



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**



**VARIABILIDADE FENOTÍPICA E GENÉTICA
DE *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766)**

ELBA PEREIRA CHAVES

**São Luís-MA
2019**

ELBA PEREIRA CHAVES

**VARIABILIDADE FENOTÍPICA E GENÉTICA
DE *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa

Co-orientadora: Profa. Dra. Lígia Tchaicka

São Luís-MA
Dezembro-2019

Chaves, Elba Pereira.

Variabilidade fenotípica e genética de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) / Elba Pereira Chaves. – São Luís, 2020.

119 f.: il.

Tese (Doutorado) – Curso de Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Universidade Estadual do Maranhão, 2020.

Orientador: Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa.

Coorientador: Profa. Dra. Lígia Tchaicka.

1.Morfologia. 2.Tartaruga. 3.Genética. I.Título

CDU: 636.98.082

ELBA PEREIRA CHAVES

**VARIABILIDADE FENOTÍPICA E GENÉTICA
DE *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

APROVADA EM / /

Banca examinadora

Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa
Universidade Estadual do Maranhão-UEMA

Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta
Universidade Estadual do Maranhão-UEMA

Prof. Dr. Nivaldo Magalhães Piorski
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof. Dr. Rafael Cardoso
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga-UEMA
Universidade Estadual do Maranhão-UEMA

À minha filha, Elena Chaves Cantanhêde Protázio.

AGRADECIMENTOS

A Deus;

A minha família, pelo incentivo e apoio de sempre. Em especial a minha mãe, Marcelina Pereira da Silva, a minha fortaleza e razão de vida;

Aos meus tios Manoel, Roberta, Maria e Antônio, e aos meus primos que são na verdade os irmãos que a vida me presenteou (Giza, Gislaíne, Alysson, Helton, Marciana, Laura e Jacqueline,);

Ao meu marido Orlandí Cantanhêde Protázio que foi o companheiro de todas as horas para conclusão deste trabalho;

A minha madrinha Eliene Barros pelo carinho e apoio de sempre;

À Universidade Estadual do Maranhão, em especial ao Programa de Pós-Graduação Ciência Animal pelo apoio e parceria, e à Universidade Federal do Maranhão, através do Programa Bionorte pela oportunidade;

A Secretaria Municipal de Pesca e Abastecimento de São Luís, por compreender a importância da capacitação de seus servidores, em especial aos médicos veterinários: Andreia Carneiro, Francisco José Fonseca Cordeiro e Francisco Loureiro da Silva;

A Universidade de Los Andes-Colômbia e a Natália Gallego García pela parceria no desenvolvimento da pesquisa;

A Embrapa em especial ao Prof. Dr. José Ribamar Felipe Marques e ao Caio Santos Silva;

Ao Parque Zoobotânico do Museu Paraense Emílio Goeldi-PA, em especial ao prof Msc. Antonio Messias Costa, a Juliana dos Santos Batista, Tatiana Andrade Figueiredo e Jessica San Martin, o meu profundo agradecimento pela atenção e colaboração neste trabalho;

Ao Centro de Estudos dos Quelônios da Amazônia- Cequa, pela acolhida, especialmente ao Prof. Dr. Richad Vogt pela valorosa amizade e parceria em nossos estudos com quelônios de Amazônia;

A Universidade Federal do Amazonas- UFAM, principalmente aos professores Marcelo Gordo e Maria das Neves Silva Viana pela colaboração na aquisição de amostras e aos amigos Alexandre Pinheiro de Almeida, Valeria Silva Santos e Vinicius Tadeu de Carvalho que me receberam carinhosamente e me ajudaram nos dias de estadia em Manaus;

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis- IBAMA pela concessão da licença para coleta dos espécimes;

Ao Dr. Robson Waldemar da Universidade Federal do Ceará, pela parceria no compartilhamento das amostras e pela nova amizade científica;

Ao Prof. Dr. Tiago Barbalho Lima pela amizade e ao Instituto Natureza do Toc NATURATINS- Regional Araguaína pela colaboração;

As Colônias de Pescadores: Colônia Z-16 do município de São Bento-MA, em especial a Dona Dionísia e a Colônia Z-13 de Pinheiro- MA, em especial a Seu Zé Moleque; que sempre nos receberam com carinho e contribuíram para o desenvolvimento desta tese, meu eterno agradecimento, dedico a essas pessoas maravilhosas também esse trabalho;

Ao Grupo Quelônios do Maranhão-Queamar da UFMA, em especial a profa. Dra. Larissa Barreto, pela colaboração na aquisição de amostras;

Ao Grupo Granato da UEMA e a todos os alunos que me disponibilizaram seu tempo para o desenvolvimento desta pesquisa. A minha dedicada orientada Nathália Regina Aragão, e aos estimáveis alunos Samuel Lemos Mesquita e Lorena Santos Rodrigues de Araújo; E as amigas Elizângela, Soraia Alves Buarque, Tatiara Barbosa Dias Lima e Julia Boás Almeida que estiveram ao meu lado na conclusão desta pesquisa;

Aos Laboratórios de Biodiversidade Molecular e Patologia Molecular pela acolhida, treinamento e desenvolvimento deste trabalho, em especial a Hanna Gabriely Pinto Gonçalves, Larissa Sarmento, Danielle Jordany Barros Coutinho, Joseane Sousa Lima, Camila Sodré e Ítala Mayara Silva Araujo; Agradeço a todos que estiveram ao meu lado nos dias de glória e principalmente naqueles dias de dificuldades, dando-me força e encorajamento;

Ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular- GENBIMOL/UEMA de Caxias-MA em especial a profa Dra. Maria Claudene Barros, ao Prof. Elmary da Costa Fraga e Ana Priscila Medeiros Olimpio pela atenção e colaboração;

As minhas amigas de jornada profissional e da vida: Lianne Pollyanne, Almerinda Macieira Medeiros, Thércia Monroe, Selma Patrícia, Lígia Almeida, Mayara Monteles e Gislane da Silva Lopes e Hilmanara Tavares da Silva que sempre foram a mão a mais nas horas difíceis, agradeço a Deus por ter colocado todas vocês em minha vida;

As colegas de turma do doutorado e agora amigas: Ana Luisa, Vilena Aparecida Ribeiro Silva, Mayana, Mayra, Larissa que estiveram ao meu lado desde o primeiro dia de aula e me motivaram a chegar até este momento;

As inestimáveis parceiras e amigas da graduação: Ana Carolina Silva, Andreia F. Dutra, Jucyelle Campos de Oliveira e Walma Fernanda Meireles, que sempre foram meu porto de conforto e alegria ao longo dessa jornada; +

A Camila Penha Abreu pela parceria, apoio e amizade, meu sincero agradecimento;

A Daniela Cristina Pires Viana, pelas risadas, conselhos e horas dedicadas a esse trabalho;

Ao Dr. João Carlos Lopes Costa, obrigada pela disponibilidade e colaboração no desenvolvimento desta tese;

Ao professor Nivaldo Magalhães Piorski- UFMA por compartilhar seus conhecimentos sobre morfologia geométrica, pela atenção e disponibilidade em contribuir com este trabalho;

Ao Prof. Dr. José de Ribamar da Silva Junior –UEMA pela atenção e sua disponibilidade, sou grata;

Aos professores e estimáveis amigos, que sempre foram uma voz de incentivo e carinho: Alcina Vieira C. Neta, Ana Lucia Abreu Silva, Antônia Santos Oliveira, Francisca Neide Costa, Daniel Prazeres Chaves e Rafael Cardoso Carvalho;

A Prof. Dra. Lígia Tchaicka, pela amizade, por me apresentar um mundo novo (uma vida através dos olhos da genética), por todo conhecimento compartilhado, e principalmente por acreditar em mim e neste grande projeto de conservação do jurará. Meu agradecimento e carinho eternos.

E a minha grande amiga, conselheira e orientadora Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa, que sempre esteve ao meu lado (na vida profissional e pessoal) e que contribuiu grandemente para eu me tornar a pessoa que sou hoje. Agradeço profundamente sua amizade e carinho. Muito obrigada professora!

*“Disse a flor para o pequeno príncipe: é preciso
que eu suporte duas ou três larvas se quiser
conhecer as borboletas.”*

Antoine de Saint-Exupéry
(O Pequeno Príncipe)

RESUMO

CHAVES, Elba Pereira. **Variabilidade fenotípica e genética de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766)**. 2019. 119f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

A espécie *Kinosternon scorpioides* é um pequeno quelônio de água doce distribuído pelas Américas, e no Brasil principalmente nas regiões norte e nordeste. Com o objetivo de averiguar variações morfológicas e genéticas das populações do Brasil e Colômbia, utilizamos as técnicas da morfometria tradicional e geométrica, além de análises moleculares (DNA mitocondrial e nuclear). Todos os indivíduos amostrados apresentaram características fenotípicas típicas da espécie, de coloração, organização e quantidade de placas dérmicas. A morfometria linear indicou que existe diferença estatística entre o sexo, sendo os machos mais estreitos e baixos em relação às fêmeas, enquanto a morfometria geométrica mostrou variação de forma para cada sexo. Em relação à avaliação entre as populações, a partir da morfometria geométrica, estas organizaram-se em grupos, separadas de acordo com as regiões geográficas amostradas, sendo que aquelas próximas entre si compartilham o mesmo formato. O estudo genético indicou que os indivíduos brasileiros são diferentes dos colombianos, apresentando uma diversidade genética média de 3% (mtDNA). Esta variação foi acompanhada pelos resultados do microssatélites, com índice de fixação- F_{st} e Coeficiente R_{st} altos, além de revelar que estas populações estão estruturadas, com índices de endogamia baixos. Os resultados obtidos são importantes para o conhecimento da espécie *K. scorpioides* brasileira, e permitirá subsidiar outros estudos sobre manejo e conservação.

Palavras-Chave: tartaruga; morfologia; filogenia.

ABSTRACT

CHAVES, Elba Pereira. Phenotypic and genetic **variability of *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766)**. 2019. 119f. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) - Federal University of Maranhão, São Luís, 2019.

The *Kinosternon scorpioides* species is a small freshwater chelonian distributed throughout the Americas, and in Brazil mainly in the north and northeast regions. With the average goal of morphological and genetic changes in Brazil and Colombia, used as traditional and geometric morphometric techniques, in addition to molecular analyzes (mitochondrial and nuclear DNA). All samples sampled have phenotypic characteristics typical of the species, color, organization and quantity of chemical plates. Linear morphometry indicates that there is a statistical difference between sex, with males being narrower and shorter in relation to females, while geometric morphometry shows shape variation for each sex. In relation to the evaluation between the variations, from the geometric morphometry, these are organized in groups, selected according to the sampled geographic regions, those that are close to each other and share or even format. The genetic study indicates that Brazilians are different from Colombians, with an average genetic diversity of 3% (mtDNA). This variation was accompanied by the results of the microsatellites, with the F_{ST} fixation index and initial coefficient, in addition to revealing what these statistics are structured, with low inbreeding rates. The results are important for the knowledge of the Brazilian species *K. scorpioides*, and other subsidiary studies on conservation and conservation.

Keywords: turtle; morphology; phylogenetic

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. <i>Kinosternon scorpioides</i> . FONTE: autor, 2017.....	26
Figura 2. As subespécies de <i>Kinosternon scorpioides</i> . A- <i>K. s. scorpioides</i> , B- <i>K. s. albugolare</i> , C- <i>K. s. cruentatum</i> . FONTE: Berry e Iverson, 2011.....	27
Figura 3. Distribuição geográfica das três subespécies de <i>Kinosternon scorpioides</i> . <i>K. s. scorpioides</i> -vermelho, <i>K. s. albugolare</i> - roxo, <i>K. s. cruentatum</i> - amarelo. Fonte: Rhodin et al., 2017.....	27
Figura 4. Desenho esquemático da morfologia de <i>Kinosternon scorpioides</i> . Fonte: Rueda- Almonacid et al., 2007.....	29

CAPÍTULO II

Figura 1. Distribuição geográfica dos pontos de coleta de <i>Kinosternon scorpioides</i> . São Luís -MA, 2019.....	46
Figura 2. Localização dos landmarks dispostos na carapaça- A e plastrão- B de <i>Kinosternon scorpioides</i> . São Luís-MA/ Brasil, 2019.....	48
Figura 3. I-Análise de Componentes Principais/gráfico wireframe de forma (carapaça - A e C; e plastrão B e D) e II- Análise da Função Discriminante/Histograma/ wireframe de forma (carapaça - A e C; eplastrão B e D) de <i>Kinosternon scorpioides</i> . São Luís-MA, 2019. Legenda: linha cinza-média, linha preta-variação, azul- macho, vermelho-fêmea.....	51

CAPÍTULO III

Figura 1. Localização dos landmarks dispostos na carapaça- A e plastrão- B de <i>Kinosternon scorpioides</i> . São Luís-MA/ Brasil, 2019.....	64
Figura 2. Análise da Variação Canônica da carapaça- A e plastrão-B de machos de <i>Kinosternon scorpioides</i> . São Luís -MA, 2019. Legenda: São Bento (roxo); Pinheiro (preta); Anajatuba (azul); Belém (verde) e Colômbia (vermelha).....	70
Figura 3. Análise da Variação Canônica da carapaça- A e plastrão-B de fêmeas de <i>Kinosternon scorpioides</i> . São Luís -MA, 2019. Legenda: São Bento (roxo); Pinheiro (preta); Anajatuba (azul); Belém (verde) e Colômbia (vermelha).	72
Figura 4. Árvore utilizando as sequências geradas de <i>K. scorpioides</i> e obtidas no Genbank para o gene mtDNA/COI e Programa: MEGA 6.0, agrupamento vizinhos (Neighbor-Joining) e pelo método Kimura 2- parâmetros com intervalo de 95% e 1.000 replicações de bootstrap.....	75

Figura 5. Rede de haplótipos geradas com sequência do gene COI /mtDNA de <i>Kinosternon scorpioides</i> , São Luís, 2019. Programa Network 5.0.1, 2005.....	76
Figura 6. Árvore utilizando as sequências geradas de <i>K. scorpioides</i> e obtidas no Genbank para o gene mtDNA/COI a partir da Análise Bayesiana.....	77
Figura 7. Frequência de alelos por locus nas populações analisadas. Legenda: Pop1= Pará, Pop 2= Baixada Maranhense e Pop3= Colômbia.....	79

APÊNDICE

Figura 1. Biometria dos <i>Kinosternon scorpioides</i> . A- comprimento de carapaça; B- comprimento de plastrão; C- largura de carapaça; D- largura de plastrão; E- altura.....	98
Figura 2. Dimorfismo sexual de <i>Kinosternon scorpioides</i> . Em A- fêmea e B- macho....	98
Figura 3. Variações de coloração da carapaça de <i>Kinosternon scorpioides</i> de diferentes populações. Colômbia, Pará, Anajatuba, Pinheiro, São Bento.....	102
Figura 4. Variações de coloração de plastrão de <i>Kinosternon scorpioides</i> de diferentes populações. Colômbia, Pará, Anajatuba, Pinheiro, São Bento.....	103
Figura 5. Morfologia e localização das placas dérmicas de <i>Kinosternon scorpioides</i> . Setas: as elevações do casco- carinas e asteriscos: dobradiças. Fonte: Autor, modificado de Rueda-Almonacid et al., 2007).....	104
Figura 6. Identificação dos landmarks na carapaça <i>Kinosternon scorpioides</i>	105
Figura 7. Identificação dos landmarks no plastrão <i>Kinosternon scorpioides</i>	106

ANEXO

Figura 1. Protocolo de extração de Dna utilizado nas amostras de <i>K. scorpioides</i>	116
Figura 2. Licença de autorização concedida pelo IBAMA para coleta de <i>K. scorpioides</i>	117
Figura 3. Autorização do Comitê de Ética e Experimentação Animal – CEEA para realização da pesquisa com <i>K. scorpioides</i>	118
Figura 4. Comprovante de registro de patente no INPI.....	119

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Distribuição amostral de <i>Kinosternon scorpioides</i> . São Luís-MA, 2019.....	46
Tabela 2. Medidas lineares de carapaça e plastrão de machos e fêmeas <i>Kinosternon scorpioides</i> . São Luís-MA, 2019.....	49
Tabela 3. Classificação da Análise Função Discriminante “cross-validation” entre sexos, da carapaça e plastrão de <i>Kinosternon scorpioides</i> . São Luís, 2019.....	50

CAPÍTULO III

Tabela 1. Distribuição amostral da análise fenotípica entre as diferentes populações de <i>Kinosternon scorpioides</i> , São Luís-MA, 2019.....	62
Tabela 2. Distribuição amostral utilizada na análise morfométrica de <i>Kinosternon scorpioides</i> , São Luís-MA, 2019.....	62
Tabela 3. Descrição das amostras de <i>Kinosternon scorpioides</i> utilizadas na avaliação genética. São Luís-MA, 2019.....	63
Tabela 4. Distância de Mahalanobis entre as populações de <i>Kinosternon scorpioides</i> da Análise Canônica. C= carapaça e P= Plastrão, * = macho e ** = fêmea, os valores de $p < 0.0001$ para todos os itens avaliados. São Luís-MA, 2019.....	70
Tabela 5: Distância de Procrustes entre as populações de <i>Kinosternon scorpioides</i> da Análise Canônica carapaça e plastrão de machos(*) e fêmeas (**). Os valores de p estão entre parênteses. São Luís-MA, 2019.....	71
Tabela 6. Estimativa padrão máxima de probabilidade de substituição de nucleotídeos. E frequência de nucleotídeos estimados no MEGA 6. São Luís-MA, 2019.....	73
Tabela 7. Índice de fixação-Fst entre as diferentes populações de <i>Kinosternon scorpioides</i> utilizando as sequências geradas para gene COI/mtDNA.....	74
Tabela 8. Número de alelos, heterozigosidade observada e esperada nas amostras analisadas de <i>Kinosternon scorpioides</i>	78
Tabela 9. Descrição da diversidade genética e índice de Shannon para três populações de <i>Kinosternon scorpioides</i>	79
Tabela 10: Diversidade genética por locus entre as populações de <i>Kinosternon scorpioides</i>	80

Tabela 11. Estatística F calculada para cada locus individualmente e para todos os loci em conjunto.....	80
Tabela 12. Estatística F (F_{is}) calculada para cada locus nas populações de <i>Kinosternon scorpioides</i>	81
Tabela 13. Estatística F, entre pares de populações de <i>Kinosternon scorpioides</i> , São Luís, 2019.....	81
Tabela 14. AMOVA realizada para as de populações de <i>Kinosternon scorpioides</i> , São Luís, 2019.....	82

APÊNDICE

Tabela 1. Dados biométricos das amostras de <i>Kinosternon scorpioides</i>	99
Tabela 2. Sequências externas originadas do Genbank do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade 1-CO1 utilizadas no alinhamento das amostras no Programa MEGA 6.06.....	107
Tabela 3. Descrição das amostras de <i>Kinosternon scorpioides</i> utilizadas na avaliação genética/ mt DNA; São Luís-MA, 2019.....	108
Tabela 4. Índice de Distância Média entre os grupos para o gene COI /mtDNA. São Luís-MA, 2019. Programa MEGA.....	109
Tabela 5. Descrição dos haplótipos observados na rede de haplótipos gerada pelo Network; São Luís-MA, 2019.....	110
Tabela 6. Alelos privados por população e sua frequência relativa para cada locus analisado.	111

LISTA DE SÍMBOLOS

1. **AFLP:** Amplified Fragment Length Polymorphism
2. **CBOL:** Consortium for the Barcode of Life
3. **CMRKS :** Coleção Maranhense de Répteis Kinosternon scorpioides
4. **COI :** Citocromo C Oxidase Subunidade I
5. **DNA** Ácido Desoxirribonucleico
6. **IBAMA:** Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
7. **mtDNA:** DNA mitocondrial
8. **NATURATINS:** Instituto Natureza do Tocantins
9. **NUGEO:** Núcleo Geoambiental
10. **QUEAMAR:** Quilômetros do Maranhão
11. **RAPD:** Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
12. **RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism
13. **SSRs:** Simple Sequence Repeats
14. **STRs:** Single Tandem Repeat
15. **tRNA:** RNA transferase
16. **UEMA:** Universidade Estadual do Maranhão
17. **UFMA:** Universidade Federal do Maranhão

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVOS	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 Os Répteis.....	23
3.2 Família Kinosternidae.....	24
3.3 A espécie <i>Kinosternon scorpioides</i>	25
3.4 Morfometria Linear e Geométrica.....	30
3.5 Marcadores Moleculares	32
REFERÊNCIAS.....	36

CAPÍTULO II

Artigo 1: Dimorfismo sexual em *Kinosternon scorpioides* amazônico

Resumo	43
Introdução.....	43
Material e Métodos.....	45
Resultados	48
Discussão.....	52
Conclusões	55
Referências	55

CAPÍTULO III

Artigo 2: Variabilidade morfológica e genética de populações de *Kinosternon scorpioides*

Resumo	59
Introdução	59
Material e Métodos	60
Resultados	66
Discussão.....	82
Conclusões	88
Referências	88

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
---------------------------	----

APÊNDICE.....	97
---------------	----

ANEXO.....	115
------------	-----



CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A diversidade biológica é definida como o número de itens diferentes e sua frequência relativa. Estes itens são organizados em vários níveis, desde os ecossistemas completos a estruturas químicas que são a base molecular da hereditariedade. O termo engloba diferentes ecossistemas, espécies, genes e sua abundância relativa. Desta forma, a biodiversidade significa basicamente a “variedade da vida” (VIEIRA, 2012).

A conservação da biodiversidade é um assunto bastante discutido, devido a grande quantidade de espécies ameaçadas de extinção, principalmente no Brasil, que possui um grande número de espécies endêmicas e uma rica diversidade de biomas.

Dentre os biomas brasileiros, a região Amazônica é um grande exemplo de biodiversidade, abriga a maior floresta tropical úmida do planeta e, também, o mais importante e complexo sistema de água doce. Ao lado dessa imensa rede hidrográfica, há uma grande biodiversidade animal e vegetal. Esta área abrange seis países: Brasil, Peru, Bolívia, Equador, Colômbia e Venezuela e a maior parte desse bioma - 61% está em território brasileiro. E em nosso país cobre partes do Acre, Amazonas, Rondônia, Pará, Mato Grosso, Amapá, Tocantins e Maranhão (IBGE, 2014).

O Brasil abriga 795 espécies de répteis, sendo 36 Testudines, 6 Crocodylia e 753 Squamata (72 anfisbenas, 276 “lagartos” e 405 serpentes). Considerando subespécies, são 6 Crocodylia, 37 Testudines e 799 Squamata no Brasil (75 anfisbenas, 282 “lagartos” e 442 serpentes), totalizando 842 espécies e subespécies de répteis no país (COSTA e BÉRNILS, 2018).

E dentre os répteis, os Testudines se destacam por serem os mais vulneráveis à extinção, uma vez que mais da metade das espécies se encontra ameaçada. De acordo com Páez et al., (2012), o percentual de ameaça desses animais é superior aos índices verificados para aves (13%), mamíferos (25%) e anfíbios (41%).

Apesar de terem sido registrados dez espécies de quelônios no Maranhão (MOURA et al., 2014), estudos sobre esses animais ainda merecem atenção científica, o que pode ser constatado pela lacuna de dados biológicos e ecológicos, dificultando o estabelecimento de ações adequadas de manejo e conservação (BARRETO et al., 2010).

Dentre estes quelônios, encontramos às margens de rios e campos alagados da Baixada Maranhense, o cágado *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766). A espécie é conhecida popularmente como jurará, sendo caçado, vendido e/ou consumido indiscriminadamente como prato exótico da culinária local, sendo constantemente alvo de apreensões pelo IBAMA (PEREIRA et al., 2007). Ações antrópicas deste tipo podem levar a vulnerabilidade da espécie e contribuir para diminuição das populações.

