements of male leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*). *Marine Biology*, 147, 845-853. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-1581-1>

Karl, S. A. (2008). The effect of multiple paternity on the genetically effective size of a population. *Molecular Ecology*, 17(18), 3973–3977. doi:10.1111/j.1365-294x.2008.03902.x

Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2, e281. doi:10.7717/peerj.281

Lasala, J. (2011). Multiple Paternity of *Caretta caretta* within the Northwestern Atlantic Ocean Population on Wassaw Island, Ga. *Electronic Theses and Dissertations*, 757. Disponível em: <https://digitalcommons.georgiasouthern.edu/etd/757>

Marcovaldi, M. A., Godfrey, M. H., & Mrosovsky, N. (1997). Estimating sex ratios of loggerhead turtles in Brazil from pivotal incubation duration. *Canadian Journal of Zoology*, 75(5), 755–770.

Monteiro, D. S., Estima, S. C., Gandra, T. B. R., Silva, A. P., Bugoni, L., Swimmer, Y., & Secchi, E. R. (2016). Long-term spatial and temporal patterns of sea turtle strandings in southern Brazil. *Marine Biology*, 163(12). <https://doi.org/10.1007/s00227-016-3018-4>

Moore, M. K., & Ball, R. M. (2002). Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 11(2), 281–288. doi:10.1046/j.1365-294x.2002.01426.x

Morreale, S. J., Standora, E. A., Spotila, J. R., & Paladino, F. V. (1996). Migration corridor for sea turtles. *Nature*, *384*(6607), 319–320. <https://doi.org/10.1038/384319a0>

Pritchard, P. C. H. (1976). Post-nesting movements of marine turtles (Cheloniidae and Dermochelyidae) tagged in the Guianas. *Copeia*, *1976*, 749–754.

Roden, S. E., & Dutton, P. H. (2010). Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci in the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) and cross-species amplification. *Conservation Genetics Resources*, *3*(1), 49–52. <https://doi.org/10.1007/s12686-010-9284-4>

Spotila, J. R. (2004). *Sea turtles: A complete guide to their biology, behavior, and conservation*. Johns Hopkins University Press.

Sato, M., & Sato, K. (2013). Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1833*(8), 1979–1984. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.010>

Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, *9*(5), 615–629. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>

Sousa-Guedes, D., Sillero, N., Bessa, F., & Marco, A. (2023). Plastic pollution can affect the emergence patterns of loggerhead turtle hatchlings. *Animal Conservation*, *26*(4), 492–501. <https://doi.org/10.1111/acv.12837>

Soto, J. M. R., Beheregaray, R. C. P., & Rebello, R. A. R. P. (1997). Range extension: Nesting by *Dermochelys* and *Caretta* in southern Brazil. *Marine Turtle Newsletter*, *77*, 6–7.

Stewart, K. R., & Dutton, P. H. (2011). Paternal genotype reconstruction reveals multiple paternity and sex ratios in a breeding population of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*). *Conservation Genetics*, *12*(5), 1101–1113. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0207-4>

Tedeschi, J. N., Mitchell, N. J., Berry, O., Whiting, S., Meekan, M., & Kennington, W. J. (2015). Reconstructed paternal genotypes reveal variable rates of multiple paternity at three rookeries of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in Western Australia. *Australian Journal of Zoology*. <https://doi.org/10.1071/zo14076>

Thomé, J. C. A., Baptistotte, C., Moreira, L. M. D. P., Scalfoni, J. T., Almeida, A. P., Rieth, D. B., & Barata, P. C. R. (2007). Nesting biology and conservation of the leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*) in the state of Espírito Santo, Brazil, 1988–1989 to 2003–2004. *Chelonian Conservation and Biology*, 6(1), 15–27. [https://doi.org/10.2744/1071-8443\(2007\)6\[15:nbacot\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2744/1071-8443(2007)6[15:nbacot]2.0.co;2)

Turkozán, O., Karaman, S., Yılmaz, C., & Beşer, N. (2019). Multiple paternity at the largest green turtle (*Chelonia mydas*) rookery in the Mediterranean. *Regional Studies in Marine Science*, 30, 100777. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100777>

Vargas, S. M., Araújo, F. C. F., Monteiro, D. S., Estima, S. C., Almeida, A. P., Soares, L. S., & Santos, F. R. (2008). Genetic diversity and origin of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) from the Brazilian coast. *Journal of Heredity*, 99(2), 215–220. <https://doi.org/10.1093/jhered/esn007>

Vargas, S. M., Lins, L. S. F., Molfetti, É., Ho, S. Y. W., Monteiro, D., Barreto, J., Colman, L., Vila-Verde, L., Baptistotte, C., Thomé, J. C. A., & Santos, F. R. (2019). Revisiting the genetic diversity and population structure of the critically endangered leatherback turtles in the South-west Atlantic Ocean: Insights for species conservation. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99(1), 31–41. <https://doi.org/10.1017/S0025315418000914>

Vargas, S. M., Barcelos, A. C., Rocha, R. G., Guimarães, P., Amorim, L., Martinelli, A., Santos, F. R., Erickson, J., Marcondes, A. C. J., & Ludwig, S. (2022). Genetic monitoring of the critically endangered leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) in the South West Atlantic. *Regional Studies in Marine Science*, 55, 102530. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2022.102530>

Waits, L. P., & Paetkau, D. (2005). Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: A review of applications and recommendations for accurate data collection.

Journal of Wildlife Management, 69(4), 1419–1433. [https://doi.org/10.2193/0022-541X\(2005\)069\[1419:NGSTFW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2193/0022-541X(2005)069[1419:NGSTFW]2.0.CO;2)

Wallace, B. P., Tiwari, M., & Girondot, M. (2013). *Dermochelys coriacea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T6494A43526147. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-2.RLTS.T6494A43526147.en>. Accessed on 09 July 2024.

Wallace, B. P., Tiwari, M., Girondot, M., & others. (2020). *Dermochelys coriacea* (South America). The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T6494A118780317.

Wallace, B. P., Lewison, R. L., Alfaro-Shigueto, J., & others. (2023). Marine turtle regional management units 2.0: An updated framework for conservation and research of wide-ranging megafauna species. *Endangered Species Research*, 52, 209–223. <https://doi.org/10.3354/esr01243>

Wang, J. (2012). Computationally efficient sibship and parentage assignment from multilocus marker data. *Genetics*, 191(1), 183–194. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3338259/>

Zangerl, R. (1980). Patterns of phylogenetic differentiation in the Toxochelyid and Chelonid sea turtles. *American Zoologist*, 20(3), 585–596. <https://doi.org/10.1093/icb/20.3.585>

Zbinden, J. A., Largiadèr, C. R., Leippert, F., Margaritoulis, D., & Arlettaz, R. (2007). High frequency of multiple paternity in the largest rookery of Mediterranean loggerhead sea turtles. *Molecular Ecology*, 16(17), 3703–3711. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03426.x>