A identificação de populações evolutivamente significativas e também de unidades de conservação que as abrigam, se combinam de forma a gerar pontos-chaves para a conservação de espécies que se encontram ameaçadas (PEARSE et al., 2006). Em relação à *Kinosternon scorpioides*, até o momento não se tem dados de sua situação populacional, no entanto sabe-se que a espécie possui ampla distribuição, com a presença de muitas barreiras geográficas o que pode ocasionar um aumento na estrutura genética das populações. Aliado a isto as descrições morfológicas para identificação da espécie são raras e baseadas em amostras oriundas de outros países. A maioria das informações geradas estão relacionadas à ecologia, fisiologia, reprodução e anatomia básica, sendo escasso estudos sobre taxonomia e genética das populações brasileiras.

A partir desse cenário, o entendimento sobre a morfologia e variabilidade genética das populações de jurarás, bem como a obtenção de inferência sobre sua história evolutiva e relações filogenéticas com os demais quelônios torna-se necessário para subsidiar planos de manejo e direcionar estratégias de reprodução em cativeiro da espécie, contribuindo com a conservação da biodiversidade brasileira.

Neste trabalho foram realizadas análises morfológicas, fazendo uso da morfometria tradicional ou linear e da morfometria geométrica a fim de verificar possíveis variações anatômicas; e também utilizamos a biologia molecular, a partir do uso de marcadores moleculares (COI- citocromo oxidase subunidade I/mtDNA e de microssatélites) para estudo de variabilidade genética entre populações.

Este documento está estruturado em:

a) Uma revisão bibliográfica com ênfase nos principais temas abordados na tese

b) Artigos dos resultados da pesquisa:

- Artigo 1: Dimorfismo sexual em *Kinosternon scorpioides* amazônico;
- Artigo 2: Variabilidade morfológica e genética de populações de *Kinosternon scorpioides* ;

c) Considerações Finais

d) Anexos e apêndices

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar diferentes populações de *Kinosternon scorpiodes* por meio da análise fenotípica e de sua estrutura genética.

2.2 Específicos

1. Caracterizar morfologicamente animais de diferentes populações e localidades baseados na caracterização fenotípica.
2. Caracterizar geneticamente amostras de diferentes populações utilizando sequências de fragmentos do gene COI (Citocromo C oxidase Subunidade I);
3. Determinar a variabilidade genética de populações de jurará a partir de análise por microssatélites;
4. Gerar resultados que possam contribuir com a taxonomia de *Kinosternon*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Os Répteis

A Classe Reptila inclui cinco ordens, a *Rhynchocephalia* (as tuataras), *Amphisbaenia* (cobra-cegas), *Lacertilia* (lagartos), *Crocodylia* (os crocodilos e jacarés), Ophidia (cobras), Chelonia ou Testudines (tartarugas, cágados e jabutis) (OLIVEIRA, 2003).

Os quelônios são os mais antigos répteis existentes e surgiram há cerca de 230 milhões de anos, sendo de linhagem mais antiga que os dinossauros fósseis (FERRI, 2002). Além disso, estão entre os vertebrados mais ameaçados, apresentando um status preocupante quanto à conservação. Esse grupo tem importância em estudos genéticos e taxonômicos por possuir uma história filogenética única, sendo candidatos em potencial para ações de conservação. Muitas espécies estão em vias de extinção, consequência da perseguição desmedida do homem, que destrói os ovos e pratica a caça predatória na época de reprodução, além de promover a destruição do habitat natural desses animais (FANTIN, 2008).

Wyneken et al. (2007) descrevem as características peculiares destes animais, os quais possuem placas ósseas dérmicas que se fundem originando uma carapaça dorsal (placas ósseas cobertas por um mosaico de escudos córneos epidérmicos) e um plastrão ventral rígido, estruturas em que as vértebras e costelas se unem, formando o exoesqueleto típico destes animais, morfologia típica e que define a ordem Chelonia.

Dentro de uma caracterização popular, todos os quelônios são reconhecidos como “tartarugas” (latim *testudo*, tartaruga), no entanto, esta Ordem possui três grupos distintos: as *tartarugas* (*sea turtles* ou *turtles*), seres marinhos, detentoras de membranas interdigitais e casco achatado; os *cágados* (*terrapin*), animais de água doce e também possuem membranas interdigitais, mas são menores que as tartarugas; e os *jabutis* (*tortoise*), seres maiores, de hábito terrestre, ambiente seco, que possuem patas colunares e sem membranas interdigitais (HICKMAN et al., 2004).

A classificação taxonômica realizada por Fritz e Havas (2013) agruparam os quelônios em 15 famílias distintas: a Dermochelyidae, Dermatemyidae, Carettochelyidae, Cheloniidae, Chelydridae, Emydidae, Geoemydidae, Platysternidae, Testudinidae, Podocnemididae, Chelidae, Pelomedusidae, Trionychidae, Staurotypidae e Kinosternidae.

A Ordem Chelonia possui duas subordens, a Cryptodira e a Pleurodira (Fritz e Havas, 2013). A Cryptodira são aqueles que escondem todo o pescoço para dentro de sua carapaça, enquanto a Pleurodira são os que posicionam lateralmente o pescoço, formando um “S” do plano horizontal (MARTINS e MOLINA, 2008).

A taxonomia moderna reorganizou a Subordem Cryptodira em quatro superfamílias, entre elas, a Kinosternoidea, que reúne duas grandes famílias: Dermatermydidae (GRAY, 1870) e Kinosternidae (AGASSIZ, 1857), esta última compreende as duas subfamílias, a Kinosterninae (gêneros *Kinosternon* e *Sternotherus*) e a Staurotypinae (gêneros *Claudius* e *Staurotypus*) (VAN DIJK et al., 2014).

3.2 Família Kinosternidae

Os kinosternídeos são espécies de quelônios de pequeno a médio porte da subordem Cryptodira, sendo conhecidos como tartarugas do Novo Mundo (ERNST e BARBOUR, 1989). É um grupo que possui ainda algumas incertezas taxonômicas. Por isso, estudos utilizando dados morfológicos e/ou molecular foram realizados deste a década de 70 a fim de reorganizar as espécies (SPINKS et al., 2014). A família Kinosternidae foi organizada primeiramente em quatro gêneros: *Kinosternon* (18 espécies), *Sternotherus* (4 sp.), *Staurotypus* (2 sp.) e *Claudius* monotípico (VAN DIJK et al., 2012).

Posteriormente, com base em dados moleculares foram propostos três clados bem distintos, o *Sternotherus*, o *Kinosternon* e outro novo gênero ainda não identificado (IVERSON et al., 2013). Esta proposta foi apoiada por Fritz e Havas (2013), indicando três gêneros e 24 espécies para a subfamília Kinosterninae.

Entretanto, uma nova avaliação genética da subfamília Kinosterninae realizada por Spinks et al.,(2014) indicaram que seria prematuro a proposição de um terceiro gênero, permanecendo apenas os gêneros *Kinosternon* e *Sternotherus*.

A subfamília Kinosterninae apresenta a maior quantidade de espécies, e seus exemplares ocorrem do Sul do Canadá até a América do Sul, o gênero *Kinosternon* é o mais distribuído, sendo encontrados desde o sul dos Estados unidos, espalhando-se pela América

do Sul, chegando até o norte da Argentina (KIRKPATRICK, 1997; BERRY e IVERSON, 2011).

Fritz e Havàs (2007) reorganizaram o gênero *Kinosternon*, indicando 18 espécies, contudo, Van Dijk et al. (2014), refizeram a classificação e relataram que este é formado por 19 espécies de cágados, sendo este gênero o mais diverso entres os demais grupos. As espécies que compõem o gênero *Kinosternon* são: *K. abaxillare*, *K. acutum*, *K. alamosae*, *K. angustipons*, *K. arizonense*, *K. baurii*, *K. chimahuaca*, *K. creaseri*, *K. dunni*, *K. durangoense*, *K. flavences*, *K. herrerae*, *K. hirtipes*, *K. integrum*, *K. leucostomum*, *K. oaxacae*, *K. sonoriense*, *K. subrubrum* e *K. scorpioides*.

3.3 A espécie *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766)

A espécie *Kinosternon scorpioides* (Figura 1) recebe algumas denominações comuns, sendo referendada como tartaruga do lodo, tartaruga almiscarada, tartaruga escorpião do lodo, tortuga de ciénaga de água, muçã, capininga, jurará, ashna charapa, loro charapa, tortuga bico de papagayo, tortuga buitre, tapaculo, chiribí-chivirí, galápago mión, miona, guachupe, pivichigua, morrocoy água, pecho quebrado (BRITES et al., 2009; VOGT et al., 2015). Essas denominações são referências aos seus hábitos de vida, região do habitat ou em virtude da sua morfologia.

Etimologicamente, o nome da espécie é derivado das palavras gregas “Skorpion” e “scorpions”, que traduzida para o latim como "*Scorpion*" significa escorpião. Ela recebeu este nome por uma referência à estrutura córnea na ponta da cauda, como um ferrão de escorpião (SMITH e SMITH, 1980).

A *Kinosternon scorpioides* foi descrita por Fritz e Havàs (2007) possuindo quatro variedades, ou subespécies: a *K. s. scorpioides*, *K. s. albogulare*, *K. s. cruentatum* e a *K. s. abaxillare*. Posteriormente Berry e Iverson (2011) reorganizaram a taxonomia da espécie e também mantiveram a classificação aceita das quatro subespécies. Entretanto, atualmente, a espécie *K. scorpioides* foi reduzida apenas a três subespécies (Figura 2), sendo a *K. s. abaxillare* elevada a nível de espécie (VAN DIJK et al., 2014; RHODIN et al., 2017).

A espécie possui ampla distribuição geográfica ao longo das Américas, atingindo 20 países: Brasil, México, Belize, Bolívia, Colômbia, Costa Rica, Equador, Panamá, Argentina, Paraguai, El Salvador, Guina Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, Nicarágua, Peru, Venezuela, Suriname e Trindade. No entanto, a subespécie *Kinosternon s. scorpioides* é a única descrita atualmente para o território brasileiro, está distribuída nos estados do Acre, Alagoas, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rondônia, Sergipe e Tocantins (RHODIN et al., 2017) (Figura 3).



Figura 1. *Kinosternon scorpioides*. FONTE: autor, 2017.



Figura 2. As subespécies de *Kinosternon scorpioides*. A- *K. s. scorpioides*, B- *K. s. albugolare*, C- *K. s. cruentatum*. FONTE: Berry e Iverson, 2011.

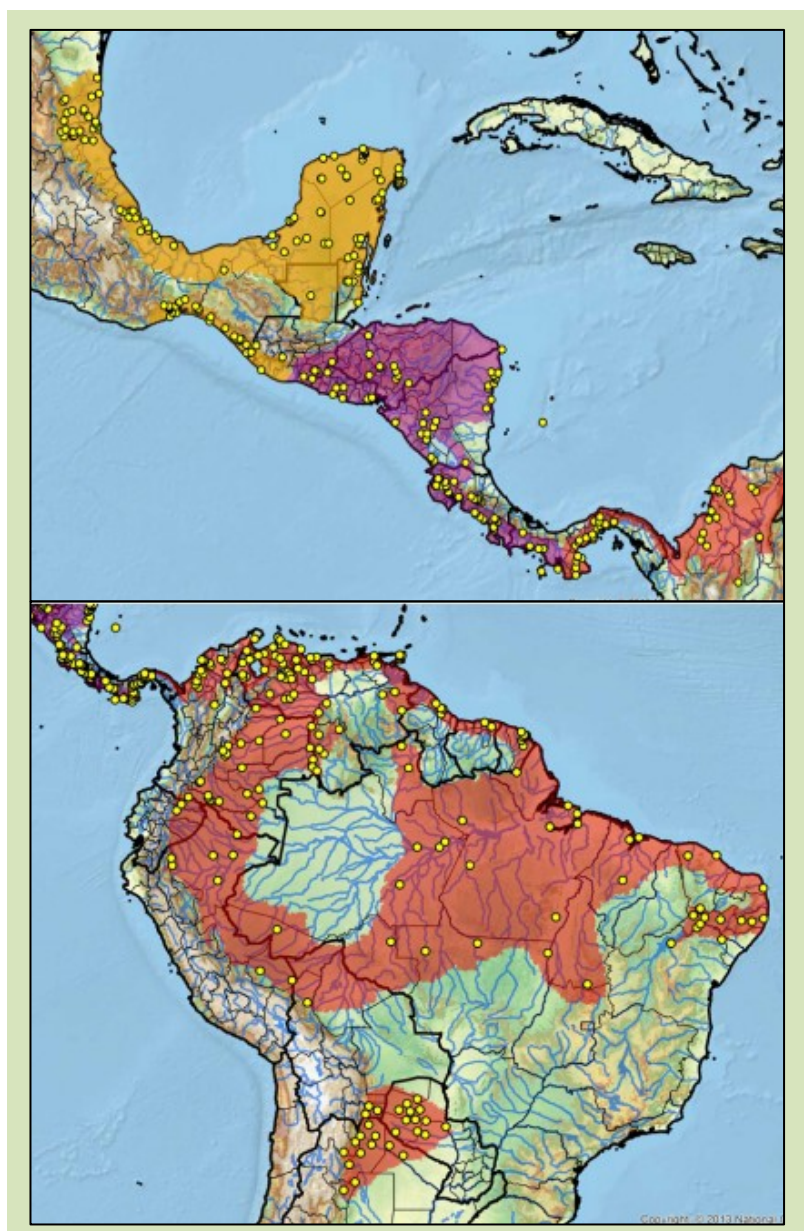


Figura 3. Distribuição geográfica das três subespécies de *Kinosternon scorpioides*. *K. s. scorpioides*-vermelho, *K. s. albugolare*- roxo, *K. s. cruentatum*- amarelo. Fonte: Rhodin et al., 2017.

Em relação às subespécies, observam-se pequenas variações morfológicas no que diz respeito à coloração da carapaça, plastrão e cabeça. E seus nomes são referências às essas diferenças. O nome da subespécie *K. s.cruentatum* significa "Manchada com sangue", em referência ao vermelho brilhante na cabeça e no pescoço dos adultos, enquanto o *K. s.albogulare* refere-se ao queixo pálido de alguns indivíduos (BERRY e IVERSON, 2011).

Segundo Frankham et al. (2008), as subespécies são subpopulações parcialmente diferenciadas dentro de uma mesma espécie, estas compartilham uma distribuição geográfica única, normalmente sem isolamento reprodutivo marcante, sendo distinguíveis uma das outras em vários caracteres com base genética. Mas conceitualmente é algo mais subjetivo do que aquele que define uma espécie. E podem ser consideradas como populações que estão a caminho de uma especiação.

Desta forma, o conhecimento das características morfológicas são itens importantes para identificação de uma espécie, é partir destas que são primeiramente agrupadas aquelas que compartilham formas ou peculiaridades afins e são gerados as hipóteses taxonômicas. O completo entendimento sobre uma espécie é essencial na construção de estratégias que efetivamente contribuam para a sua conservação. E o escasso conhecimento acerca das características pode levar a erros taxonômicos que em lugar de contribuir para a sua preservação, compromete seriamente o futuro da espécie estudada (BONDIOLI, 2009).

Considerando que o conhecimento da morfologia de uma espécie é fator primordial para sua identificação, são listados a seguir os caracteres morfológicos descritos na literatura para a tartaruga *Kinosternon scorpioides* que permitem uma diferenciação das demais espécies da Família Kinosternidae e dentro do gênero *Kinosternon* (Figura 4):

a) *Cabeça e pescoço*: o animal apresenta cabeça triangular de coloração mais clara do que nas outras subespécies (marrom, cinza, ou verde oliva escuro) com manchas e pontos marrom claro, amarelo ou cinza suave (BERRY e IVERSON, 2011). O pescoço não possui marcas, sendo de coloração cinza ou negra. A porção rostral localiza-se o focinho alongado, e sua mandíbula possui uma estrutura córnea (ranfoteca) em formato de bico de papagaio proeminente (PEREIRA e LEMOS, 2007). Possui 6 a 8 barbelas mentonianas na porção ventral, a partir da cabeça até o pescoço (RUEDA-ALMONACID et al., 2007)

b) *Carapaça e plastrão*: possui uma carapaça em formato oval, moderadamente deprimida dorsalmente e levemente tricarínada (BERRY e IVERSON, 2011), de coloração marrom clara ou escura, verde oliva ou preta, com manchas marrom, que se liga ao plastrão através de uma ponte larga denominada de escudos inframarginais. O plastrão é de coloração amarelo ovo ao amarelo escuro ou marrom claro, apresentando dobradiças no lobo anterior e posterior que (ERNST e BARBOUR, 1989). A carapaça possui 36 placas: 1 nuchal, 5 vertebrais, 8 costais e 22 marginais (sendo a nona e décima mais largas); enquanto o plastrão é formado por 11 escudos dérmicos: 1 gular, 2 umerais, 2 peitorais, 2 abdominais, 2 femorais e 2 anais. O plastrão apresenta-se côncavo nos machos maduros sexualmente; Na região axilar e inguinal apresentam glândulas almiscaradas que secretam um forte odor quando estimuladas (RUEDA-ALMONACID et al., 2007). Os filhotes são de coloração negra, com manchas amarelas na carapaça e plastrão.

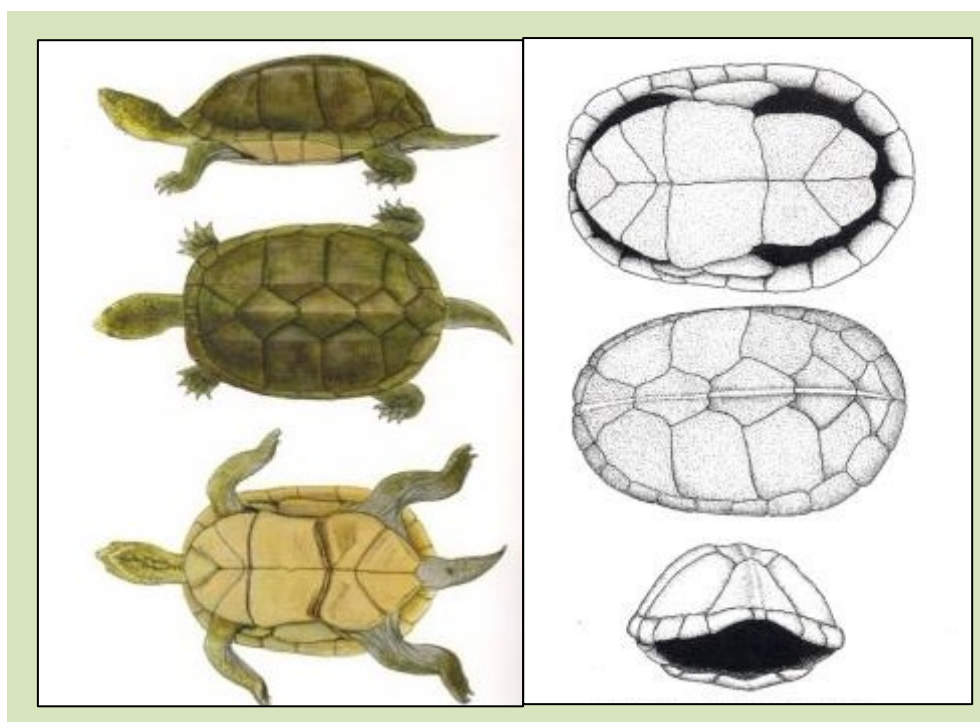


Figura 4. Desenho esquemático da morfologia de *Kinosternon scorpioides scorpioides*.
Fonte: Rueda- Almonacid et al., 2007.

c) *Cauda*: alongada (nos machos) ou curta (fêmeas) nos animais adultos, em filhotes a cauda é curta em ambos os sexos. Na extremidade da cauda existe um apêndice córneo, semelhante a uma unha, como um ferrão de escorpião, característica que nominou cientificamente a

espécie, que auxilia a fixação da fêmea durante o acasalamento (CASTRO, 2006; PEREIRA e LEMOS, 2007).

d) *Patas*: espalmados com membranas interdigitais reduzidas com cinco dedos com unhas pontiagudas tanto nos membros torácicos (anteriores) como nos pélvicos (posteriores) (RUEDA-ALMONACID et al., 2007).

3.4 Morfometria Linear e Geométrica

Os estudos morfológicos são importantes para determinação de táxons e avaliação de variações anatômicas entre populações de animais. Desta forma, a avaliação morfométrica dos animais auxilia no reconhecimento de uma espécie, acrescentando às características visuais, padrões de dimensões próprias daquela população.

O recente desenvolvimento e aprimoramento de ferramentas morfométricas representam um grande avanço nos estudos de variação morfológica (CLAUDE et al., 2004). A morfometria ganhou embasamento teórico e filosófico no final da década de 1980 e a partir daí criou-se uma área específica que envolve a biologia, estatística e geometria (MONTEIRO e REIS, 1999). Vem há muitos anos sustentando estudos que envolvem diferentes características estruturais relacionadas com diferentes fatores, uma vez que estes elementos não se desenvolvem independentemente (SCHLUTER, 2000).

A morfometria em uma de suas definições mais clássicas designa qualquer análise quantitativa da variação morfológica dos organismos. E atualmente costuma ser definida como o estudo da forma e do tamanho, e como estas variáveis se relacionam entre si. Esse conjunto de técnicas tem evoluído ao longo dos séculos desde o estabelecimento de proporções entre as diversas partes do corpo, ainda hoje utilizadas nas descrições taxonômicas (MORAES, 2003).

A *morfometria tradicional* trata do estudo da variação e covariação de medidas de distâncias entre pares de pontos, geralmente comprimentos e larguras de estruturas e, às vezes, proporções e ângulos também podem ser utilizados (ROHLF e MARCUS, 1993; MONTEIRO e REIS, 1999; MORAES, 2003), devido a isso é utilizada classicamente para aferir dados biométricos dos animais.

Segundo Parés-Casanova (2014) é o estudo de como e quanto estas medidas variam, e de como e quanto estão relacionadas entre si. Entretanto, segundo este autor, o método traz um problema consigo, que é o fato de não ser capaz de capturar muita informação sobre a forma do organismo como um todo, apesar de descrever o padrão de covariação do todo das medidas e identificar regiões com maior ou menor grau de covariação. Apesar disto, Cabrera e Colantonio (1997) fizeram uso desse tipo de morfometria, realizaram medições (altura, comprimento e largura de carapaça e plastrão) e análise morfológica das placas ou escudos da carapaça e plastrão, do *K. s. carajasensis* e o do *K. s. seriei*, e a partir dos resultados obtidos, perceberam essas duas subespécies eram na verdade a *K. s. scorpioides*.

Os complexos padrões de variação morfométrica dos organismos necessitam de técnicas de análise estatística multivariada, que permitam considerar simultaneamente a variação dos diversos caracteres quantitativos e que sejam sensivelmente capazes de identificar diferenças sutis entre os sexos, as quais não são perceptíveis a olho nu (VALENZUELA et al., 2004).

Partindo desta necessidade, surge a *morfometria geométrica*, uma análise que captura a geometria da estrutura em estudo através das coordenadas de marcos anatômicos, podendo ser bi ou tridimensionais e permite a separação dos componentes forma e tamanho (ROHLF e MARCUS 1993; MONTEIRO e REIS 1999). Esta última é capaz de localizar e descrever regiões de mudanças na forma de maneira mais precisa, e também de reconstruir graficamente tais mudanças.

Esta técnica é extremamente útil na ordenação dos dados morfométricos, pois permite que parâmetros biológicos subjacentes às relações morfológicas entre indivíduos ou grupos possam ser mais facilmente detectados e interpretados (REIS, 1988). Sendo bem utilizadas em estudos que visam testar e descrever a existência de variação na forma dos organismos, seja em nível de dimorfismo sexual, variação geográfica, variação inter e intra-populacional, variação entre espécies filogeneticamente próximas, trajetórias ontogenéticas, zonas híbridas, paleontologia, sistemática e evolução (FORNEL, 2010). Por estas contribuições, a morfometria geométrica é considerada uma importante ferramenta para qualquer estudo fenotípico de uma estrutura (PARÉS-CASANOVA, 2014).

A morfometria geométrica já foi utilizada para determinação sexual em filhotes de testudines, e se mostrou eficiente em exemplares de *Podocnemis expansa* e *Chrysemys picta*

(VALENZUELA et al., 2004), *Trachemys scripta* (MYERS et al., 2006) e *Caretta caretta* (FERREIRA-JÚNIOR et al., 2011). Empregada também para avaliação morfométrica dos ossos cervicais em 3D de tartarugas da subordem Cryptodira, em que foi possível elucidar a ancestralidade e perceber que houve uma evolução gradual para verticalização do movimento de pescoço neste grupo quelônios (WERNEBURG, 2014). E para os membros da família Kinosternidae, essa técnica revelou que o gênero *Staurotypus* possui carapaça plana e plastrão curto, o *Sternotherus* tem carapaça moderadamente arredondada e plastrão médio, enquanto o *Kinosternon* possui a carapaça mais arredondada de todos e um plastrão longo. Demonstrando que estes gêneros possuem formatos distintos (BERLANT e STAYTON, 2017).

3.5 Marcadores Moleculares

A forma de classificação das espécies de vertebrados na década de 60 baseava-se principalmente em características morfológicas e anatômicas, utilizando os chamados marcadores morfológicos, fisiológicos ou fenotípicos em análises genéticas moleculares para caracterizar um grupo taxonômico. Esses marcadores contribuíram de maneira significativa com a genética de populações, entretanto, seu uso limitava-se às espécies viáveis de controle em ambiente laboratorial (AVISE, 2004). Tornando necessárias novas pesquisas não só pra uniformizar estes dados, como também para a inclusão da genética para aumentar a eficiência na classificação taxonômica.

Na década de 80 foram desenvolvidos os primeiros marcadores moleculares de DNA, que pode ser definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou ainda de uma sequência direta da estrutura do DNA (AVISE, 2004) e categorizados como (1) dominantes, tais como RAPD e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), possibilitando dados de diversos *loci* do genoma, e (2) codominantes, como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), sequência de DNA e microsatélites, os quais apresentam alelos de um locus específico (BUENO-SILVA, 2012).

Existem numerosas técnicas moleculares disponíveis para avaliar a diversidade genética entre indivíduos e populações, segundo Queller et al. (1993), o marcador genético ideal para estudos em população seria um de fácil uso e que distinguísse locos com alelos codominantes, que fornecesse valores não ambíguos, e preferivelmente com alta variação. Quando usamos marcadores genéticos estamos tentando estimar o número de modificações

dos nucleotídeos entre alelomorfos. E as vantagens em utilizar os marcadores moleculares consistem no fato em que eles são pouco influenciados por fatores ambientais e pela grande quantidade de caracteres informativos presente nos indivíduos (AVISE, 2004).

Um dos tipos de marcadores mais utilizados para identificação das espécies é o DNA mitocondrial (mtDNA), que nos animais consiste de um genoma haplóide, circular, de pequeno tamanho, que está presente em centenas a milhares de cópias por célula (FERREIRA, 2001). As principais características do mtDNA, que o tornam de fácil utilização são: ser amplamente distribuído entre os animais; alto número de cópias por célula; apresentar taxa de mutação diferente entre espécies; não sofrer recombinação; ter uma herança predominantemente materna e possuir baixo polimorfismo ancestral (FRANKHAM, 2008).

E com o objetivo de auxiliar no desenvolvimento de um sistema capaz de identificar todas as espécies do planeta foi criado “*Consortium for the Barcode of Life*” (CBOL), baseado na utilização de um pequeno fragmento padronizado de mtDNA, codificador de um gene, a fim de estabelecer uma ferramenta acurada para a pesquisa taxonômica em espécies animais e vegetais e auxiliar na identificação correta de espécimes e de ampliar e estimular a taxonomia dos vários grupos de organismos vivos (AZEREDO-ESPIN, 2005).

Para os animais, foi estabelecido como código de barras, *DNA Barcode*, uma região do gene mitocondrial denominado de Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI) (AZEREDO-ESPIN, 2005) e que posteriormente, foi apresentado a plataforma “www.barcodinglife.org (BoldSystems)”, para suportar às coleções de espécies validadas na biblioteca de código de barras, promovendo a garantia da qualidade das sequências, e a colaboração entre bancos genéticos (RATNASINGHAM e HEBERT, 2007).

O mtDNA/COI é capaz de determinar as espécies de todos os filos deste reino, exceto os cnidários (HEBERT et al., 2004), enraizando a proposta de utilização deste marcador para identificação dos animais. Sendo considerado por muitos como sendo um

Em répteis este uso foi destacado por Trivedi et al. (2016), que fizeram uma compilação de 27 estudos realizados em Crocodilia, Squamata, Testudines, Sphenodontia, descrevendo a eficiência deste marcador genético para elucidar questões filogenéticas, populacionais, ou de resoluções de incertezas taxonômicas.

Em tartarugas marinhas (*Chelonia mydas*), utilizando polimorfismo no DNA mitocondrial (mtDNA) foi analisada a variabilidade intrapopulacional e o possível retorno de fêmeas a sua área de origem (BOWEN et al., 1992; ALLARD et al, 1994) *Eretmochelys imbrica* (BRODERICCK et al, 1994; BASS et al, 1996) e *Caretta caretta* (BOWEN et al, 1993). Estes estudos encontraram vários níveis de subdivisão populacional entre as espécies e diversidade no grau de similaridade entre fêmeas com comportamento de retornar ao seu local de origem.

Estudando a região controle do DNA mitocondrial de *Kinosternon flavescens*, SERB et al. (2001), determinaram a relação filogenética entre populações com obtenção da sequência completa de nucleotídeos da região controle de DNA mitocondrial, um total de 1159bp, estas exibiram 224 sítios variáveis, 113 dos quais são filogeneticamente informativos, foi encontrado uma baixa diversidade entre populações que pode ser explicada pela história da espécie, e uma baixa diversidade nucleotídica.

Outro marcador molecular, utilizados são os microssatélites que se destacam nos estudos populacionais fornecendo dados relevantes sobre diversidade, estrutura e grau de mistura genética entre as populações. Conforme Cornuet e Luikart (1996), grupos de animais que foram reduzidos são mais suscetíveis à extinção e sua conservação depende fundamentalmente da identificação populacional. Nesse cenário, a variabilidade gênica possibilita comparar indivíduos e populações (AVISE, 2004), permitindo avaliações importantes em sua capacidade adaptativa.

Os microssatélites consistem em unidades muito curtas (2 a 6pb) repetidas em tandem, ou seja, uma após a outra e conhecidas também como STRs (Single Tandem Repeat) ou SSRs (Simple Sequence Repeats) (FALEIRO et al., 2003). São classificados de acordo com o motivo repetido, podendo ser mononucleotídeo, dinucleotídeos, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos. Em relação à natureza das repetições, podem ser categorizados em perfeito, quando não apresentam interrupções; imperfeito quando exibem uma ou mais interrupções, e compostos quando possuem repetições adjacentes de uma sequência diferente (WEBER, 1990).

Em genoma animais observa-se a ocorrência de conservação de sítios de microssatélites entre espécies relacionadas, torna possível pelo menos em alguns casos; a transferência de marcadores entre espécies, ou mesmos em gênero, usando *primers*

heterólogos (MENOTTIRAMOND, OBRIEN, 1995; MOORE et al., 1991; PEPIN et al., 1995). Somando a estas características genéticas, os segmentos polimórficos gerados são pequenos suficientes para serem detectados utilizando-se de reação de PCR. Todas estas características fazem com que marcadores baseados em SRR (sequência simples repetidas) sejam marcadores ideais para mapeamento genético físico de genoma, para identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações.

Este polimorfismo elevado possibilita a identificação de perfis específicos de cada indivíduo de uma mesma espécie, conforme variação no número das repetições (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013) e sua análise permite conhecer a variabilidade genética intra e interpopulacional como também a distância genética de populações (SANTOS, 2011). Desta forma, estes marcadores se destacam nos estudos de relação de parentesco, fluxo gênico e diversidade genética (SILVA et al., 2004), contribuindo para o conhecimento de padrões filogeográficos e grau de mistura genética entre populações (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013).

A análise do mtDNA/COI e os microssatélites tem fornecido informações relevantes em estudos de estruturas populacionais de espécies, biogeografia, dispersão, fluxo gênico e colonização, possibilitando a obtenção de dados sobre variabilidade genética e sua distribuição dentro e entre populações naturais, os quais são fundamentais para adoção de medidas conservacionistas (OLIVEIRA et al., 2006). Neste contexto, destacam-se às espécies da família *Kinosternidae*, quelônios de água doce para os quais são raramente caracterizadas com o uso de marcadores. Considerando que os trabalhos referentes à taxonomia das subespécies de *K. scorpioides* são na sua maioria baseadas em descrição morfológicas (ERNST e BARBOUR, 1989; BERRY, 1978; CABRERA E COLANTONIO, 1997) é essencial realizar estudos baseados em análises moleculares para integrar a filogenia com genética de populações a fim de investigar as relações entre os processos micro e macro evolutivos e compreender como eventos históricos ajudaram a formar a distribuição geográfica atual de genes, populações e espécie (AVISE, 2004).

REFERÊNCIAS

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**, 2ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2004.

AZEREDO-ESPIN, A. M. L. **O Código de Barras da Vida baseado no DNA “Barcoding of Life”:** Considerações e Perspectivas (2005). Disponível em: <www.cgee.org.br/atividades/redirect/1749>. Acesso em: 04.10.12

BRASIL, MMA. **A Convenção sobre Diversidade Biológica** – CDB, Cópia do Decreto Legislativo nº 2, de 5 de junho de 1992. MMA. Brasília, p.30. 2002.

BARRETO, L.; RIBEIRO, L. E. S.; RIBEIRO, A. B. N.; AZEVEDO, R. R.; TAVARES, D. L.; ABREU, J. M. S.; CUTRIM, N. B. Mapeamento de áreas de ocorrência e aspectos de conservação de tartarugas (*Chelonia*) de água doce no estado do Maranhão, Brasil. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, São Luís, n. 23, p. 49-56. 2010.

BERRY, J.F., J.B. IVERSON. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) – Scorpion mud turtle. Pp.063.1-063.15 In Conservation biology of fresh water turtles and tortoises: A compilation project to the IUCN/SSC Tortoise and Fresh water Turtle Specialist Group (A.G.J. Rhodin, P.C.H. Pritchard, P.P. Van Dyke, R.A. Saumure, K.A. Buhlmann, J.B. Iverson & R.A. Mittermeier, eds.), volume 5 **Chelonia Research Monographs**. 2011.

BERRY, J. F. Variation and systematics in the *Kinosternon scorpioides* and *K. leucostomum* complexes (Reptilia: Testudines: Kinosternidae) of Mexico and Central America. Ph. D. **Dissertation**. Salt Lake City: University of Utah.

BONDIOLI, A. C. V Análise da estruturação genética dos estoques populacionais de tartaruga verde (*Chelonia mydas*) da região de Cananéia, São Paulo, com base no DNA mitocondrial. **Tese** (Doutorado). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 120f. 2009.

BOWEN BW, MEYLAN AB, ROSS JP, LIMPUS CJ, BALAZS GH, AVISE JC Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matrilineal phylogeny. **Evolution**, **46**, 865–881, 1992.

BOWEN BW, AVISE JC, RICHARDSON JI, MEYLAN AB, MARGARITOU L, HOPKINS-MURPHY S Population structure of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) in the northwest Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. **Conservation Biology**, **7**, 834–844, 1993.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Amazônia Legal 2014**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias/cartas-e-mapas/mapas-regionais/15819-amazonia-legal.html?=&t=o-que-e>>. Acesso em 26.01.2019.

BERLANT, Z. S.; STAYTON, T. C. Shell Morphology in the Kinosternidae: Functional and Evolutionary Patterns Herpetologica. **The Herpetologists' League**. v.73, n.1, p. 30 - 42 2017.

BRITES, V. L. C.; FARIA, R. G.; MESQUITA, D. O.; COLLI, G. R. **The Herpetofauna of the Neotropical Savannas**, 2009.

BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: um breve histórico, contribuições e desafios. **Estudos de Biologia: Ambiente e Diversidade**. v. 34, n.83, p.157-163, Jul/Dez 2012.

CABRERA, M.R. & S.E. COLANTONIO. Taxonomic Revision of the South American Subspecies of the Turtle *Kinosternon scorpioides*. **Journal of Herpetology**. v.31, n.4, p.507-513, 1997.

CASTRO, A. B. Biologia Reprodutiva e crescimento do muçua *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776) em cativeiro. **Dissertação** (Mestrado) Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Agrárias, Núcleo de estudos em Ciência Animal, Belém- PA, 2006.

COSTA, H. C. E BERNILS, R.S.. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**. V. 8 , N.1, 2018.

CORNUET, JM, LUIKART, G (1996). Description and power analyses of two tests for detecting population bottlenecks for allele frequency data. *Genetics*. 144: 2001- 2014.

CLAUDE, J; PARADIS, E; TONG, H. e AUFRAY, J. C. **Ecological correlates and evolutionary divergence in the skull of turtles: a geometric morphometric assessment**. *Systematic Biology*, v.53, p. 937 -952, 2004.

ERNST, C. H.; BARBOUR, R. W. **Turtles of the world**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1989. 313p.

ENGSTROM, T.N., EDWARDS, T., OSENTOSKI MF, MYERS EM. (2007) A Compendium of PCR Primers for mtDNA, Microsatellite, and Other Nuclear Loci for Freshwater Turtles and Tortoises. In: H. BRADLEY SHAFFER, NANCY N. FITZSIMMONS, ARTHUR GEORGES, AND ANDERS G.J. RHODIN. Defining turtle diversity proceedings of a workshop on genetics, ethics, and taxonomy of freshwater turtles and tortoises. Eds. Chelonian Research Monographs, 4:124-141.

FALEIRO, F. G.; SANTOS, M. C. M. Variability in cacao accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 4, p. 227-233.

FANTIN, CLEITON. Desenvolvimento de marcadores moleculares de microsatélites para o estudo do sistema reprodutivo em três espécies de tartarugas do gênero *Podocnemis*. **Tese** (Doutorado) Universidade Federal do Amazonas- UFAM, Manaus, 2008. 98 p.

FERRI, V. 2002. **Turtles & Tortoises: A Firefly Guide**. Firefly Books. 256p.

FERREIRA-JÚNIOR, PD.; TREICHEL, RL.; SCARAMUSSA, TL.; SCALFONI, JT. Morphometric pattern in *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) (Cheloniidae) hatchlings from nests with different embryo development rates. **Braz. J. Biol.** v.71 n.1, 2011.

FRANKHAM, R. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeira Preto, SP. 2008. 208p.

FERREIRA, Marcio Elias. Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: GARRAY, Irene; DIAS, Bráulio Ferreira de Souza. (Ed.). *Conservação da Biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento*. Petrópolis: Vozes, 2001.

FRITZ, UWE; PETER HAVAŠ. Order Testudines: 2013 update. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness (Addenda 2013). **Zootaxa** 3703(1): 012–014. 2013.

FRITZ, U.; HAVAŠ, P. **Checklist of Chelonians of the World**. German Federal Ministry of Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety and Museum of Zoology Dresden, 2007. 368p. 2004.

FORNEL, R. Evolução na forma tamanho do crânio no Gênero *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

HEBERT P.D.N., STOECKLE M.Y., ZEMLAK T.S., FRANCES C.M. Identification of birds through DNA barcodes. **PLOS Biology**, v.2, p.1657–1663, 2004.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. & LARSON, A. 2004. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 872p.

IVERSON, J.B.; LEM, INGRAM, C.; Molecular phylogenetics of the mud and musk turtle family Kinosternidae. **Mol Phylogenet Evol.** p. 929-39, 2013.

KIRKPATRICK, DAVID T. Originally published in The Biology, Husbandry and Health Care of Reptiles, Volume II: The Husbandry of Reptiles, Lowell Ackerman, DVM, editor. **T.F.H Publications**, 1997, p. 447-463.

MARTINS, M; MOLINA, F. B. **Panorama Geral dos répteis ameaçados do Brasil**. In: Machado, A. B. M; Drummond, G. M; Paglia, A. P. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. 1.ed. - Brasília, DF. Fundação Biodiversitas. 2008. p. 327 – 334.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. **Princípios de Morfometria Geométrica**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 1999.

MORAES, D. A. A Morfometria Geométrica e a sua “Revolução na Morfometria”: localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos. **Boletim**, ano III, n.3, 2003.

MOURA, C. C. DE M.; MOURA, G. J. B.; LISBOA, E.B.F.; LUZ, V. L. F. Distribuição geográfica e considerações ecológicas sobre a fauna de Testudines da Região Nordeste do Brasil. **Sitientibus serie Ciências Biológicas (SCB)**, v. 14, p. 14/10.13102-20, 2014.

MYERS, E. M.; JANZEN, F. J.; ADAMS, D. C.; TUCKER, J. K. Quantitative genetics of plastron shape in slider turtles (*Trachemys scripta*). **Evolution**, p. 563 – 572, 2006.

OLIVEIRA, P. M. A. **Animais silvestres e exóticos na clínica particular**. 1 ed., São Paulo: ROCCA, 2003.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p.294-307, 2006.

PÁEZ, V. P.; MORALES-BETANCOURT, M. A.; LASSO, C. A.; CASTAÑO-MOURA, O.V.; BROCK, B. C. **Biología y conservación de las tortugas continentales de Colombia**. Serie Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia, V. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 528 p. 2012.

PAHRAM, J. F.; SIMISON, W. B.; KOZAK, K. H.; FELDMAN, C. R.; SHI, H. T. New chinese turtles: endangered or invalid? A reassessment of two species using mitochondrial DNA, allozyme electrophoresis and known-locality specimens. **Animal Conservation**. v.4, p. 357-367. 2001.

PARÉS-CASANOVA, P.M. Evaluación morfométrica del cráneo de diversas razas bovinas actuales: análisis geométrico según perfles. **Rev CES Med Zootec.**; v. 9, n.1, p.58-67, 2014.

PEREIRA, L.A., A. L. DE SOUSA, M. V. J. CUTRIM, AND E. G. MOREIRA. Características Ecológicas do Habitat de *Kinosternon scorpioides* Linnaeus. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, 20 (1): 9-14. 2007.

PEREIRA, L. A.; LEMOS, J. J. S. Extrativismo de jurará *Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766 (Reptila, Chelonia, Kinosternidae) e avaliação sócio-ambiental dos pescadores no Município de São Bento-MA. In: SILVA, A.C.; FORTES, J.L.O. **Diversidade Biológica Uso e conservação de Recursos Naturais no Maranhão**. Projeto e ações em Biologia e Química, v.2, 2007. p. 269-299.

PEARSE, D. E.; ARNDT, A. D.; VALENZUELA, N.; MILLER, B. A.; CANTARELLI, V.; SITES, J. W. Estimating population structure under non-equilibrium conditions in a conservation context: continent- wide population genetics of the giant Amazon river turtle *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemidae). **Molecular Ecology**, v.15, p. 985-1006. 2006.

QUELLER, D. C., STRASSMANN, J. E. & HUGHES, C. R. Microsatellites and kinship. **Tree**, v. 8, p.285-298., 1993.

RATNASINGHAM S., HEBERT P.D.N. BOLD: the barcode of lifedata system. **Molecular Ecology Notes**, v.7, p.355–364, 2007.

ROHLF, F. J.; MARCUS L. F **A revolution in morphometrics**. **Trends in Ecology and Evolution**, p. 129-132, 1993.

REIS, S. F. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 5, n. 4, p. 571-580, 1988.

RHODIN, A.G.J.; IVERSON, J. B.; BOUR, R.; FRITZ, U.; GEORGE, A.; SHAFFER, S, H. B.; VAN DIJK, P. P. Turtles of the world. Annotated Checklist and Atlas of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and Conservation Status. **Chelonian Research Foundation and Turtle Conservancy**, n. 7, 8 ed., 292p. 2017.

RUEDA-ALMONACID, J. V., CARR, J. L., MITTERMEIER, R. A., RODRÍGUEZ-MAHECHA, J.V., MAST, R. B., VOGT, R. C., RHODIN, A. G. J., OSSA-VELÁSQUEZ, J. DE LA., RUEDA, J. N., MITTERMEIER, C. G. **Lastortugas y loscocrilanos de los**

países andinos del Trópico. Colômbia: Conservación Internacional- Andes CBC, 2007. 538p.

SANTOS, D. M. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélites em perdizes (*Rynchotus rufescens*) e outros Tinamídeos.** Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. 72 f. 2011.

SERB J.M, PHILLIPS C.A, IVERSON J.B. Molecular phylogeny and biogeography of *Kinosternon flavescens* based on complete mitochondrial control region sequences. *Mol Phylogenet Evol.* v.18, n.1, 49-62p, 2001.

SCHLUTER, D. **The ecology of adaptive radiation.** Oxford: Oxford University Press, 2000.

SILVA, M. B.; AZEVEDO, V. R.; SILVA, V. P.; KANASHIRO, M.; CYAMPI, A. Y. Avaliação da diversidade genética de uma população natural de Tatajuba (*Bagassa guianensis* Aubl. (Moraceae)), uma espécie madeireira tropical. **Comunicado Técnico 105**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1 ed. Brasília, p 1-4, 2004.

SMITH. R. B.; SMITH H. M. Synopsis of the Herpetofauna of Mexico. Guide to Mexican Turtles. John Johnson, North Bennington, v.. VI, 1979 (1980).

SPINKS, P.Q.; SHAFFER, H.B.; IVERSON, J. B.; MCCORD, W.P. Phylogenetic hypotheses for the turtle family Geoemydidae. **Molecular Phylogenetics and Evolution** (32):164–182. 2014.

TRIVEDI, S.; ALOUFI, A. A.; REHMAN, H.; SAGGU, S.; GHOSH, S. K. DNA barcoding: Tool for assessing species identification in Reptilia. **Journal of Entomology and Zoology Studies.** 4(1): 332-337 2016;

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; SEGATTO, A. L. A.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; FREITAS, L. B. **Guia Prático para estudos filogeográficos.** Ed. Sociedade brasileira de Genética. Ribeirão Preto- SP, 2013.

VALENZUELA, N.; ADAMS, D. C.; BOWDEN, R. M.; GAUGER, A. C.; DOUGLAS, M. E. Geometric Morphometric Sex Estimation for Hatchling Turtles: A Powerful Alternative for Detecting Subtle Sexual Shape Dimorphis. *Copeia* (4):735- 742, 2004.

VAN DIJK, P.P.; IVERSON, J.B.; SHAFFER, H.B.; BOUR, R.; RHODIN, A.G.J. Turtle Taxonomy Working Group/Turtles of the world, 2012 update: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. In: Rhodin, A.G.J., Pritchard, P.C.H., van Dijk, P.P., Saumure, R.A., Buhlmann, K.A., Iverson, J.B., and Mittermeier, 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*, 2012.

VAN DIJK, P. P. V.; IVERSON, J. B.; RHODIN, A. G. J.; SHAFFER, H. B.; BOUR, R. Turtles of the World, 7th Edition: Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution with Maps, and Conservation Status. **Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises – Chelonian Research.** n. 5, p.329-479, 2014.

VIEIRA, L. J. S. **Biodiversidade Amazônica**. Disponível em: <www.bibliotecadafloresta.ac.gov.br/HOME/Biodiversidade.pdf>. Acesso em: 12.10.16.

VOGT, R. C.; FAGUNDES, C. K.; BATAUS, Y. S. L.; BALESTRA, R. A. M.; BATISTA, F. R. W.; UHLIG, V. M.; SILVEIRA, A. L.; BAGER, A.; BATISTELLA, A. M.; SOUZA, F. L.; DRUMMOND, G. M.; REIS, I. J.; BERNHARD, R.; MENDONÇA, S. H. S. T.; LUZ, V. L. F. 2015. **Avaliação do Risco de Extinção de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira**. ICMBio. Disponível em < <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/7407-repteis-kinosternon-scorpioides-mucua.html>>. Acesso em 29.03.2017

WERNEBURG, I.; WILSON, L. A.B.; PARR, W. C. H.; JOYCE, W. G.. Evolution of Neck Vertebral Shape and Neck Retraction at the Transition to Modern Turtles: an Integrated Geometric Morphometric. **Systematic Biology**, 2014.

WEBER, J. L. Informatimiveness of human (Dc-Da)n (dGdT)N Polymorphisms. **Genomics**, n. 07, p.524-530, 1990.

WYNEKEN, J.; GODFREY, M. H.; BELS, V. **Biology of turtles**. Taylor & Francis Group, 2007.

_____. **Consortium for the Barcode of Life”(CBOL)**. Disponível em: <www.barcoding.si.edu>. Acesso em : 04.10.14.



CAPÍTULO II:

Artigo I

REVISTA: Herpetologica

Dimorfismo sexual em *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) Amazônico

Elba Pereira Chaves¹; Alana Lislea de Sousa²; Lígia Tchaicka³; Nivaldo Magalhães Piorski⁴; Camila Abreu Penha⁵; Almerinda Macieira Medeiros⁶; Lianne Polianny Fernandes Araújo Chaves⁷; Natália Regina Costa Aragão⁸

¹ Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

² Departamento das Clínicas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

³ Departamento de Química e Biologia, Centro de Educação, Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

⁴ Professor da Universidade Estadual do Maranhão-UFMA, São Luís, MA, Brasil.

⁵ Laboratório de Estudos Genômicos e Histocompatibilidade, Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

⁶ Departamento de Ciências Biológicas, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão - Campus Barreirinhas

⁷ Doutoranda da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal- BIONORTE.

⁸ NB Distribuidora, São Luís, MA, Brasil.

RESUMO:

A taxonomia tradicional utiliza padrões morfológicos oriundos de mensurações de tamanho e forma para auxiliar na identificação das espécies e caracterização morfológica de uma população. Tradicionalmente a morfometria linear vem sendo empregada para este estudo, entretanto algumas informações podem não ser detectáveis, sendo importante o emprego de outras ferramentas, como a morfometria geométrica. Neste estudo foram realizadas imagens e medições lineares (comprimento, largura e altura) da carapaça e plastrão de adultos (machos e fêmeas) de *Kinosternon scorpioides* a fim de averiguar o dimorfismo sexual da espécie a partir destas duas técnicas. A morfometria linear indicou que as médias de altura da carapaça, largura da carapaça e plastrão são estatisticamente diferentes entre os sexos, sendo as fêmeas mais largas e altas. Na avaliação da morfometria geométrica, a ANOVA demonstrou que existe variação de tamanho do plastrão e na forma da carapaça e plastrão, expressando uma tendência de forma para cada sexo, que acompanha o padrão morfológico indicado pela morfometria linear. O dimorfismo sexual, portanto, é verificado para esta espécie, evidenciado principalmente pelo plastrão. Este trabalho indica uma ferramenta adicional para o conhecimento fenotípico dos animais que auxiliará no estudo de populações ameaçadas.

Palavras –chave: tartaruga, morfometria, Amazônia, fauna silvestre

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Kinosternon* reúne tartarugas de pequeno a médio porte, distribuindo-se do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (Kirkpatrick, 1997; Berry e Iverson, 2011). São reconhecidas 19 espécies (Spinks et al., 2014), dentre estas *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776), a menor do gênero (Ferrara et al., 2017), composta por três subespécies: a *K. s. scorpioides* (Linnaeus, 1766), *K. s. albogulare* (Duméril e Bocourt, 1870) e *K. s. cruentatum* (Duméril, Bibron e Duméril, 1851) (Van Dijk et al., 2014). A *K. s. scorpioides* é a única descrita para o território brasileiro, ocupando principalmente as áreas da Região Amazônica, próximas a cursos de rios das áreas centro, norte e nordeste do país (Ferrara et al., 2017).

A identificação dos quelônios é baseada na análise da carapaça e plastrão, observando coloração, formato, dimensão, quantidade e disposição de suas placas dérmicas, sendo estas, portanto, componentes essenciais para a taxonomia (Rueda-Almonacid et al., 2007). Tradicionalmente, as mensurações do comprimento e largura destas estruturas são utilizadas

também para a determinação sexual, ou verificação dos padrões morfométricos populacional (Cabrera e Colantonio, 1997; Ceballos et al., 2016; Fachín-Terán et al., 2003; Gosnel et al., 2009; Lovich et al., 2010; Vieira e Costa, 2006; Forero-Medina et al., 2007).

Alguns autores indicam que a *K. scorpioides* possui um dimorfismo sexual evidente, baseado em avaliações macroscópicas de indivíduos adultos, evidenciando machos geralmente maiores que fêmeas, com cauda mais comprida e um plastrão côncavo, e fêmeas com cauda menor e plastrão reto (Castro, 2006; Iverson et al., 2001; Pereira e Lemos, 2007, Ferrara et al., 2017). Entretanto, a identificação sexual de quelônios filhotes ou jovens é difícil, pois os mesmos são praticamente indistinguíveis nessa fase da vida. Além disso, as técnicas atuais para identificar o sexo são geralmente invasivas, caras e algumas delas requerem a morte do animal (Valenzuela et al., 2004), sendo necessário o desenvolvimento de outras alternativas para permitir a determinação sexual destes animais.

A morfometria geométrica surge para elucidar situações não diagnosticadas pela morfometria tradicional ou auxiliar outros estudos de morfologia. Essa técnica permite testar e descrever a existência de variação na forma dos organismos (Fornel, 2010), sendo, portanto uma importante ferramenta para qualquer estudo fenotípico de uma estrutura (Parés-Casanova, 2014).

Ferreira-Júnior et al.(2011)utilizando a morfometria geométrica observaram que filhotes da tartaruga *Caretta caretta* apresentam diferentes formatos de carapaça e plastrão quando submetidos à diferentes períodos de incubação. Em filhotes de *Chrysemys picta* e *Podocnemis expansa* este método apresentou alta precisão na atribuição do sexo quando comparado ao sexo verdadeiro (Valenzuela et al., 2004). Na avaliação de adultos da tartaruga *Testudo kleinmanni*, Macale et al. (2011) percebeu-se diferenças no formato da carapaça e plastrão, as fêmeas apresentam estreitamento posterior da carapaça, com leve aumento lateral do plastrão, enquanto em machos a carapaça assume um formato hemisférico e o plastrão se estreita caudalmente. E para a família Kinosternidae, a morfometria geométrica foi empregada para comparação entre os gêneros *Staurotypus* e *Kinosternon*, em que foi possível separá-los pelas diferenças quanto ao formato da carapaça e plastrão (Berlant e Stayton, 2017).

Análises morfométricas podem auxiliar no conhecimento e descrição dos padrões morfológicos de uma espécie, bem como no detalhamento destas características entre populações/regiões. Considerando que o conhecimento sobre as populações brasileiras de

kinosternídeos são ainda incipientes ou incompletos, as análises morfométricas vêm reforçar ou elucidar, de forma científica, questões sobre as características morfológicas. E poderão subsidiar planos de manejo e direcionar estratégias de reprodução em cativeiro, contribuindo com a conservação da biodiversidade amazônica. Este trabalho teve como objetivo utilizar a morfometria linear e geométrica para testar a aplicabilidade das técnicas na diferenciação sexual de adultos de *Kinosternon scorpioides* brasileiros a partir da avaliação morfológica da carapaça e plastrão.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta das Amostras

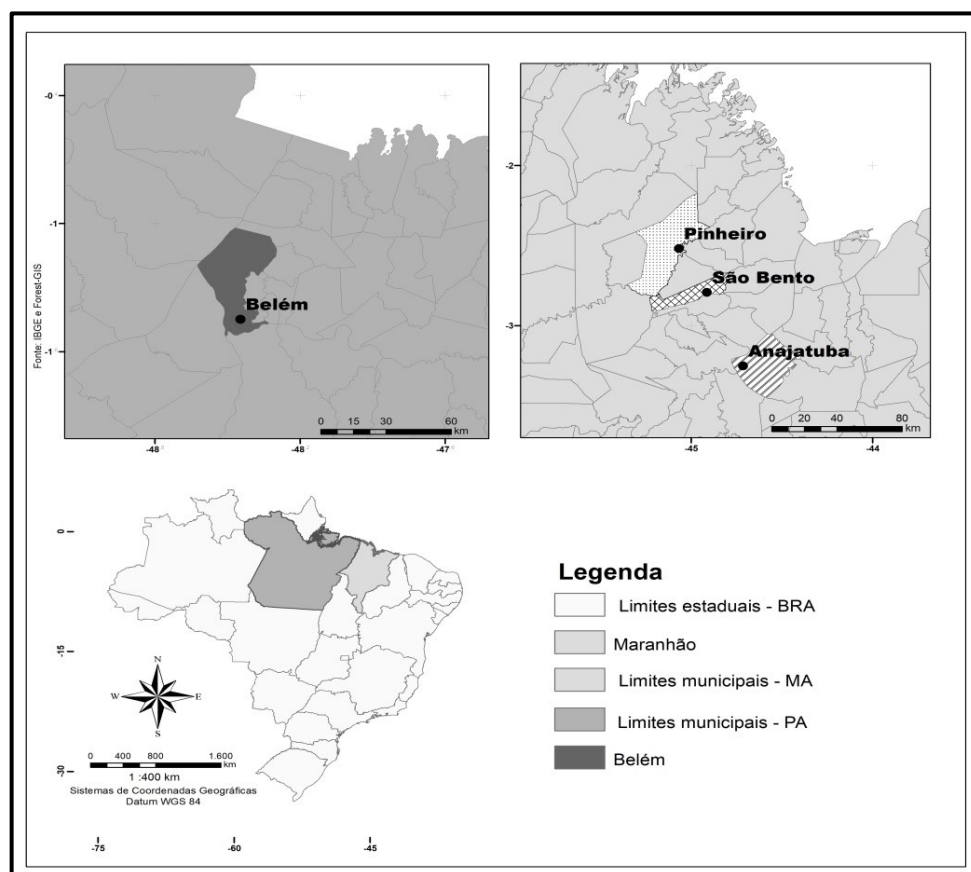
Espécimes de *Kinosternon scorpioides* foram coletados em quatro populações, no Maranhão: Pinheiro, São Bento e Anajatuba; e no Estado do Pará: Belém. As amostras do Estado do Maranhão foram capturadas manualmente “in situ” na Área de Preservação Ambiental – APA Baixada Maranhense, ao passo que aquelas procedentes de Belém foram capturadas no Bosque Rodrigues Alves e Museu Paraense Emílio Goeldi. A identificação da espécie foi realizada utilizando a chave de identificação de Rueda-Almonacid et al. (2007) e sexagem por observação visual da cauda e plastrão.

A pesquisa foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade-Icmbio/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA-MA)/licenciamento SISBIO nº 47635-4/2016 e licença do Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEAA) da UEMA sob nº 08/2015 de 24/11/2015.

Tabela 1. Distribuição amostral de *Kinosternon scorpioides*. São Luís-MA, 2019

Localidade		Morfometria geométrica						Morfometria linear		
		carapaça			plastrão					
		M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total
Maranhão	Pinheiro	11	39	50	10	39	49	11	39	50
	São Bento	18	30	48	19	31	50	16	34	50
	Anajatuba	11	36	47	11	39	49	11	39	50
Pará	Belém	13	14	27	13	13	26	10	17	27
Total		53	119	172	53	122	175	48	129	177

Legenda: M = macho; F = Fêmeas.

**Figura 1.** Distribuição geográfica dos pontos de coleta de *Kinosternon scorpioides*. São Luís -MA, 2019.

2.2 Análises morfométricas

Para avaliação a partir da análise da morfometria tradicional, os indivíduos foram separados por sexo e em seguida submetidos à biometria, com a tomada dos dados referentes ao comprimento e largura de carapaça e plastrão, e altura, através de paquímetro digital, totalizando 177 quelônios. Os dados foram tabulados em planilha do Excel 2010 e submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ($D = 0.048647$ $P > D > 0.1500$), após constatada a normalidade, os dados foram submetidos a ANOVA e Teste de média Tukey pelo SAS –Statistical Analysis System.

A variação da forma corporal foi analisada por meio morfometria geométrica, baseada em landmarks e métodos estatísticos multivariados. Os dados morfométricos foram obtidos a partir de imagens utilizando máquina fotográfica Sony® (modelo H300, zoom óptico 35x), mantendo a distância de 30 cm entre a lente e o animal. Para isso, os animais foram dispostos em uma superfície com a cabeça voltada para a esquerda, posicionada dorsalmente para visualização da carapaça, e ventralmente para observação do plastrão. As imagens foram organizadas e padronizadas em um editor de imagem, com resolução de 800x600 pixels. O conjunto de imagens foi transferido para o programa TpsDig 2.22 (Rohlf, 2010) e neste foram definidos 24 e 21 landmarks ou marcos anatômicos fixos para a carapaça e plastrão, respectivamente, conforme descrições estabelecidas (Claude et al., 2003; Valenzuela et al., 2004; Ferreira-Júnior et al., 2011). Uma vez definido e localizado cada marco anatômico, um conjunto de coordenadas cartesianas foi gerado para cada ponto (Figura 2).

No programa MorphoJ 1.06d® (Klingenberg, 2008) as coordenadas geradas foram sobrepostas pela Análise Generalizada de Procrustes (Rohlf e Slice, 1990) produzindo uma matriz com os escores das deformações parciais. Este procedimento remove a variação de tamanho, a posição e a orientação, transformando em unidade de tamanho de centróide (raiz quadrada da soma dos quadrados das distâncias de cada ponto de referência a partir do centróide), permitindo extrair somente a variação de forma do conjunto de dados (Bookstein, 1991).

Para verificar o dimorfismo sexual foram realizadas a Análise de Componentes Principais (ACP) e a Análise da Função Discriminante (AFD) com teste de permutação de 1.000 interações para 172 amostras de carapaça e 174 de plastrão, independente do local de

origem. As diferenças de tamanho e forma relacionadas ao sexo foram testadas por meio da Análise de Variância (ANOVA) também no programa MorphoJ 1.06d[®].

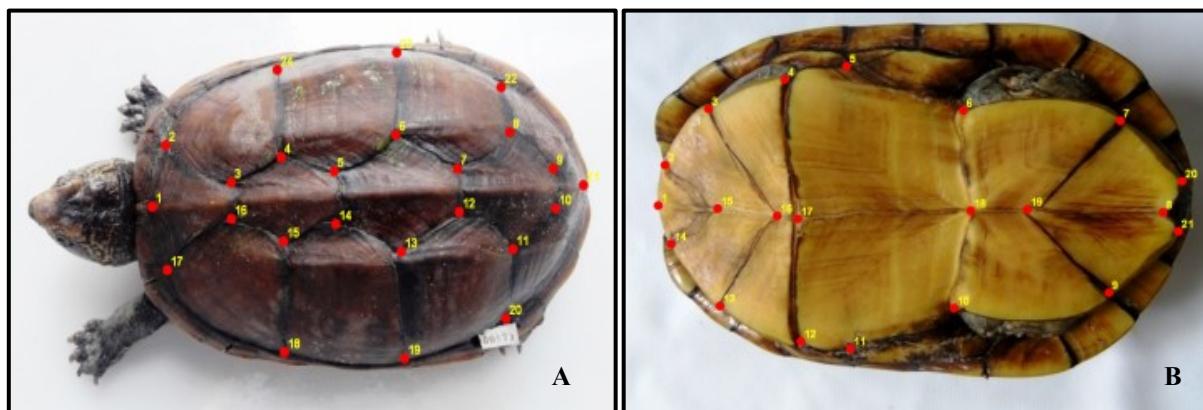


Figura 2. Localização dos landmarks dispostos na carapaça- A e plastrão- B de *Kinosternon scorpioides*. São Luís-MA/ Brasil, 2018.

3 RESULTADOS

O comprimento médio de carapaça variou de 13,85cm a 13,66cm para machos e fêmeas, respectivamente, não havendo diferença estatística significativa na comparação entre estas médias, utilizando-se $p < 0,05$ (tabela 2). A largura média da carapaça apresentou diferença significativa entre os sexos, sendo as fêmeas mais largas que os machos.

O comprimento do plastrão das fêmeas tende a ser maior do que o dos machos, muito embora isto não esteja associado a uma diferença estatística entre os sexos. Ao analisarmos a largura desta mesma estrutura, os machos apresentaram medidas inferiores às fêmeas, sendo estatisticamente diferentes entre si. Uma variação significativa também foi evidenciada para a altura dos jurarás, em que machos apresentam médias inferiores às fêmeas (tabela 2).

Tabela 2. Medidas lineares de carapaça e plastrão de machos e fêmeas *Kinosternon scorpioides scorpioides*. São Luís-MA, 2019

VALORES	CC(cm)		LC(cm)		CP(cm)		LP(cm)		ALTURA(cm)	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
Média	13,66 ^a	13,85 ^a	9,08 ^a	8,80 ^b	12,04 ^a	11,97 ^a	7,43 ^a	6,69 ^b	4,95 ^a	4,56 ^b
Máxima	16,70	16,90	11,00	13,50	15,30	14,40	13,30	9,47	6,30	5,90
Mínima	10,10	10,17	6,70	7,70	5,30	10,33	4,60	5,34	3,08	3,56
Desvp	1,23		0,85		1,87		1,48		0,57	
p*	0,26		0,027		0,82		0,0023		<0,0001	

Legenda: CC- comprimento carapaça; LC- largura carapaça; CP- comprimento plastrão; LP- largura de plastrão; M-macho; F-fêmea; * $p < 0,05$; letras diferentes- diferença estatística entre as médias.

A análise de variância (ANOVA) sobre os dados de morfometria geométrica, relacionada ao sexo, demonstrou não haver diferenças significativas em relação ao tamanho do centróide para carapaça ($F_{0,43} = 1$; $p = 0,51$), no entanto, para plastrão ($F_{26} = 1$; $p < 0,0001$) houve variação estatística. As formas da carapaça ($F_{4,45} = 44$; $p < 0,0001$) e do plastrão ($F_{17,06} = 38$; $p < 0,0001$) apresentaram diferenças entre machos e fêmeas.

Os dois primeiros componentes da PCA, aplicada sobre os dados morfométricos da carapaça corresponderam juntos a 46,93% da variação total, e 30,65% da variação quando aplicada sobre os dados morfométricos do plastrão (Figura 3I A e B). Na avaliação da carapaça, o PC-1 (28,75%) apresenta os indivíduos que possuem um encurtamento dos escudos craniais e alargamento da porção caudal e o PC- 2 (18,65%) demonstrou alargamento das placas craniais e região posterior próximo à média (Figura 3I-C). Enquanto o plastrão, o PC-1 (17,86%) representou indivíduos que possuem encurtamento cranial, alargamento lateral (placas abdominais) e com região caudal próximo à média e o PC-2 (12,79%) refletiu estrutura mais larga cranialmente, com estreitamento lateral e prolongamento caudal, com placas anais mais largas e compridas que a média observada (Figura 3I-D). Os machos e fêmeas distribuem-se ao longo dos dois eixos (positivo e negativo), ocorrendo sobreposição destes indivíduos no gráfico de componentes principais, especialmente para estrutura dorsal.

No que se refere à Avaliação da Função Discriminante - AFD de machos e fêmeas, os valores para carapaça e plastrão foram respectivamente: distância de Procrustes: 0,02026167/0,02832625; de Mahalanobis: 2,2570/ 3,0984; e $p < 0,0001$ / $p < 0,0001$ indicando haver diferenças no formato de machos e fêmeas para ambas as estruturas avaliadas.

A tabela de classificação de validação cruzada (“cross-validation”) da AFD foi de 77,04% das fêmeas e 72% dos machos para a carapaça, e de 90,16% das fêmeas e 83,02% dos machos para plastrão (Tabela 3). O histograma de frequências através da AFD “cross-validation” mostrou sobreposição entre machos e fêmeas (Figura 3II A e B), semelhante ao verificado na ACP. Na avaliação do gráfico wireframe de forma para AFD, verificou-se tendência delgada lateralmente na forma da carapaça dos machos em relação às fêmeas (Figura 3II C) e com o plastrão do jurará macho apresentando estreitamento entre as placas abdominais e femorais, assim como um aumento no tamanho dos escudos anais (Figura 3II D).

Tabela 3. Classificação da Análise Função Discriminante “cross-validation” entre sexos, da carapaça e plastrão de *Kinosternon scorpioides*. São Luís, 2019

Validação cruzada						
Sexo a priori	Resultado AFD -Carapaça		Total	Resultado AFD-Plastrão		Total
	Fêmea	Macho		Fêmea	Macho	
Fêmea	94 (77,04%)	28 (22,95%)	122(100%)	110 (90,16%)	12 (09,84%)	122 (100%)
Macho	14 (28,00%)	36 (72,00%)	50 (100%)	09 (16,98%)	44 (83,02%)	53(100%)

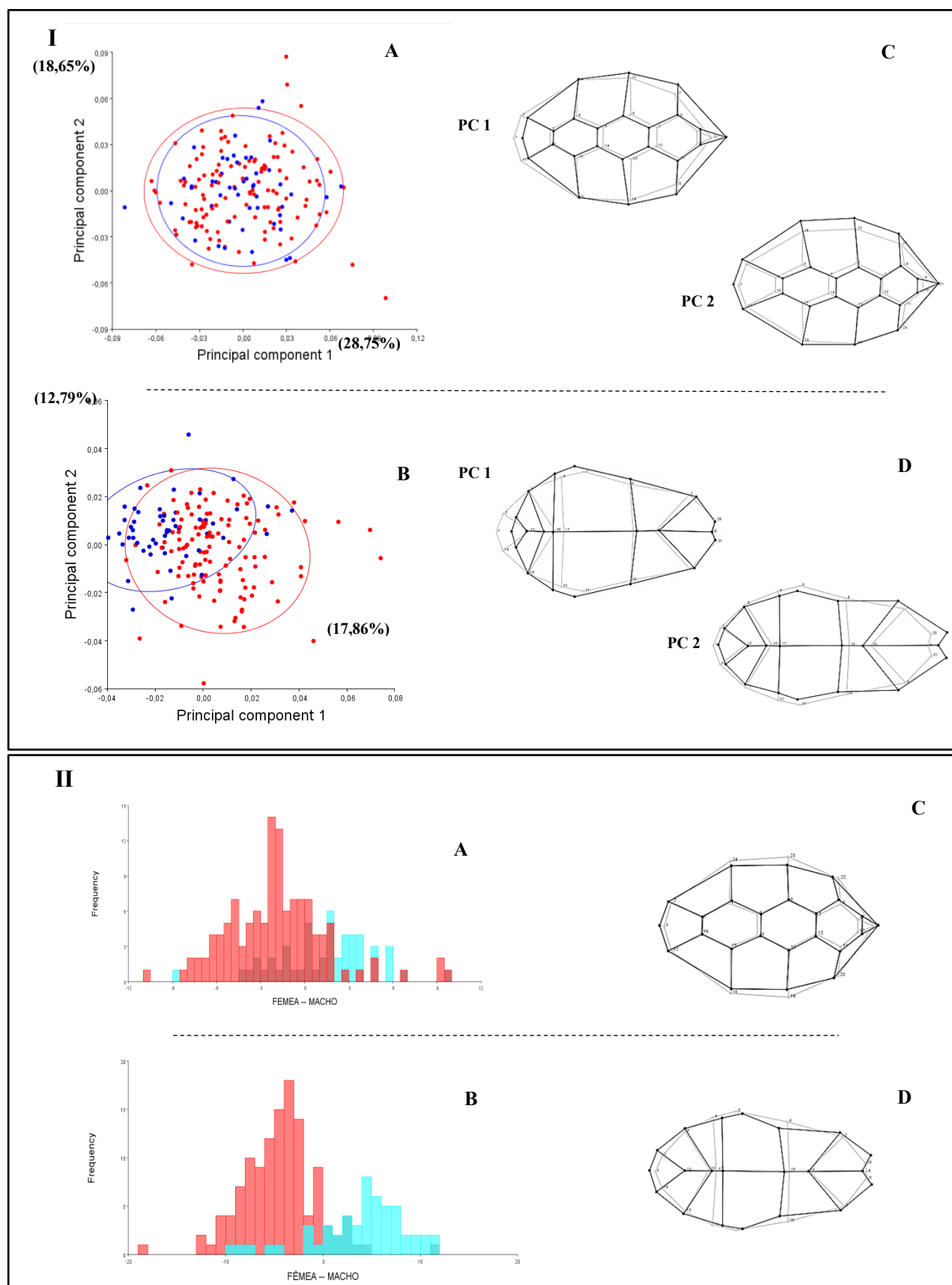


Figura 3. I-Análise de Componentes Principais/gráfico wireframe de forma (carapaça - A e C; e plastrão B e D) e II-Análise da Função Discriminante/Histograma/ wireframe de forma (carapaça - A e C; e plastrão B e D) de *Kinosternon scorpioides*. São Luís-MA, 2019. Legenda: linha cinza-média, linha preta-variação, azul- macho, vermelho- fêmea.

Apesar dos dados de morfometria linear revelarem que machos possuem médias de comprimento de carapaça superiores, seguindo o proposto na literatura para a espécie (IVERSON et al., 2001; BARRETO et al., 2009; FERRARA et al., 2017), não foi evidenciada variação estatística significativa para este parâmetro em relação ao sexo. De uma forma geral machos de quelônios terrestres e semiaquáticos são maiores que fêmeas, enquanto para aquelas espécies aquáticas os machos são menores (BERRY e SHINE, 1980). Por exemplo, os indivíduos machos de *Kinosternon leucostomum postinguinale* são maiores que as fêmeas (CEBALLOS et al., 2016), enquanto a fêmea da *Podocnemis unifilis* são maiores que os machos (FACHÍN-TERÁN e VOGT, 2004).

O *K. scorpioides* insere-se no grupo dos pequenos quelônios do Novo Mundo, sendo o tamanho médio de machos e fêmeas inferior às outras tartarugas de água doce. A média encontrada do comprimento da carapaça corrobora com os dados descritos por Rueda-Almonacid et al.(2007), que segundo eles, a espécie comumente não superam 15cm de comprimento. Entretanto encontramos na Ilha de San Andrés/Colômbia exemplares machos de *Kinosternon scorpioides albogulare* com dimensão superiores (FORERO-MEDINA et al., 2007).

O comprimento do plastrão também não demonstrou diferenças quanto ao sexo, embora a menor média de comprimento desta estrutura tenha ocorrido nos machos (Tabela 2). Possivelmente esta variação na média estar relacionada às questões reprodutivas, eles necessitariam de um plastrão mais curto para expor sua cauda e seu órgão sexual com eficiência, garantindo o sucesso da cópula. As fêmeas do tracajá *Podocnemis unifilis* seguem este mesmo padrão, apresentando um plastrão maior em relação aos machos (FACHÍN-TERÁN e VOGT, 2004).

Em relação às medidas de largura da carapaça e plastrão, e da altura da carapaça dos espécimes, os resultados demonstraram que machos e fêmeas são diferentes entre si. E para todas essas as medidas as fêmeas são numericamente maiores, sendo mais largas e altas que machos. Essa diferença sexual também foi constatada por Viera e Costa (2006) para fêmeas de *Trachemys scripta elegans* e semelhante ao descrito por estes autores, acreditamos que esta situação está relacionada à necessidade de um espaço maior para abrigar folículos ovarianos e os ovos ao longo dos ovidutos na estação reprodutiva, indicações que foram propostas por alguns autores para os quelônios. Darwin (1871) relacionou a evolução do dimorfismo sexual a uma seleção da fecundidade de fêmeas, segundo essa teoria, as fêmeas

maiores possuem maior potencial reprodutivo. Entretanto podem ser encontrados em outras espécies de quelônios machos com dimensões superiores às fêmeas, conforme observado nas populações de *Kinosternon leucostomum postinguinale* da Colômbia (CEBALLOS et al., 2016) em que os machos apresentaram-se mais pesados, mais longos e mais largos que as fêmeas.

E no quesito altura, outro quelônio amazônico, a *Podocnemis sextuberculata* possui também indivíduos machos mais baixos que as fêmeas (FACHÍN-TERÁN et al., 2003). Este quesito altura da carapaça foi descrito anteriormente (MOLINA, 1992, CASTRO, 2006; PEREIRA e LEMOS, 2007) como sendo um item de diferenciação sexual dos quelônios, em que machos são mais baixos que fêmeas (FERRARA ET AL., 2017). Desta forma, essas dimensões dos caracteres: largura de carapaça e plastrão, e altura da carapaça podem ser considerados critérios de diferenciação sexual para o juraré.

Em relação à morfometria geométrica, o tamanho do centróide para a carapaça e plastrão apresentaram resultados divergentes, sendo evidenciada variação estatística apenas para a estrutura ventral quando submetidas à análise de variância. Entretanto o mesmo teste revelou que existem diferenças quanto ao sexo na avaliação da forma das duas estruturas (dorsal e ventral). Considerando o exposto sobre a análise linear de dados dos indivíduos, percebemos que o comprimento não foi um caráter que permitiu a separação por sexo, sendo diferenças estatísticas para a largura e altura dos espécimes, situação que pode ter contribuído para a apresentação de variação no formato das estruturas quando submetidas a essa outra técnica morfométrica.

Embora a ANOVA tenha revelado que existem diferenças no formato em relação ao sexo, a Análise de Componentes Principais não foi sensível em separar adequadamente machos de fêmeas, ocorrendo sobreposição de alguns indivíduos, levando-nos a perceber que o formato típico por sexo não pode ser inferido para nenhuma das vistas (dorsal ou ventral) através desta análise. Entretanto é importante destacar que o plastrão apresentou uma sobreposição inferior àquela apresentada para a carapaça, onde fêmeas estão mais dispostas para o lado positivo do eixo X, demonstrando serem em sua maioria mais largas lateralmente do que machos, os quais se concentraram no lado negativo do gráfico. Informação que confirmam os dados obtidos para análise linear, em que os machos apresentaram um estreitamento lateral do plastrão, e que macroscopicamente também pode ser inferido. Macale et al., (2011) a semelhança do indicado em nosso trabalho, observaram que o plastrão e

carapaça da *Testudo kleinmanni* sofre variação morfológica ligada ao sexo, em machos o plastrão se estreita e a carapaça assume um formato hemisférico, enquanto em fêmeas o plastrão é mais largo e a carapaça possui um estreitamento caudal.

A sobreposição de grupos também foi observada na Análise Função Discriminante-AFD, em que não foi possível separar em sua totalidade os indivíduos em relação ao sexo. A Distância de Procrustes entre os dois grupos foi próxima à zero, indicando fraca variação na forma. Entretanto os dados de validação cruzada (“cross-validation”), demonstraram um bom percentual de distinção para carapaça, e um ótimo de diferenciação sexual para o plastrão. E semelhante ao verificado na ACP, a AFD os melhores resultados foram obtidos utilizando a região ventral do quelônio. Segundo Myers et al. (2006) o plastrão é uma estrutura que possui um padrão ideal para análise morfométrica, em virtude da mesma ter um formato plano, garantindo locais de referências adequados para análise, sendo este o motivo pelo qual a melhor validação cruzada e uma sobreposição inferior de grupos na ACP e AFD tenha ocorrido quando ocorreu a avaliação desta estrutura.

O gráfico de forma (wireframe) da AFD (Figura 3 II - C e D) revela uma tendência morfológica para cada sexo, sendo esta distinção mais evidente para região ventral. As carapaças das fêmeas tendem ser mais largas lateralmente e curtas cranialmente do que os machos. E para o plastrão, os machos de jurarás possuem uma tendência a serem também mais estreitos que as fêmeas ventralmente. Estes padrões morfológicos corroboram com os achados na morfometria linear.

Além disto, é percebido um prolongamento lateral dos escudos anais em machos, evidenciando a formação de um entalhe em “V”, o qual não é evidente em fêmeas (Figura 3 I e II- D). Em estudo morfológico a “olho nu”, realizado para mesma espécie, Berry e Iverson (2011) relataram que este entalhe está presente apenas nas populações de América do Sul, sendo reduzido nas fêmeas, conforme observado neste trabalho. Esse entalhe destacado pela morfometria geométrica pode ter relacionado às questões reprodutivas, pois acreditamos que a formação desse entalhe favoreça a cópula, permitindo a formação de uma área de encaixe e apoio, facilitando a passagem do órgão sexual para dentro da fêmea. Esta suposição também foi mencionada por Macale et al. (2011), que verificaram o entalhe evidente somente em adultos machos da tartaruga *Testudo kleinmanni* e indicaram que este formato está relacionado à movimentação cauda e facilitação da cópula. Sendo assim, esse formato da

região caudal do plastrão de machos de *K. scorpioides* pode ser utilizado como sendo um caráter de distinção sexual nos indivíduos brasileiros.

5 CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que o *Kinosternon scorpioides* possui dimorfismo sexual para os parâmetros altura, e largura de carapaça e plastrão, em que fêmeas são mais altas e largas que os machos. A morfometria geométrica, referente a forma da carapaça e plastrão são estatisticamente diferentes em relação ao sexo. Esta ferramenta evidenciou uma tendência de forma para cada sexo, em que os machos apresentam carapaça e plastrão mais estreitos do que as fêmeas, um padrão que corrobora o verificado na morfometria linear. Acrescenta-se que o plastrão é a estrutura que melhor expressa diferença sexual entre os indivíduos, podendo ser a região de escolha para novos estudos fenotípicos. E considerando a importância das estruturas avaliadas para a taxonomia, os nossos resultados poderão contribuir para conhecimento das populações de *K. scorpioides* amazônico.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Maranhão-UEMA/Brasil/ PPGCA; Ao Grupo de Estudos em Anatomia-GRANATO da UEMA; Ao Fundo de Amparo a Pesquisa do Maranhão- Fapema/ Projeto Rebax; Ao IBAMA/Brasil; e ao Museu Emilio Goeldi e Bosque Rodrigues Alves-PARÁ/Brasil;

LITERATURA CITADA

BERRY, J.F., J.B. IVERSON..*Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) – Scorpion mud turtle. Pp.063.1-063.15In Conservation biology of fresh water turtles and tortoises: A compilation project for the IUCN/SSC Tortoise and Fresh water Turtle Specialist Group (A.G.J. Rhodin, P.C.H. Pritchard, P.P. Van Dyke, R.A. Saumure, K.A. Buhlmann, J.B. Iverson & R.A. Mittermeier, eds.), volume 5 **Chelonia Research Monographs**. 2011

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

BARRETO, L.; LIMA, L. C.; BARBOSA, S.. Observations on the Ecology of *Trachemys adiutrix* and *Kinosternon scorpioides* on Curupu Island, Brazil. **Herpetological Review**, v.40, n.3, 283–286, 2009.

- CABRERA, M.R.; S.E. COLANTONIO. Taxonomic Revision of the South American Subspecies of the Turtle *Kinosternon scorpioides*. **Journal of Herpetology** 31(4): 507-513. 1997.
- CASTRO, A. B. Biologia Reprodutiva e crescimento do muçã *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776) em cativeiro. **Dissertação** (Mestrado) Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Agrárias, Núcleo de estudos em Ciência Animal, Belém- PA, 2006.
- CEBALLOS, C. P., D. ZAPATA, C. ALVARADO, AND E. RINCÓN. Morphology, Diet, and Population Structure of the Southern White-lipped Mud Turtle *Kinosternon leucostomum postinguinale* (Testudines: Kinosternidae) in the Nus River Drainage, Colombia. **Journal of Herpetology** 50(3): 374–380. 2016
- FACHÍN-TERÁN, A., R. C. VOGT, AND J. B. THORBJARNARSON. Estrutura populacional, razão sexual e abundância de *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemididae) na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. **Phyllomedusa** 2(1): 43-633. 2003.
- FERRARA, C., C. K. FAGUNDES; T. MORCATTY; THAIS MORCATTY. **Quelônios Amazônicos: Guia de identificação e distribuição**. Wildlife Conservation Society- Manaus, Brasil. 2017.
- FERREIRA-JÚNIOR, P. D., R. L. TREICHEL; T. L. SCARAMUSSA AND J. T. SCALFONI. Morphometric pattern in *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) (Cheloniidae) hatchlings from nests with different embryo development rates. **Brazilian Journal Biology** 71(1): 151-156. 2011.
- FORNEL, R. Evolução na forma tamanho do crânio no Gênero *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). **Tese**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil. 2010
- FORERO-MEDINA, G.; O. V. CASTAÑO-MOR; O. MONTENEGRO. Abundance, Population Structure, and Conservation of *Kinosternon scorpioides albogulare* on the Caribbe an Island of San Andrés, Colombia. **Chelonian Conservation and Biology** 6(2):163-169. 2007.
- GOSNEL, J. S. L.; RIVERA, G.L.; BLOB, R.W. A Phylogenetic analysis of sexual size dimorphism in turtles. **Herpetologica** 65(1): 70–81. 2009.
- KIRKPATRICK, D. T. Originally published in The Biology, Husbandry and Health Care of Reptiles. p. 447-463 in **The Husbandry of Reptiles**, volume 2 (L. Ackerman, ed.). T.F.H Publications. 1997.
- MACALE, D.; VENCHIAND, A.; SCALICI, M. Shell shape and size variation in the Egyptian tortoise *Testudo kleinmanni* (Testudinidae, Testudines) **Folia Zoologica** 60(2):167-175. 2011
- MOLINA, F.B. O Comportamento Reprodutivo de Quelônios. **Biotemas**, 5 (2): 61 – 70. 1992.
- MYERS, E. M., F. J. JANZEN, D. C. ADAMS, J. K. TUCKER.. Quantitative genetics of plastron shape in slider turtles (*Trachemys scripta*). **Evolution**, 60 (3): 563 – 572. 2006

LOVICH, J. E., M.D.ZNARI, M.A. A.BAAMRANE, M. NAIMI, ANDA. MOSTALIH. Biphasic geographic variation in sexual size dimorphism of turtle (*Mauremys leprosa*) population salongan environmental gradient in orocco. **Chelonian Conservation and Biology**9(1): 45–53. 2010.

PARÉS-CASANOVA, P.M. Evaluación morfométrica delcráneo de diversas razas bovinas actuales: análisis geométrico segúnperfiles. **Rev CES MedZootec**9(1):58-67. 2014.

PEREIRA, L. A.; LEMOS, J. J. S. Extrativismo de jurará *Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766 (Reptila, Chelonia, Kinosternidae) e avaliação sócio-ambiental dos pescadores no Município de São Bento-MA. In: SILVA, A.C.; FORTES, J.L.O. **Diversidade Biológica Uso e conservação de Recursos Naturais no Maranhão**. Projeto e ações em Biologia e Química, v.2., p. 269-299. 2007

PEREIRA, L.A., A. L. DE SOUSA, M. V. J. CUTRIM, AND E. G. MOREIRA. Características Ecológicas do Habitat de *Kinosternon scorpioides* Linnaus. Boletim do Laboratório de **Hidrobiologia**, 20 (1): 9-14. . 2007.

RUEDA-ALMONACID, J. V., J. L.CARR, R. A. MITTERMEIER, J.V. RODRÍGUEZ-MAHECHA, , R. B., MAST, R. C. VOGT, , A. G. J.RHODIN, J. DE LA.Ossa-Velásquez, J. N.Rueda,C. G. Vieira, C. S. andE. M. M. Costa. Análise da estrutura populacional de *Trachemys scripta elegans* (Chelonia) no Parque Ecológico Olhos D’água – Brasília – DF,Universitas: **Ciências da Saúde** 4(1 / 2): 1-8. 2006.

Valenzuela, N., D. C. Adams, R. M. Bowden, A. C. Gauger, and M. E. Douglas..Geometric Morphometric Sex Estimation for Hatchling Turtles: A Powerful Alternative for Detecting Subtle Sexual Shape Dimorphis. **Copeia** (4):735- 742. 2004

VAN DIJK, P. P. V., J. B. IVERSON, A. G. J.RHODIN, H. B. SHAFFER; R. BOUR.**Turtles of the World, in Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution with Maps, and Conservation Status**. Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises,Chelonian Research. p.329-479, 2014.

VIEIRA, C. S.; COSTA,E. M. M. Análise da estrutura populacional de *Trachemys scripta elegans*(Chelonia) no Parque Ecológico Olhos D’água – Brasília – DF, **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 4, n. 1 / 2, p. 1-8, 2006.



CAPÍTULO III:

Artigo 2

Revista: Genetics and Molecular Biology)

Variabilidade morfológica e genética de populações de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766)

Elba Pereira Chaves¹; Alana Lislea de Sousa²; Lígia Tchaicka³

¹ Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

² Departamento das Clínicas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

³ Departamento de Química e Biologia, Centro de Educação, Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

RESUMO

As populações da tartaruga *Kinosternon scorpioides* foram avaliados através da morfometria geométrica e por dois marcadores moleculares, mtDNA (Citocromo Oxidase Subunidade 1-COI) e nuclear (10locis microssatélites), além da observação visual, com o objetivo de identificar os espécimes e verificar variações morfológicas e genética. Os dados morfométricos indicaram que os indivíduos das diferentes localidades possuem formatos diferentes, os brasileiros são mais estreitos, enquanto os andinos são mais largos caudalmente. Os espécimes brasileiros formam um clado distinto dos indivíduos colombianos, com índice de diversidade genética (COI) de 3%. Verificamos ainda que as populações brasileiras são pouco diferenciadas geneticamente. Os resultados obtidos são importantes para o conhecimento da espécie, e servirão para subsidiar outros estudos de filogenia da família Kinosternidae.

Palavras-chave: Amazônia, tartaruga do lodo, morfologia, filogeografia

1 INTRODUÇÃO

O jurara (*Kinosternon scorpioides*) é um pequeno quelônio com distribuição ao longo das Américas e que ocupa corpos d'água de baixa correnteza, riachos e áreas alagadas (RUEDA-ALMONACID et al., 2007; FERRARA et al., 2017). No Brasil é encontrado principalmente nos campos alagados do Maranhão e Pará (Vogt, 2008), onde sofre pressões antrópicas, de captura indiscriminada e comércio ilegal.

Morfologicamente a espécie possui carapaça em formato oval (36 escudos), fortemente tricarínada (BERRY e IVERSON, 2011), de coloração marrom clara ou escura, verde oliva ou preta, com manchas marrons; e um plastrão (11 escudos) com coloração amarelo ovo, amarelo escuro ou marrom claro, apresentando dobradiças no lobo anterior e posterior que os protegem contra predadores (ERNST e BARBOUR, 1989). A identificação destes animais é baseada na observação destas estruturas, dos membros, cabeça e pescoço (RUEDA-ALMONACID et al., 2007).

A morfometria geométrica é uma técnica relativamente nova que surgiu para auxiliar em trabalhos que descrevam a morfologia de organismos. Ela permite testar a existência de variação na forma (FORNEL, 2010), sendo, portanto, uma importante ferramenta para qualquer estudo fenotípico de uma estrutura corporal (PARÉS-CASANOVA, 2014) e que pode contribuir com identificação de uma espécie animal.

Apesar da ampla distribuição geográfica dos kinosternídeos, esse grupo animal ainda é pouco explorado pelo meio científico, e as informações sobre a sua genética, bem como filogenia ainda são escassos. Os marcadores moleculares atualmente cumpre um importante papel no conhecimento das espécies, contribuindo significativamente com a genética de populações. A grande vantagem na sua utilização é o fato de serem pouco influenciados por fatores ambientais e pela grande quantidade de caracteres informativos presente nos indivíduos (AVISE, 1994).

Um dos tipos de marcadores moleculares mais utilizados para identificação animal é o gene Citocromo Oxidase Subunidade 1 (CO1), conhecido como DNA barcode (Código de Barras)(AZEREDO, 2005). Martin et al. (2013), utilizando esse gene, elevaram a subespécie *T carolina triunguis* para o status de espécie (*Terrapene mexicana*), enquanto a *T.c. mexicana* e a *T. c. yucatanana* foram consideradas como subespécies da *T. mexicana*, levando a uma reorganização da taxonomia da espécie. E Naro-Maciel et al. (2010), ao investigar a variação intraespecífica de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) de áreas do Atlântico e do Pacífico oriental evidenciaram um gradiente norte-sul das áreas de nidificação. Os microssatélites são ideais para estudos populacionais em diferentes níveis, podem trazer informações sobre padrões filogeográficos, sendo ainda capazes de responder a questões recentes dentro de uma mesma espécie (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013). Esses marcadores foram empregados em outros quelônios, a *Podocnemis expansa* (VALENZUELA, 2000; PEARSE et al., 2006), *Podocnemis unifilis* (FANTIN, 2008) e *Chinemys reevesii* (YE et al., 2009) com sucesso.

Considerando a importância do bioma amazônico, o conhecimento sobre a morfologia e genética da espécie *Kinosternon scorpioides* é uma valiosa contribuição para conservação da fauna brasileira. Desta forma, este trabalho teve como objetivo de avaliar as populações de jurará a fim de averiguar possíveis variações fenotípicas e genéticas, bem como suas relações filogenéticas com as demais espécies da família Kinosternidae.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta das Amostras

Espécimes de *Kinosternon scorpioides* foram coletados em quatro populações brasileiras (Estado do Maranhão: Pinheiro, São Bento e Anajatuba; e Estado do Pará: Belém) e uma da Colômbia. As amostras do Estado do Maranhão foram capturadas manualmente “in situ” na Área de Preservação Ambiental – APA Baixada Maranhense, e aquelas procedentes

de Belém foram capturadas no Bosque Rodrigues Alves e Museu Paraense Emílio Goeldi. Os espécimes colombianos foram obtidos a partir da coleção de registro fotográfico da Universidad de Los Andes na Colômbia.

A pesquisa foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade-Icmbio/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA-MA)/licenciamento SISBIO nº 47635-4/2016 e licença do Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEAA) da UEMA sob nº 08/2015 de 24/11/2015.

Tabela 1. Distribuição amostral da análise fenotípica entre as diferentes populações de *Kinosternon scorpioides*, São Luís-MA, 2019

LOCALIDADE	SEXO		Total
	Machos	Fêmeas	
São Bento	16	34	50
Anajatuba	11	39	50
Pinheiro	11	39	50
Belém	10	17	27
Colômbia	12	08	20
Total	60 (30,46%)	137 (69,54)	197 (100%)

Tabela 2. Distribuição amostral utilizada na análise morfométrica de *Kinosternon scorpioides*, São Luís-MA, 2019

POPULAÇÕES/ GRUPOS			AMOSTRAS					
País	Estado	Localidade	Carapaça			Plastrão		
			M	F	Total	M	F	Total
Brasil	Maranhão	Pinheiro	11	39	50	10	39	49
		São Bento	18	30	48	19	31	50
		Anajatuba	11	36	47	11	39	49
	Pará	Belém	13	14	27	13	13	26
Colômbia	-	-	11	9	20	10	09	19
Total de amostras			64	131	192	63	131	194

Legenda: M = macho; F = Fêmeas.

Tabela 3. Descrição das amostras de *Kinosternon scorpioides* utilizadas na avaliação genética. São Luís-MA, 2019

PAÍS	ESTADO	LOCALIDADE	AMOSTRAS mtDNA/COI	AMOSTRAS Dna Nuclear/ microsatélite
Brasil	Maranhão	Pinheiro	05	48
		São Bento	05	
		Anajatuba	05	-
		Raposa	02	
	Tocantins	Araguaína	01	-
	Mato Grosso		01	-
	Amazonas	Manaus	02	-
	Pará	-	13	19
Colômbia		-	05	03
Total de amostras			39	70

2.2 Análise Fenotípica

Para a avaliação fenotípica foi realizada observação visual da carapaça e plastrão de todos os animais, verificando a quantidade e localização de placas dérmicas, assim como também o padrão de coloração da pele dos indivíduos, formato da cabeça e de outras estruturas auxiliares na identificação, conforme a chave de identificação de Rueda-Almonacid et al. (2007). Após observação visual, todos os indivíduos foram dispostos em superfície para registro de imagens e posteriormente editadas.

2.3 Avaliação Morfométrica e Estatística

A variação morfológica foi analisada por meio de técnicas morfométricas baseadas em landmarks e métodos estatísticos multivariados. Os dados morfométricos foram obtidos a partir de imagens utilizando máquina fotográfica Sony® (modelo H300, zoom óptico 35x), mantendo a distância de 30 cm entre a lente e o animal. Para isso, os animais foram dispostos em uma superfície com a cabeça voltada para a esquerda, posicionada dorsalmente para visualização da carapaça, e ventralmente para observação do plastrão. As imagens foram organizadas e padronizadas em um editor de imagem, com resolução de 800x600 pixels.

O conjunto de imagens foi transferido para o programa TpsDig 2.22 (Rohlf, 2010) e neste foram definidos 24 e 21 landmarks ou marcos anatômicos fixos para a carapaça e

plastrão, respectivamente, conforme descrições estabelecidas (CLAUDE et al., 2003; VALENZUELA et al., 2004; FERREIRA-JÚNIOR et al., 2011). Uma vez definido e localizado cada marco anatômico, um conjunto de coordenadas cartesianas foi gerado para cada ponto (Figura 2).

No programa MorphoJ 1.06d[®] (KLINGENBERG, 2008) as coordenadas geradas foram sobrepostas pela Análise Generalizada de Procrustes (ROHLF e SLICE, 1990) produzindo uma matriz com os escores das deformações parciais. Este procedimento remove a variação de tamanho, a posição e a orientação, transformando em unidade de tamanho de centróide (raiz quadrada da soma dos quadrados das distâncias de cada ponto de referência a partir do centroide), permitindo extrair somente a variação de forma do conjunto de dados (BOOKSTEIN, 1991). Os padrões de mudança de forma ao longo dos eixos canônicos foram visualizados usando gráficos de forma gerados no MorphoJ 1.06. A diferença de tamanho e forma entre as populações foi testada por meio da Análise de Variância (ANOVA) no programa MorphoJ 1.06d[®].

Para quantificar a variação morfométrica de cada população utilizou-se a distância de Mahalanobis por *pairwise* (medida de distância entre amostras). A significância estatística da distância de Mahalanobis para comparação *pairwise* foi avaliada por um teste de permutação com 10.000 interações contra a hipótese nula de nenhuma diferença entre as espécies. A quantificação da variação de tamanho de centróide de cada população foi realizada pela Distância de Procrustes. Essas análises foram executadas com o auxílio do programa MorphoJ 1.06d (KLINGENBERG, 2008).

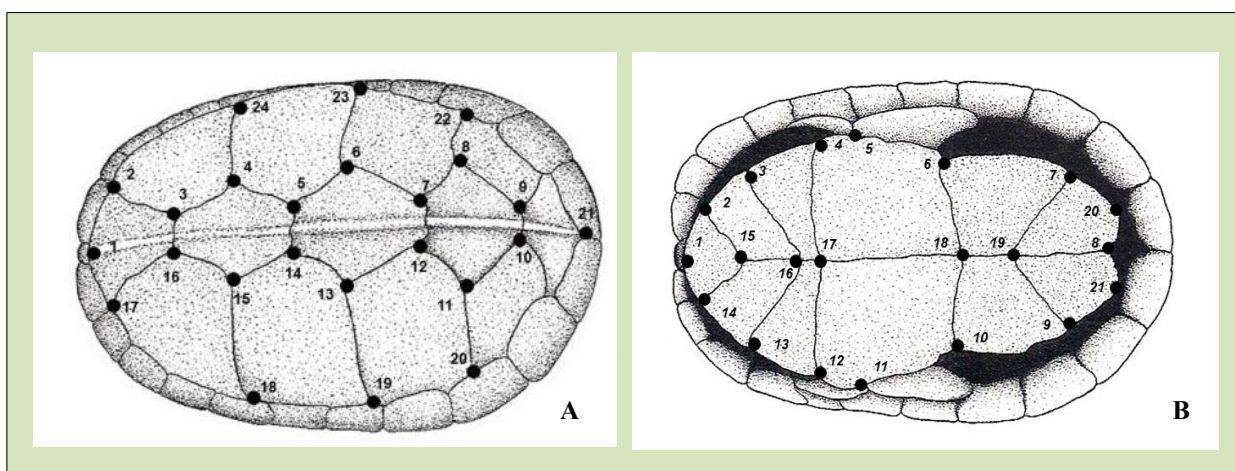


Figura 1. Localização dos landmarks dispostos na carapaça- A e plastrão- B de *Kinosternon scorpioides*. São Luís-MA/ Brasil, 2019.

2.4 Avaliação genética

De cada animal foi coletados 1ml de sangue (178 animais), sem anticoagulante, do seio venoso cervical, que foi imediatamente acondicionado em tubos de ependorfs contendo 1ml de etanol absoluto, mantidas em temperatura ambiente, em local fresco e livre de incidência de luz solar. Posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer a -20° . A extração de DNA foi realizada por um kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit Technical Manual) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (ver anexo). O resultado da extração foi observado pelo método da eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e posteriormente visualizado em transiluminador ultravioleta.

Para a amplificação do gene mitocondrial Citocromo Oxidase sub unidade I- COI fez-se uso dos primers LCO-1490('GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG') e HCO-2198('TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA') (2 μ M) elaborados por Folmer et al. (1994) e utilizados com eficiência em outros pesquisadores (McGoWIN et al., 2011; M.VENCES et al., 2012). A obtenção dos fragmentos foram obtidos por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (PALUMBI, 1996), utilizando um volume total de 10 μ L de reação, contendo 1 μ L de cada primer, 5 μ L de mix, 1 μ L de H₂O e 2 μ L de DNA, para uma reação de 35 ciclos : 94° por 2 minutos de temperatura inicial, 94° por 30 segundos para desnaturação; 45° a 45 segundos para o anelamento dos primers; 72° a 2 minutos de extensão inicial e 72 a 5 minutos para extensão final. O resultado da amplificação foi obtido pela eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed™. Os produtos de amplificação foram purificados por método

enzimático utilizando *PCR Product Pre-sequencing Kit* (Amersham) conforme instruções do fabricante e a leitura das sequências em Sequenciador Automático em empresa especializada.

As sequências de DNA mitocondrial foram analisados visualmente e alinhadas com o algoritmo ClustalW através do programa MEGA 6.06, o qual também permitiu a tomada de medidas de variabilidade genética (TAMURA et al., 2011) e elaboração de árvores pelo método de *Neighbor-joining* utilizando como *outgroup* (ver anexo) dados obtidos no GenBank Home-NCBI-NIH para o gênero *Kinosternon*. Para verificar o melhor modelo evolutivo para as sequências foi utilizado o programa Partition Finder 2 (LANFEAR et al., 2016). Para determinar as relações filogenéticas, foi utilizada a Inferência Bayesiana no programa MrBayes 3.2. (RONQUIST et al., 2012). A análise foi implementada com duas corridas independentes de quatro cadeias cada, por um milhão de gerações. Os parâmetros das cadeias foram amostrados a cada 1.000 gerações e as primeiras 1.000 árvores de cada corrida foram descartadas como burn-in, após verificação prévia das corridas com o auxílio do programa Tracer 1.5 (RAMBAUT e DRUMMOND, 2009). E para averiguar as frequências e as relações filogenéticas entre os haplótipos mitocondriais, foi construída uma rede de haplótipos baseada no cálculo dos vetores mediano pelo programa Network (BANDELT et al., 1999). Os dados que foram utilizados neste programa foram gerados a partir do programa DnaSP (versão 6.12.03/2018).

Os dados obtidos do mtDNA foram analisados no programa Arlequin (versão 3.5.2.2/ 2015) para calcular a diversidade haplotípica (H_d), diversidade nucleotídica (π), D de Tajima (Tajima 1989) e F_s de Fu e Li (Fu 1997) (EXCOFFIER e LISCHER, 2010) e o índice de fixação F_{st} entre as populações.

Foram também obtidos os genótipos de 10 locis diferentes de microssatélites (808, 197, 988, 765, 2000, 2505, 2474, 2609, 3155 e 3686)(ALMEIDA PEREIRA, 2017) para 70 indivíduos das diferentes populações. As reações de PCR foram feitas em volumes de 10 μ l contendo 0,5 μ l de DNA, 6,5 μ l de tampão (master mix- PROMEGA[®]) e 1,5 μ l de cada primer.

A leitura dos genótipos foi realizada através da marcação FAM-ILS 600, em sequenciador automático, ABI 3500 de oito capilares (Applied Biosystems) no Laboratório Genética e Biologia Molecular – GENBIMOL/UEMA. Posteriormente, os eletroferogramas foram avaliados e classificados utilizando o programa GeneMarker versão 3.0.0 (SoftGenetics, LLC). O número de alelos, valores de heterozigosidades observada e esperada

para cada locus, índice de Shannon e o índice de fixação-Fst foram obtidos pelo GenAIEx 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2012). Calculamos o coeficiente de endocruzamento (Fis) pelo programa FSTAT, o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), desequilíbrio de ligação, frequências alélicas e genotípicas utilizando-se o software Genepop versão 4.7.2 disponível na website <http://genepop.curtin.edu.au/>. (RAYMOND e ROUSSET, 1995). Para determinar as possíveis diferenças genéticas entre e dentro das populações estudadas realizou-se teste de variância – AMOVA a partir do programa Arlequin (versão 3.5.2.2/ 2015).

3 RESULTADOS

Análise Fenotípica

Todos os exemplares examinados apresentaram o mesmo padrão de organização das placas/escudos córneos que recobrem o exoesqueleto, entretanto são observadas pequenas variações anatômicas. Os escudos marginais, aqueles localizados na porção caudal, assumem uma posição “deitada” nas amostras da Colômbia, sendo estes animais mais largos caudalmente, enquanto nos animais brasileiros estas estruturas são mais verticalizadas, à exceção dos últimos escudos (9º ao 11º). Na união entre os escudos peitorais e abdominais, e entre os abdominais há mobilidade, formando uma “dobradiça”. Os dois escudos anais juntos formam entalhe em formato de “V” na maioria dos animais, sendo mais destacado nos machos. A linha de conexão entre os escudos peitorais esteve ausente em 48% dos animais da Colômbia e em 50% das amostras da Baixada Maranhense, enquanto nos indivíduos de Belém essa interconexão esteve presente em todos, variando apenas no seu comprimento.

Além das estruturas, plastrão e carapaça, há também aquelas que fazem conexão entre estas duas, conhecida como ponte, formada por dois escudos, o axilar e inguinal, sendo este último mais comprido que o anterior e o único que se conecta aos escudos abdominais.

Em relação à coloração da carapaça, a mesma variou entre os exemplares das populações avaliadas, variando do castanho claro, negra ou verde oliva, sendo mais escuras as áreas de conexões entre os escudos dérmicos. A coloração castanha clara e escura (com tons vermelhos) foi observada em todas as populações, a verde oliva foi observada em exemplares de Anajatuba e da Colômbia, e a preta não foi observada em nenhum exemplar da Colômbia. Em relação ao plastrão, evidenciamos que os indivíduos brasileiros possuem a coloração

amarela (em tons variados), evidenciando ranhuras marrons próximas às áreas de conexão das placas, sendo este mais evidente nos machos. Entretanto, os animais Andinos apresentaram diferentes colorações: amarela, marrom e vermelha. A cabeça dos jurarás tem formato triangular, de coloração cinza (em tons variados) e com ranhuras amarelas, especialmente na região ventral. Em machos a coloração da cabeça e do resto do corpo geralmente é mais escura, em alguns exemplares, quase negra. Ventralmente foi observado de 3 a 4 pares de barbelas mentonianas entre os ramos da mandíbula, que vão reduzindo seu tamanho no sentido craniocaudal.

Outras características em todos os animais avaliados também devem ser destacadas, a projeção da narina e ranfoteca superior bem desenvolvidos, notadamente em machos. Já as patas são espalmadas com membranas interdigitais reduzidas com cinco dedos com unhas pontiagudas tanto nos membros torácicos (anteriores) como nos pélvicos (posteriores). Em ambos os sexos a cauda possui a estrutura córnea na extremidade (“ferrão”), que denominou a espécie (“scorpion”), sendo que em machos ela é longa, preênsil com esta estrutura córnea proeminente.

Análise Morfométrica

A investigação da morfometria das diferentes populações de jurará foi realizada separando machos de fêmeas, pois as análises de variância da carapaça e plastrão revelaram diferenças estatísticas quanto a forma relacionada ao sexo.

Machos-os indivíduos das cinco populações submetidos à ANOVA indicaram diferenças estatísticas em relação ao tamanho do centroide ($F_{10,52} = 4$; $p < 0.0001$; $F_{5,52} = 4$; $p = 0.0008$) e forma ($F_{4,83} = 176$; $p < 0.0001$; $F_{3,88} = 152$; $p < 0.0001$) para carapaça e plastrão, respectivamente.

Na Análise de Variação Canônica-CVA das carapaças das diferentes populações, foram evidenciados quatro eixos canônicos, sendo para os dois primeiros 81,03% da variação na forma entre os animais. O primeiro eixo CV-1 do lado positivo, reuniu os indivíduos que apresentaram encurtamento das placas caudais e estreitamento lateral em relação à média. Este eixo permitiu a separação das populações de quelônios de Belém, Pinheiro e São Bento, daqueles oriundos das Colômbia e Anajatuba. Enquanto o eixo CV-2 separa aqueles que

possuem uma carapaça com largura próxima à média e um pequeno encurtamento caudal. Neste espaço morfométrico estão agrupados todos os animais maranhenses. Estes dois primeiros eixos, separam quatro blocos geográficos distintos, entre as populações: A (Pinheiro e São Bento), B (Anajatuba), C (Belém) e D (Colômbia) (Figura 3A). O eixo CV-3 destaca aqueles que apresentam uma carapaça mais comprida e larga caudalmente, com encurtamento da região cranial, sendo evidenciado nos animais da Colômbia. O último eixo CV-4 possuíam estrutura mais delgada com encurtamento dos escudos caudais e prolongamento dos craniais. As maiores distâncias de Mahalanobis foram verificadas entre a população de Anajatuba e os demais brasileiros, estando este mais perto do bloco D, o qual está seguidamente mais distante de todos os demais. Foi evidenciado as menores distâncias entre o os indivíduos de Pinheiro e São Bento (Tabela 2). Na observação das distâncias de Procrustes entre as populações, os indivíduos se relacionam de forma semelhante (Tabela 3).

Em relação ao plastrão dos jurarás machos, a CVA, os dois primeiros eixos representaram (74,76%) da variação total na morfologia dos grupos. O CV-1 divide os grupos D e C do grupo B, deixando os indivíduos do bloco A em setor intermediário. Neste eixo, a porção positiva mostra formato de plastrão mais curto cranialmente (placa gular e umerais), estreitamento lateral das placas abdominais e alargamento caudal das placas anais em relação à média, notadamente representada pelos animais colombianos. Enquanto o CV-2 representa aqueles que possuem um plastrão mais largo na região cranial e nas placas abdominais, perfil encontrado no bloco C. O terceiro eixo agrupa aqueles indivíduos que são mais estreitos lateralmente, compartilhado por parte dos indivíduos dos grupos A, C e D. O último eixo representa a menor das variações (11,77%) e separa a maioria dos indivíduos de Pinheiro e poucos indivíduos de A, C e D (Figura 3B). As distâncias de Mahalanobis e Procrustes também apresentaram as maiores distâncias entre os quelônios da Colômbia em relação aos demais grupos, seguido pelos de Anajatuba.

Tabela 4. Distância de Mahalanobis entre as populações de *Kinosternon scorpioides* da Análise Canônica. C= carapaça e P= Plastrão, * = macho e ** = fêmea, os valores de $p < 0.0001$ para todos os itens avaliados. São Luís-MA, 2019

POPULAÇÕES								
	Anajatuba		Belém		Colômbia		Pinheiro	
	C	P	C	P	C	P	C	P
Belém	10,75 *	6,82						
	3,44 **	4,20	-	-	-	-	-	-
Colômbia	7,75	8,21	7,54	6,32	-	-	-	-
	4,55	6,07	4,90	5,87				
Pinheiro	10,32	5,82	8,28	4,66	8,81	5,61	-	-
	2,67	2,91	3,17	3,54	5,44	5,26		
São Bento	9,34	5,38	7,97	4,33	7,54	5,29	4,06	3,69
	2,91	2,92	3,32	3,74	5,07	5,28	2,36	2,88

Fêmeas- a análise estatística das populações de jurará apresentou, também, a semelhança dos machos, variações significativas no formato ($F_{4,11} = 176$; $p < 0.0001$; $F_{3,37} = 152$; $p < 0.0001$) e tamanho do centróide ($F_{22} = 4$; $p < 0.0001$; $F_{6,49} = 4$; $p < 0.0001$) para carapaça e plastrão.

As carapaças das fêmeas submetidas Análise de Variáveis Canônica evidenciaram morfologias também variáveis, neste caso os dois primeiros eixos canônicos são responsáveis por 68,12% das diferenças de formato dessa estrutura. O CV-1 separou a maioria dos indivíduos maranhenses (bloco A) dos demais blocos geográficos, em um formato de carapaça mais curta caudalmente, com estreitamente lateral discreto, e porção cranial próximo à media. Neste mesmo eixo, do lado negativo observou-se a maioria dos animais do bloco B, e que são morfologicamente mais largos que todos os demais, estando a região cranial e caudal próxima à media. A observação do segundo eixo destaca principalmente as fêmeas do bloco colombiano, com encurtamento das placas craniais, alargamento da região posterior e estreitamento lateral evidente. Pode-se perceber também, que o bloco C encontra-se intermediário, sendo indivíduos delgados com áreas anterior e posterior medianas.

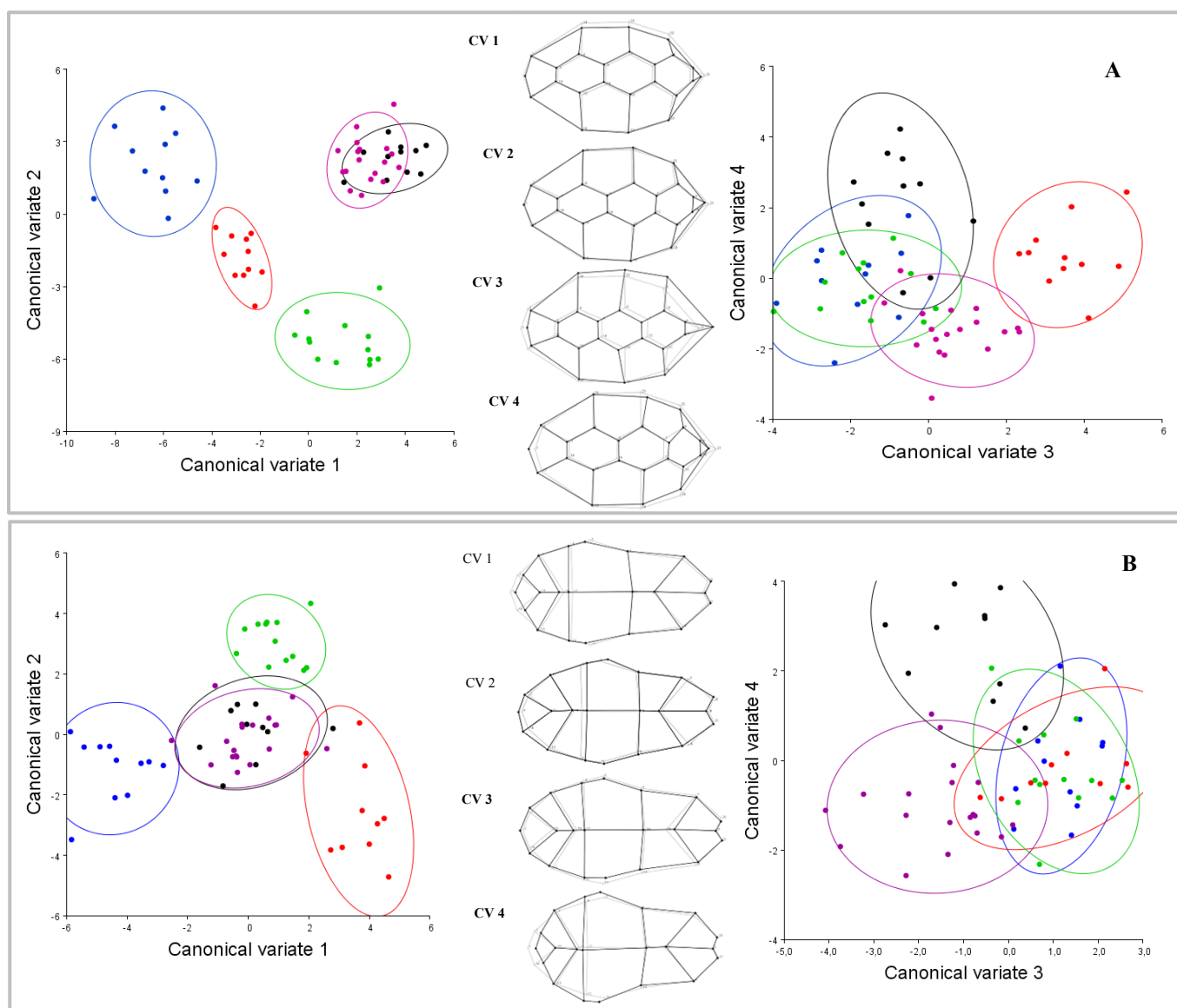


Figura 2. Análise da Variação Canônica da carapaça- A e plastrão-B de machos de *Kinosternon scorpioides*. São Luís -MA, 2019. Legenda: São Bento (roxo); Pinheiro (preta); Anajatuba (azul); Belém (verde) e Colômbia (vermelha).

A morfologia dos eixos CV-3(18,86%) e CV-4 (13,00%) é pouco evidente, não permitindo uma separação nítida entre os blocos, sendo possível apenas destacar a posição da maioria dos indivíduos de Belém, confirmando a característica morfológica indicada anteriormente. As maiores distâncias de Mahalanobis e Procrustes foram entre grupo D e os demais grupos, com $p < 0.0001$, estando os animais de Anajatuba mais perto dos indivíduos do bloco A (Figura 4A).

O plastrão das fêmeas também apresentou distintos formatos, e os dois eixos canônicos principais expressaram 64,65% destas variações anatômicas. No eixo CV-1 separou os indivíduos de Colômbia das demais populações, neste grupo o plastrão é mais largo na região das placas abdominais, com a placa gular alongada caudalmente e as placas

anais mais próxima à média. Por outro lado os indivíduos de Belém, na sua maioria, localizaram-se no lado negativo e os da população colombiana, e foram melhor apresentados sob o ponto de vista morfológico no eixo CV-2, apresentando alargamento cranial da placa gular e prolongamento caudal da placa femoral, tornando as placas anais estreitas cranialmente.

Tabela 5: Distância de Procrustes entre as populações de *Kinosternon scorpioides* da Análise Canônica carapaça e plastrão de machos(*) e fêmeas (**). Os valores de *p* estão entre parênteses. São Luís-MA, 2019

CARAPAÇA				
	Anajatuba	Belém	Colômbia	Pinheiro
Belém	0,04 (0,0001)* 0,03 (0,0070)**	-	-	-
Colômbia	0,04 (0,0038) 0,05 (0,0001)	0,06 (0,0001) 0,064 (0,0001)	-	-
Pinheiro	0,05 (0,0004) 0,02 (0,0342)	0,03 (0,030) 0,03 (0,0198)	0,07(< 0,0001) 0,06 (< 0,0001)	-
São Bento	0,04 (< 0,0001) 0,03 (0,0005)	0,03 (0,011) 0,02 (0,1113)	0,05 (< 0,0001) 0,05 (< 0,0001)	0,04 (0,0037) 0,03 (0,0039)
PLASTRÃO				
	Anajatuba	Belém	Colômbia	Pinheiro
Belém	0,025 (0,0007) 0,0282 (0,0001)	-	-	-
Colômbia	0,046 (< 0,0001) 0,0288 (0,0002)	0,045 (< 0,0001) 0,033 (0,0015)	-	-
Pinheiro	0,036 (< 0,0001) 0,018(0,0005)	0,031 (0,0005) 0,027(0,0004)	0,028 (0,0316) 0,022 (0,0604)	-
São Bento	0,020 (0,0119) 0,016 (0,0002)	0,020 (0,0070) 0,021 (0,0034)	0,037 (< 0,0001) 0,026 (0,0026)	0,023 (0,0094) 0,020 (0,0001)

Os juraras das populações de São Bento e Pinheiro apresentaram perfil intermediário na análise dos eixos. Mas quando avaliamos o terceiro eixo destacamos os indivíduos de Belém e São Bento das demais populações, com plastrão mais estreito lateralmente, com prolongamento das placas gular e anais; enquanto o CV-4 separou a maioria dos quelônios do bloco A dos outros blocos, os quais em sua maioria apresentaram perfil anatômico mais largo lateralmente, com porção caudal mais estreita e anterior mais larga (Figura 4B). Essas separações de blocos geográficos podem ser confirmadas pelos valores das distâncias de Mahalanobis e Procrustes, estes indicam novamente a proximidade morfológica entre os animais de Pinheiro e São Bento, e a maior distância do bloco D com todos os demais blocos, em especial do bloco B (Tabela 2 e 3).

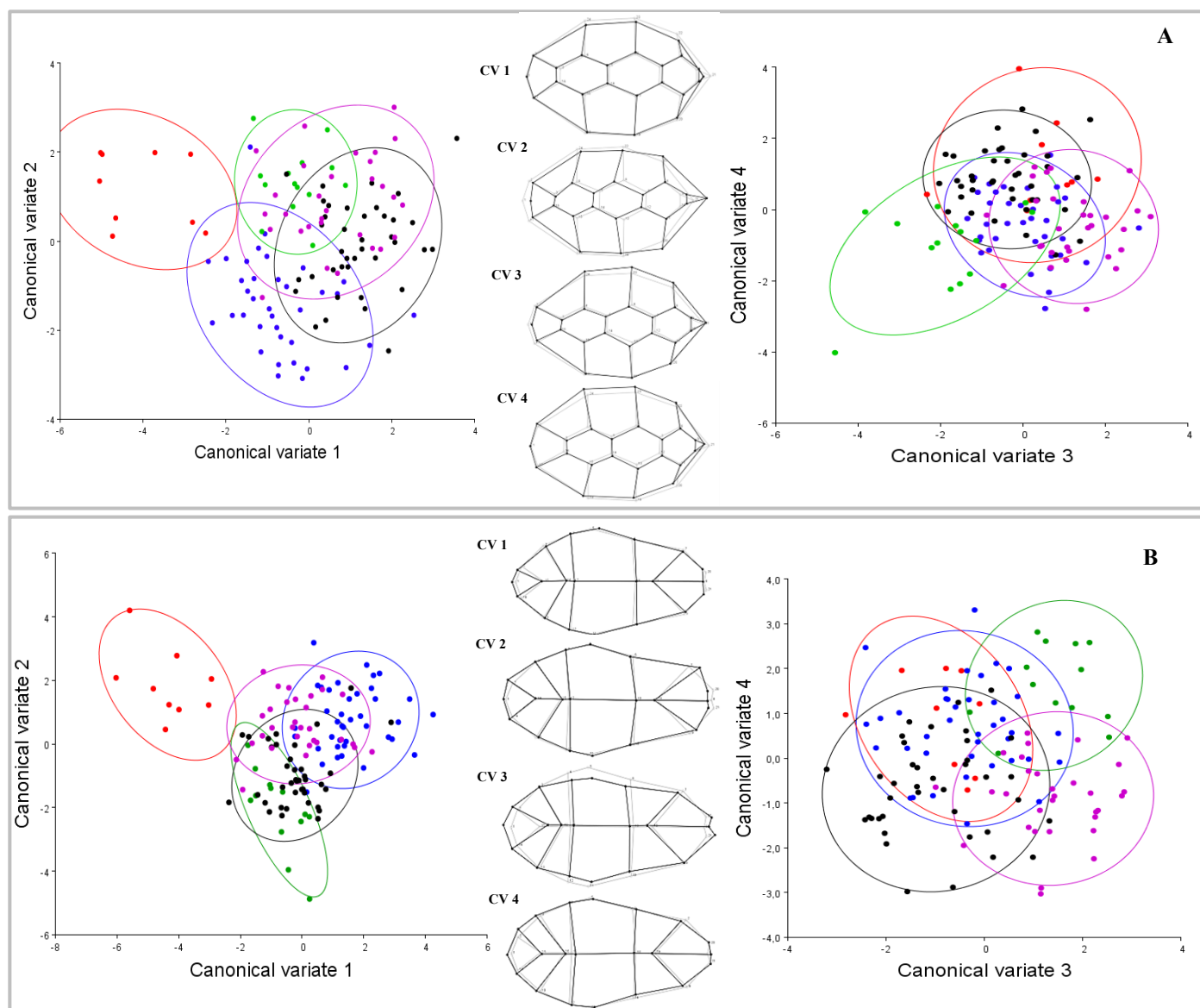


Figura 3. Análise da Variação Canônica da carapaça- A e plastrão-B de fêmeas de *Kinosternon scorpioides*. São Luís -MA, 2019. Legenda: São Bento (roxo); Pinheiro (preta); Anajatuba (azul); Belém (verde) e Colômbia (vermelha).

Avaliação Genética

- *Marcador mitocondrial: Citocromo C oxidase subunidade I- COI*

Foram amplificadas 39 sequências para o gene mitocondrial Citocromo C oxidase subunidade I- COI com mais de 641 pares de bases (203 aminoácidos). As sequências amostradas foram alinhadas com 16 espécies diferentes do gênero *Kinosternon*, 2 espécies do gênero *Sternotherus* e um *outgroup* formado pela tartaruga de água doce *Terrapene carolina*, partir do Genbank (ver anexo), apresentando-se uniformes e longas.

Observamos 26 sítios variáveis de um total de 641pb. Em que ocorrem maior quantidade de transições (98,87%) do que transversões, sendo a maioria representada por C > T (40,59%)(Tabela6).

Tabela 6. Estimativa padrão máxima de probabilidade de substituição de nucleotídeos. E frequência de nucleotídeos estimados no MEGA 6. São Luís-MA, 2019.

Estimativa máxima de probabilidade padrão de substituição de nucleotídeos				
	A	T	C	G
A	-	0,17	0,14	9,21
T	0,16	-	32,0	0,09
C	0,16	40,59	-	0,09
G	17,07*	0,17	0,14	-
Nucleotídeos		Frequência (%)		
A		29,10		
T/U		30,87		
C		24,34		
G		15,69		

*Transições em negrito e transversões em itálico.

Com relação à variabilidade genética encontrada para as populações de jurarás, os níveis de diversidade haplotípica e nucleotídica foram: $H_d = 0,8564$ e $\pi = 0,01358$. Os testes de neutralidade Fu and Li's D* test statistic: 0,96532 e Fu and Li's F* test statistic: 0,77020 ($P > 0.10$) e o teste Tajima's D: 0,0048 ($p > 0.10$), ambos sem significância.

A organização dos diferentes haplótipos e sequências externas (apêndice) na árvore de Neighbor-Joining (Figura 5) recuperou com confiança a monofilia de *Sternotherus*, indicando, porém, as espécies desse gênero em posição interna ao clado formado por *Kinosternon*. Essa inferência, no entanto, não encontrou bom apoio, assim como as relações entre a maioria das espécies de *Kinosternon*.

A espécie *K. integrum* é aquela com maior proximidade genética em relação aos *Kinosternon scorpioides* (Índice de Distância Média entre os grupos de 4%). As maiores distâncias foram em relação às espécies *K. acutum* e *K. creaseri* (ambas com 20% de índice de distância). As amostras de *K. scorpioides* obtidas no Genbank, oriundas do Panamá e Honduras, formaram um grupo monofilético junto às brasileiras e colombianas.

As amostras da Colômbia formam um ramo independente, separado de todos os indivíduos brasileiros, com bootstrap de aproximadamente 90% e distância média de 3%. Os animais brasileiros formaram clados correspondentes às suas regiões geográficas. As distâncias interespecíficas médias variaram de 4 a 13% e os percentuais de distâncias intraespecíficas foram baixos, inferiores a 1%. O índice de fixação-Fst entre as populações avaliadas apoia essa apresentação gráfica, sendo próximo a 1 entre os indivíduos brasileiros e colombianos (Tabela 7).

Verificamos que as amostras brasileiras e colombianas formaram 14 haplótipos diferentes pelo programa Dnasp, entretanto foram reorganizados pelo Network e uma rede foi apresentada com 09 haplótipos efetivos (Figura 6). A rede de haplótipos apresenta padrão concordante com a árvore de Neighbor-Joining (Figura 5). Os indivíduos andinos apresentam um único haplótipo (H7), exclusivo dessa população. A Região da Baixada Maranhense, possui três diferentes haplótipos (H1, H5 e H6), sendo que os indivíduos de Anajatuba possuem a maior diversidade haplotípica e compartilham haplótipos com o Pará. Essa população paraense, por sua vez, compartilhou haplótipos com a região do Tocantins e Amazonas. O Mato Grosso e Ilha de Curupu apresentam-se com haplótipos exclusivos e possuem origem comum com o Pará e Colômbia, diferente dos indivíduos da Baixada Maranhense.

A árvore filogenética pelo método baesiano mostrou a mesma relação entre os indivíduos estudados e o *K. scorpioides* oriundo do genbank, e mantém a proximidade com *K. integrum*. Entretanto, as espécies *K. alamosae*, *K. flavesnces* e *K. subrubrum* apresentam-se independentes.

Tabela 7. Índice de fixação-Fst entre as diferentes populações de *Kinosternon scorpioides* utilizando as sequências geradas para gene COI/mtDNA.

População	1*	2	3	4	5	6	7
1	0.00000						
2	0.88574	0.00000					
3	0.33472	0.11506	0.00000				
4	0.70306	0.33333	0.00420	0.00000			
5	0.91667	1.00000	0.11538	-0.14286	0.00000		
6	0.87500	0.00000	-0.17949	-0.33333	1.00000	0.00000	
7	0.98025	1.00000	0.74348	0.84064	1.00000	1.00000	0.00000

1:Baixada_Ma, 2:Ilha_De_Curupu_Ma, 3:Para, 4:Amazonas, 5:Mato_Grosso, 6:Tocantins, 7:Colombia.
Distance method: Pairwise difference/ Arlequin Program

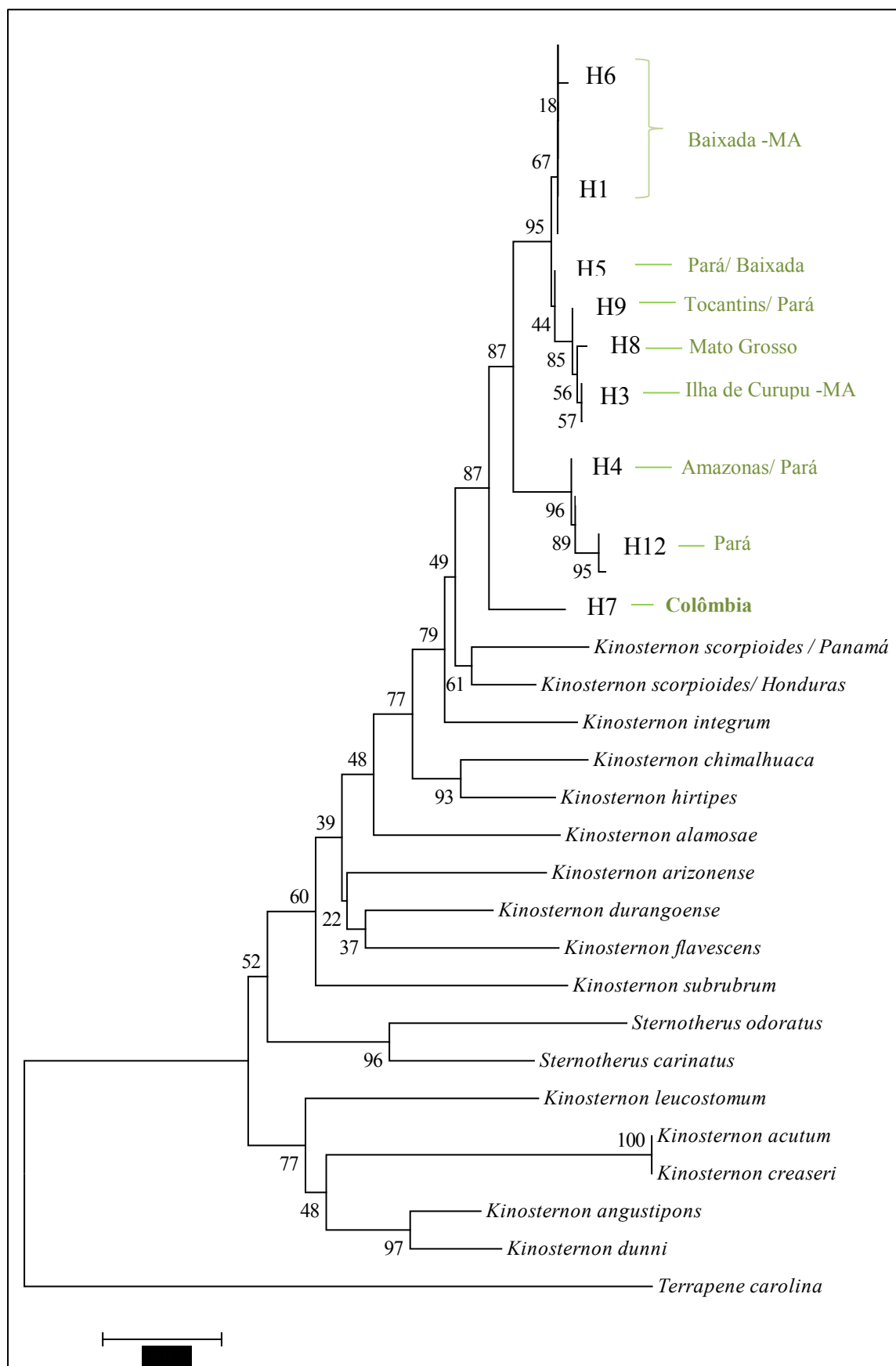


Figura 4. Árvore utilizando as sequências geradas de *K. scorpioides* e obtidas no Genbank para o gene mtDNA/COI e Programa: MEGA 6.0, agrupamento vizinhos (Neighbor-Joining) e pelo método Kimura 2- parâmetros com intervalo de 95% e 1.000 replicações de bootstrap.

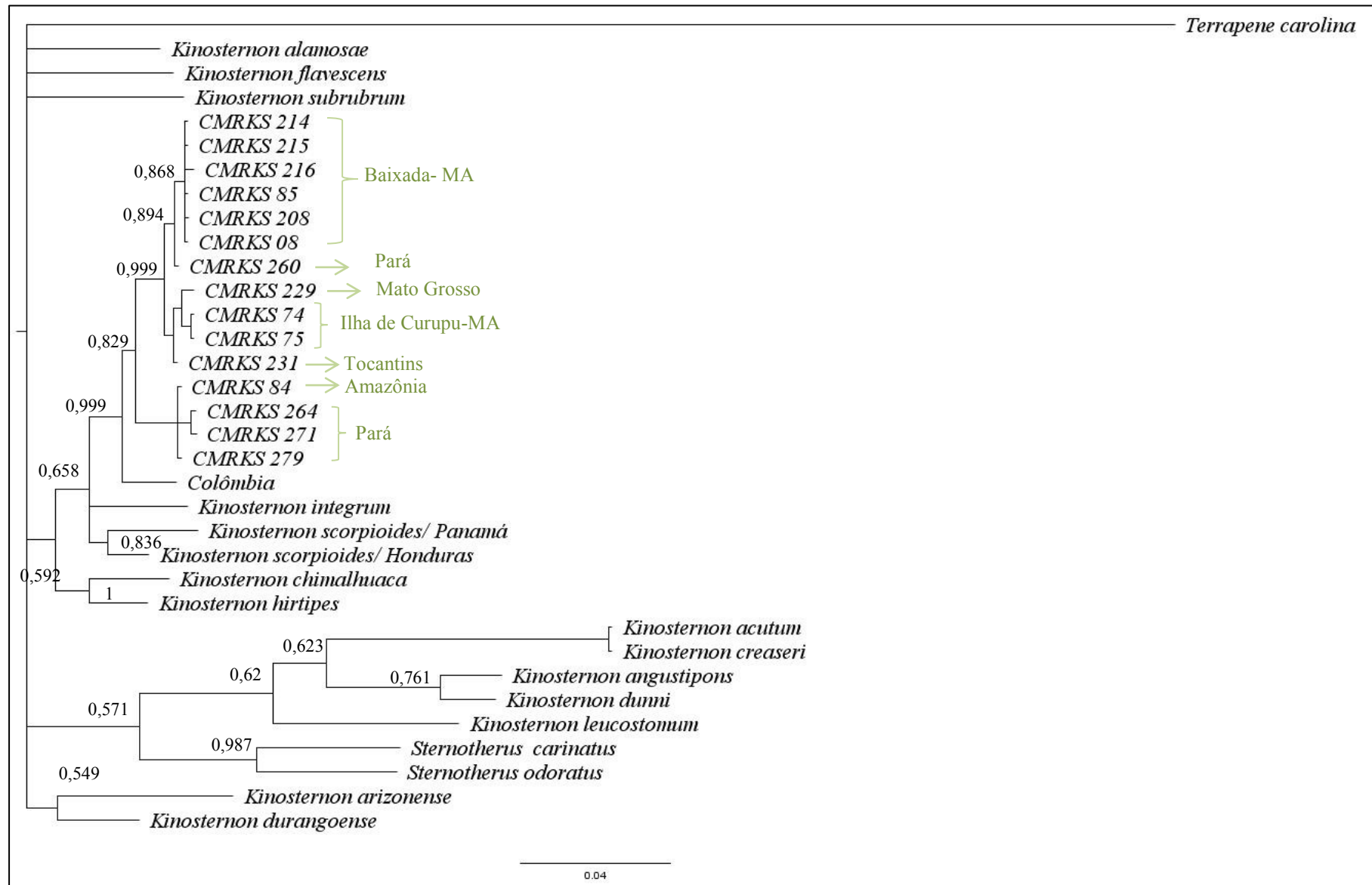


Figura 6. Árvore utilizando as sequências geradas de *K. scorpioides* e obtidas no Genbank para o gene mtDNA/COI a partir da Análise Bayesiana.

• *Marcador nuclear: microsatélites*

A análise das 70 amostras que foram genotipadas para os dez locis revelou a presença de polimorfismo em todas as populações. O número de alelos por locus variou entre 20 a 38. A maioria dos índices de heterozigosidade observados e esperados para cada locus apresentaram valores próximos entre si e próximo a 1.0. O valor mais baixo de heterozigosidade observado foi obtido para o locus Kinsco 3155 (0,561) e o mais alto para o locus Kinsco 197 (0,911) (Tabela 8).

Tabela 8. Número de alelos, heterozigosidade observada e esperada nas amostras analisadas de *Kinosternon scorpioides*.

Locus	A	Ho	He
197	29	0,911	0,847
765	25	0,832	0,835
808	26	0,883	0,845
988	28	0,780	0,840
2000	30	0,853	0,821
2474	38	0,835	0,856
2505	28	0,901	0,840
2609	30	0,804	0,857
3155	28	0,561	0,827
3686	33	0,739	0,860

Em que: A= número de alelos por locus; Ho= Heterozigosidade observada; He= Heterozigosidade esperada.

O número de alelos por população variou de 45 alelos a 163 alelos com um total de 295 alelos descritos nos 10 loci de microsatélites analisados das 3 populações. Foi obtido um número médio de alelos por locos de 10,96, e o maior número médio de alelos foi observado na população do Pará-Pop1 (Figura 8, tabela 9). O número médio de alelos por locus ($\hat{A}$) e número efetivo de alelos por locus ($\hat{A}_e$) variou de 4,5 a 16,30; 4,17 a 12,07, para Colômbia e Pará, respectivamente.

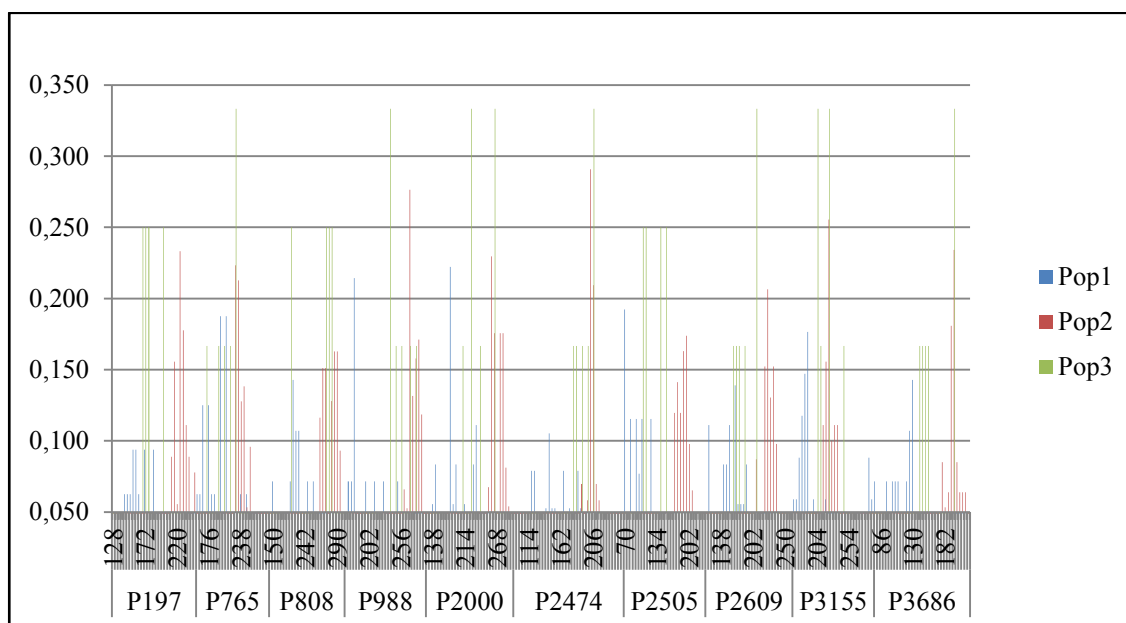


Figura 7. Frequência de alelos por locus nas populações analisadas. Legenda: Pop1= Pará, Pop 2= Baixada Maranhense e Pop3= Colômbia.

Tabela 9. Descrição da diversidade genética e índice de Shannon para três populações de *Kinosternon scorpioides*

População	N	K	$\hat{A}$	$\hat{A}_e$	I	H_o	H_e
Pará	19	163	16,30	12,075	2,614	0,888	0,913
Baixada-MA	48	121	12,10	7,071	2,134	0,775	0,857
Colômbia	3	45	4,500	4,170	1,462	0,767	0,758

Em que: n = tamanho amostral; k = número total de alelos nos locos; $\hat{A}$ =número médio de alelos por locus; $\hat{A}_e$ =número efetivo de alelos por locus; H_o = Heterozigosidade observada; H_e = Heterozigosidade esperada; I = Índice de Shannon.

Em relação à avaliação da diversidade genética, a heterozigosidade observada (H_o) e índice de Shannon foram maiores na população do Pará e menores para os indivíduos da Colômbia (Tabela 9). Os valores da H_o para as populações brasileiras esteve abaixo dos valores da H_e , enquanto na população da Colômbia estes índices foram próximos. O índice de Shannon apresentou-se com valores altos em todas as populações. E o índice de diversidade genética por locus é apresentado na tabela 10, apresentando valores altos de diversidade para as populações estudadas.

Tabela 10. Diversidade genética por locus entre as populações de *Kinosternon scorpioides*

Locus	Populações		
	POP1	POP2	POP3
197	0,967	0,863	1,000
765	0,929	0,863	1,000
808	0,959	0,874	1,000
988	0,948	0,842	1,000
2000	0,925	0,851	0,917
2474	0,966	0,858	1,000
2505	0,936	0,886	1,000
2609	0,949	0,881	1,000
3155	0,932	0,876	0,917
3686	0,967	0,887	1,000

Legenda: Pop1= Pará, Pop 2= Baixada Maranhense e Pop3= Colômbia;

Em relação à distribuição da diversidade genética entre as populações por meio do índice de diferenciação genética (F_{st}), observou-se uma média de 0,095 de diferenciação entre as populações estudadas. Na avaliação para cada locu, a maior diferenciação foi registrada no locus 2000, com um $F_{st} = 0,115$ e o locus que apresentou menor diferenciação foi o 3686 ($F_{st} = 0,078$) (Tabela 11). O coeficiente médio de endogamia (F_{is}) foi baixo para todas as populações, sendo negativo para alguns locus.

Tabela 11 . Estatística F calculada para cada locus individualmente e para todos os loci em conjunto

Locus	Fis	Fit	Fst	Nm
P197	-0,076	0,032	0,101	2,237
P765	0,004	0,101	0,098	2,303
P808	-0,045	0,048	0,089	2,551
P988	0,071	0,162	0,098	2,311
P2000	-0,039	0,080	0,115	1,933
P2474	0,025	0,101	0,078	2,939
P2505	-0,073	0,039	0,104	2,145
P2609	0,061	0,141	0,085	2,686
P3155	0,321	0,390	0,101	2,217
P3686	0,140	0,208	0,079	2,929
Media	0,039	0,130	0,095	2,425

Legenda: Coeficiente de endogamia (FIS), Índice de Fixação Global (FIT), Índice de Fixação (FST), Fluxo Gênico estimado (Nm) como $Nm=0,25(1 - FST)/FST$

Tabela 12. Estatística F (F_{is}) calculada para cada locus nas populações de *Kinosternon scorpioides*

Locus	Pop1	Pop2	Pop3	Total (para todas as amostras)
P197	-0,0345	0,1506	0,0000	0,0944
P765	-0,769	0,0383	0,3333	0,0389
P808	0,0315	0,1752	0,0000	0,1322
P988	0,0957	0,0308	0,3333	0,0675
P2000	-0,0813	-0,0481	0,2727	-0,0416
P2474	-0,0348	0,0239	0,3333	0,0213
P2505	0,1781	-0,0545	0,0000	-0,0000
P2609	0,1222	-0,0359	0,3333	0,0269
P3155	0,2426	0,6448	0,2727	0,5173
P3686	0,1875	0,1362	0,3333	0,1583
TODOS	0,063	0,107	0,220	

Legenda: Pop1= Pará, Pop 2= Baixada Maranhense e Pop3= Colômbia;

Os resultados da estatística realizada para todos os pares das populações (Tabela 13) revelaram índices altos de F_{st} e R_{st} na comparação entre Pará e Baixada Maranhense, e de R_{st} na comparação entre Colômbia e Baixada Maranhense.

Tabela 13. Estatística F, entre pares de populações de *Kinosternon scorpioides*, São Luís, 2019

POPULAÇÃO	R_{ST}/F_{ST}		
	POP1	POP2	POP3
POP1	-	-	-
	-	-	-
POP2	0,8713	-	-
	0,0903	-	-
POP3	0,4553	0,7331	-
	0,0369	0,0409	-

Legenda: Pop1= Pará, Pop 2= Baixada Maranhense e Pop3= Colômbia; Índice de Fixação (F_{ST}) e Coeficiente R_{st} . Programa Genepop version 4.2

E a AMOVA revelou que na análise com três populações de *K. scorpioides*, a maior porcentagem de variação, 91,60%, foi encontrada dentro das populações. A diversidade genética entre elas correspondeu a apenas 8,3% da variância total observada (Tabela 14).

Tabela 14: AMOVA realizada para as de populações de *Kinosternon scorpioides*, São Luís, 2019

Fonte de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	% da Variância Total	Valor de P
Entre populações	8,3993	30,426	0,4075	8,3993	<0,001
Dentro das populações	91,6006	533,640	4,4446	91,6006	<0,001
Totais	100	564,066	4,8521	100	
Fst =	0,0839	P < 0,001			

4 DISCUSSÃO

A avaliação morfológica das populações de *Kinosternon scorpioides* revelou que apesar das pequenas variações no formato e coloração da carapaça e plastrão, evidenciadas principalmente entre os indivíduos brasileiros e colombianos, todos pertencem à mesma espécie, conforme a chave de identificação de Rueda-Almonacid et al., 2007.

Os indivíduos brasileiros possuem carapaça com maior variação de cor do que aqueles indivíduos colombianos. E em relação ao plastrão essa diversidade de cor é maior na população da Colômbia, enquanto kinosternídeos do Brasil apresentam essa estrutura somente na cor amarela. Sendo assim, nosso estudo confirma os relatos anteriores (RUEDA-ALMONACID et al., 2007; VOGT, 2008; BERRY e IVERSON, 2011), que descrevem a coloração da carapaça como sendo altamente variável dentro e entre as populações, e o plastrão geralmente mais claro que a carapaça, variando de amarelo a marrom. Como as amostras são de regiões ecologicamente parecidas, locais de vegetação baixa, alagadas, próximas à linha do Equador, de baixa altitude e com temperatura média alta durante todo o ano, acreditamos que as variações na coloração não estão relacionadas às condições ambientais.

A linha de conexão entre os escudos peitorais nessa família de quelônios é considerada um item de diferenciação entre os gêneros *Kinosternon* e *Sternotherus*. Em nossas avaliações metade das populações possuem essa interconexão, porém reduzida, diferente do observado em *Sternotherus* em que estar presente em todos os indivíduos e é longa, de acordo com Lafleur et al., 1999. Entretanto na chave identificação mais recente de

Rueda-Almonacid et al. (2007) essa interconexão é considerada como ausente em *Kinosternon scorpioides*, discordando do observado em nossos indivíduos. Além disso, a presença do entalhe em formato de “V” na porção caudal do plastrão, principalmente em machos confirma a informação de Berry e Iverson (2011) que relataram que essa morfologia está presente apenas nas populações de América do Sul, sendo reduzido nas fêmeas.

A morfometria geométrica realizada nas populações de jurará revelou diferenças quanto à forma da carapaça e plastrão, de acordo com a área estudada. Em ambos os sexos, revelou a separação em blocos: A (Pinheiro e São Bento), B (Anajatuba), C (Belém) e D (Colômbia). Sendo percebida uma aproximação entre espécimes brasileiros e consequente separação dos indivíduos andinos, assim como uma diferenciação interna (Brasil), separando populações dentro do Estado do Maranhão e entre Estados (Maranhão e Belém).

Este mesmo cenário apresentado pela morfometria geométrica de separação das amostras por área é compartilhado pelos resultados genéticos. O marcador mitocondrial foi capaz de demonstrar a relação filogenética entre o *Kinosternon scorpioides* brasileiro e colombiano, assim como a relação com outras espécies do gênero *Kinosternon* e da família *Kinosternidae*. Para as nossas amostras evidenciamos percentuais de transições superiores as transversões, semelhante ao observado para outros quelônios (NARO-MACIEL et al., 2010; REID et al., 2011; SPINKS et al., 2014). E a média encontrada de distância interespecífica, divergência entre espécies do mesmo gênero, demonstrou altas taxas evolutivas do mtDNA, estruturadas e antigas, conforme verificado por Reid et al., (2011) para diversos quelônios, incluindo o gênero *Kinosternon*.

A análise sobre todas as amostras da Baixada Maranhense revela uma separação dos demais indivíduos, formando um bloco separado, com distância genética variando de 1 a 2% entre as espécies brasileiras. Para esta região, os municípios que estão próximos geograficamente (Pinheiro e São Bento) (43km distância) não apresentam diferenças morfométricas, mantém o mesmo padrão de coloração e formato, e geneticamente estão próximos entre si, compartilhando o mesmo haplótipo (H1), conforme evidenciado na rede de haplótipos. Essas duas áreas amostradas compartilham a mesma rede fluvial, a Bacia Hidrográfica Litoral Ocidental (NUGEO, 2016), possibilitando uma comunicação entre os campos inundáveis, no momento das cheias dos rios. Além disso, nesta região ocorre comércio e criações ilegais da espécie, pois a mesma é consumida como prato exótico, uma

iguaria local (DELDUQUE, 2000; PEREIRA et al., 2007), e essa proximidade favorece esta situação e permite a “translocação” de indivíduos, levando a fluxo gênico entre as populações. Sites et al., 1999 e Bock et al., (2001), indicaram que a distância geográfica pode influenciar na variabilidade genética em populações de *P. expansa* e *P. unifilis*.

Entretanto, as amostras de Anajatuba apesar de fazerem parte também do bioma da Baixada Maranhense, apresentaram características morfológicas peculiares (única população com carapaça na coloração verde oliva e formato mais oval) e geneticamente organizaram-se em ramo diferente, possuindo a maior variedade haplotípica e um haplótipo exclusivo dessa população. Acreditamos que além da distância geográfica (mais de 200km de distância dos outros municípios da Baixada), uma barreira hidrográfica pode ter influenciado nas pequenas variações observadas, pois pertence a outra bacia hidrográfica, a do rio Mearim, situando-se na margem oposta a este rio. Variações morfológicas na carapaça da *Hydromedusa tectifera* foram também observadas por Clavijo-Baquet et al. (2010), e eles relataram que a diferença anatômica pode ter sido resultado da redução do fluxo genético entre as populações em virtude de estarem em bacias hidrográficas distintas.

O cenário apresentado em relação aos indivíduos do Pará demonstra sinais de variação morfológica em relação à Baixada Maranhense. A morfometria geométrica revelou que os quelônios são mais robustos, com carapaça e plastrão mais largos. E geneticamente, apesar de existir um compartilhamento de haplótipos, o mtDNA apresentou um grupamento distinto e de origem diferente dos maranhenses. E os dados obtidos a partir dos microssatélites revelaram altos índices de F_{st} e R_{st} na comparação entre Pará e Baixada Maranhense, demonstrando também divergência entre os estados. Segundo Wright (1978), o F_{ST} expressa a proporção de variabilidade genética entre populações, e valores de F_{ST} iguais ou inferior a 0,05 indicam pequena estruturação populacional, o que não foi observado em nossos achados. O coeficiente R_{st} respondeu melhor em nossas avaliações, confirmando o seu propósito, utilização específica com dados gerados a partir de marcadores microssatélites (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013).

E em relação ao coeficiente médio de endogamia (F_{is}) e Fit foi registrado baixos valores para todas as populações, sendo negativo para alguns locus. Estes valores indicaram que não está havendo endocruzamento significativo dentro das populações e conforme foi descrito por Keller e Waller (2002), os processos adaptativos das espécies podem sofrer

algum impacto quando ocorre contínua endogamia. Além disso, o número de migrantes (N_m) médio foi inferior a quatro, indicando pouco compartilhamento de alelos entre as populações, e seguindo o proposto por Kimura e Maruyama (1971), pode-se considerar que as localidades são diferenciadas entre si.

O Pará possui a maior diversidade de haplótipos (mtDNA), e alguns são compartilhados por outros estados, Amazonas e Tocantins além do Maranhão. E em relação aos microssatélites, apresentou os maiores quantidades de alelos e maiores índices de diversidade genética (heterozigosidade observada e índice de Shannon), sendo portanto a mais estruturada das populações avaliadas.

Acreditamos que a diversidade encontrada entre o Pará e Baixada-MA seja resultado também da barreira hidrográfica, sendo representada aqui pelo Rio Gurupi que separa os Estados, e por uma drenagem fluvial diferente, a Bacia Hidrográfica Tocantins-Araguaia. Pois considerando que o *K. scorpioides* é um quelônio semiaquático que habita locais de baixa correnteza (BERLANT e STAYTON, 2017) como lagos temporários, campos alagados, bancos de rios e lagoas costeiras (Rueda-Almonacid et al., 2007; Ferrara et al., 2017), os grandes corpos d'água, rios caudalosos e com grande correnteza como o Rio Gurupi pode dificultar ou impedir a dispersão dos indivíduos de um local para outro e consequente fluxo gênico entre populações.

Para demais localidades que formaram juntos o ramo brasileiro, Tocantins, Mato Grosso, Amazonas e Ilha de Curupu-MA não foi possível fazer inferência morfológica dos espécimes, no entanto, a breve análise a partir do marcador mitocondrial demonstrou a relação entre as amostras. Percebeu-se a interligação e a maior proximidade (índice F_{st} baixo) desses dois primeiros Estados com o Pará, uma relação do Tocantins/Pará também com Ilha de Curupu-MA, assim como um compartilhamento de haplótipos do Amazonas com Pará. Essa ligação de todas as amostras brasileiras com o Pará pode ser um indicativo da dispersão da espécie a partir dessa região, sendo assim é necessário que novos esforços sejam feitos para investigar melhor essa relação e compreender a filogeografia da espécie.

As diferenças morfológicas percebidas nos indivíduos andinos quando comparamos com os brasileiros foram marcadas pelo alargamento no sentido caudal dos espécimes, um perfil anatômico peculiar, explicitado pelas maiores distâncias de Mahalanobis e Procrustes

encontrada nas análises de morfometria geométrica. Apesar da chave de identificação considerar todos pertencentes a mesma espécie, as amostras da colômbia possuem um haplótipo exclusivo e único, o marcador mtDNA separando-os em um ramo diferente dos demais *Kinosternon scorpioides* brasileiros (com aproximadamente 90% bootstrap e distância média de 3%), conforme visualizado também pela rede de haplótipos, demonstrando existir uma boa divergência genética entre estas populações.

Segundo a probabilidade padrão determinada por Herbet et al., (2003), o limite para identificação de uma mesma espécie é de no máximo de 2% para vertebrados, enquanto indivíduos de espécie diferentes devem ter uma distância entre eles superior a 2%. E também analisaram a distâncias partir do código de barras, agora dentro do reino Animalia e obtiveram divergências interespecíficas superior a 2% na maioria das relações e normalmente bem baixas dentro de uma mesma espécie animal. Para quelônios, esta avaliação de divergências a partir do COI/ mtDNA foi realizada por Naro-Maciel et al. (2010) em tartarugas marinhas e obtiveram percentuais de distância intraespecífica muito baixas, inferiores as 1%. Reid et al., 2011 também observaram em uma variedade de quelônios (pleurodira e cryptodira) divergências intraespecíficas baixas, em média de 1,3%, entretanto os autores relataram que em 15 das 69 espécies avaliadas ocorreram valores acima dos 2% esperado para o DNA barcode, o que poderia ser um indicativo de espécies com alto grau de estruturação genética, obscuras e possivelmente serem resultado de uma hibridação introgressiva. E para a tartaruga de água doce *Terrapene spp*, Martin et al. (2013) observaram que a maioria dos indivíduos, alguns considerados como subespécies, apresentaram divergências acima de 2%, sugerindo que se tratava de espécies diferentes.

E em relação ao observado para esta população sobre os dados de microssatélites, o coeficiente Rst foi alto em comparação com Baixada-MA, indicando diversidade genética. Entretanto, observou-se menor quantidade de alelos e um índice de endogamia mais alto em relação às demais populações, o que pode estar relacionado a número amostral.

A grande distância geográfica possivelmente é um elemento que levou a modificações/plasticidade fenotípica, já que o distanciamento pode levar a uma restrição na comunicação entre as populações. A área amostrada da Colômbia (Caribe colombiano) encontra-se fora do limite amazônico (ROCA e PÉREZ V., 2006), do outro lado da Cordilheira dos Andes, levando-nos a inferir que mudanças de paisagem

(vegetação/alimentação), assim como o isolamento geográfico podem ter contribuído para as variações encontradas. Os Andes surgiram a 65 milhões de anos e mudou toda a configuração fluvial (inversão da drenagem dos rios, em direção ao Oceano Atlântico e não mais para o Oceano Pacífico) (CARVALHO e ALMEIDA, 2016), tornando-se uma grande barreira geográfica. Apesar da ausência de dados concretos sobre a dispersão dos juraras e sabendo que estes indivíduos são tipicamente amazônicos, a ocorrência na região oeste da montanha, leva-nos a crê numa possível distribuição anterior ao soerguimento da cordilheira, levando a um isolamento desses quelônios e formação de uma subpopulação diferente dos indivíduos amazônicos.

Alguns autores já mencionaram que o isolamento geográfico bem como alterações na paisagem interfere na genética e consequentemente sobre o fenótipo das espécies. Naro-Maciel et al. (2010) verificaram a partir do COI uma separação norte-sul das tartarugas marinhas, apoiando a tese de que as mesmas se aglomeravam na região equatoriais na época glacial e que tenham realizado uma dispersão recente (10.000 – 18.000 anos) quando ocorreu o aumento da temperatura. E Serb et al. (2001), utilizando região controladora do mtDNA, indicaram uma dispersão do *Kinosternon flavescens* e posterior isolamento de populações no meio-oeste a partir das mudanças climáticas durante o Pleistoceno.

Quando realizamos uma análise de proximidade filogenética com as amostras obtidas no Genbank, percebemos os animais do clado Brasil/Colômbia é um grupo irmão do *Kinosternon integrum*. Esta relação de proximidade foi relatada por Iverson (1991), entretanto o mesmo utilizou apenas características morfológicas. Neste mesmo trabalho também foram relacionados ao *K. scorpioides* as espécies, *K. alamosae*, *K. oaxacae*, *K. acutum*, *K. creaseri*, e *K. leucostomum*, todavia nos verificamos que as espécies *k. acutum* e *K. creaseri* formam um clado independente. Iverson et al., 2013, estudaram a família Kinosternidae e descreveram três clados independentes, propondo um novo gênero (*Cryptochelys*) a partir de dados genes nucleares e mitocondrial. Para eles a espécie *Kinosternon scorpioides* formam um ramo específico e também mantém a relação de monofiletismo com espécie *K. integrum*, que de forma semelhante também foi apresentado por Spinks et al., 2014.

A organização das espécies *K. hirtipes* e *K. chimalhuaca* em um ramo separado e mais próximo aos escorpioides do que ramo *K. durangoense* e *arizonense* também foi

observado por Iverson et al. (2013). E que de forma semelhante foi descrito por Spinks et al. (2014), os quais indicaram dois clados principais, um que inclui as espécies *K. arizonense* e *K. duragoense*, *K. bauri*, *K. subrubrum* e *K. flavence*, e um outro com o *K. scorpoides* e espécies próximas (*K. chimalhuaca*, *K. hirtipes*, *K. acuntum* e *K. creaseri*) conforme observado também nesta pesquisa. Sendo assim, percebemos que a filogenia apresentada para o jurara esta de acordo com os trabalhos anteriores, entretanto, os indivíduos brasileiros e colombianos organizam-se em ramos distintos, de origem comum aos *K. scorpoides* do Panamá e Honduras.

5 CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho demonstraram que a espécie *Kinosternon scorpoides* brasileira apresenta estruturação genética profunda em relação os espécimes da América Central, no entanto é clara a diversidade genética dentro das populações brasileira, especialmente entre Pará e Maranhão. Os padrões morfológicos observados, da mesma forma indicam diferenciação geográfica para as populações. Possivelmente barreiras geomorfológicas/hidrográficas tenham levado as diferenciações genéticas dos animais e originaram estas subpopulações destes quelônios.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Maranhão-UEMA/ Mestrado em Ciência Animal; Ao Fundo de Amparo a Pesquisa do Maranhão- Fapema/ Projeto Rebax; Ao IBAMA; A Universidade de Los Andes-Colômbia; e ao Emilio Goeldi e Bosque Rodrigues Alves-PARÁ;

LITERATURA CITADA

ADOLFO M. R. AND G. J. PÉREZ V. Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional: Geografía física y poblamiento en la Costa Caribe colombiana. **Centro de Estudios Económicos Regionales (CEER) del Banco de la República**, Cartagena (73):35-39. 2006.

ALVARES, C. A., J.L. STAPE, P.C. SENTELHAS, J.L. DE M. GONCALVES AND G. SPAROVEK.. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift** 22 (6): 711–728, 2014.

ALMEIDA PEREIRA, L. Marcadores moleculares informativos para *Kinosternon scorpioides*: prospecção tecnológica, desenvolvimento e análise populacional. **Tese** (Doutorado) Programa de Pós-graduação em rede–Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal /Ccb, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017. 123 p.

AZEREDO, A. M. L. **O Código de Barras da Vida baseado no DNA“Barcoding of Life”: Considerações e Perspectivas (2005).** Disponível em: <www.cgee.org.br/atividades/redirect/1749>. Acesso em: 04.10.12

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution.** New York: Chapman and Hall, 511p. 1994.

BERLANT, Z. S. AND T.C. STAYTON. Shell Morphology in the Kinosternidae: Functional and Evolutionary Patterns . **Herpetologica**, 73(1): 30–42. 2017.

BERRY, J.F., J.B. IVERSON. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) – Scorpion mud turtle. Pp.063.1-063.15 In Conservation biology of freshwater turtles and tortoises: A compilation project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group (A.G.J. Rhodin, P.C.H. Pritchard, P.P. Van Dyke, R.A. Saumure, K.A. Buhlmann, J.B. Iverson & R.A. Mittermeier, eds.), volume 5 **Chelonia Research Monographs**. 2011.

BRITES, V. L. C., R. G. FARIA, D. O. MESQUITA AND G. R. COLLI.. The Herpetofauna of the Neotropical Savannas, p. 1–24, in K. Del Claro (ed.). *Encyclopedia of Life Support Systems* (EOLSS). Oxford, UK.. 2009

BANDELT, H.J., P. FORSTER, E A. RÖHL. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. **16**:37-48. 1999.

CABRERA, M.R. AND S.E. COLANTONIO.. Taxonomic Revision of the South American Subspecies of the Turtle *Kinosternon scorpioides*. **Journal of Herpetology** 31(4): 507-513. 1997

CLAUDE, J; PARADIS, E; TONG, H. e AUFRAY, J. C. **Ecological correlates and evolutionary divergence in the skull of turtles: a geometric morphometric assessment.** *Systematic Biology*, v.53, p. 937 -952, 2004. COSTA, H. C.; MOLINA, F. B.; SÃO-PEDRO, V. A.; FEIO, R. N. Reptilia, Testudines, Kinosternidae, *Kinosternon scorpioides scorpioides* (Linnaeus, 1766): Distribution extension. **Check List- Journal of species lists and distribution**. v.6, n. 2, 2010.

CEBALLOS, C. P., D. ZAPATA, C. ALVARADO, AND E. RINCÓN. Morphology, Diet, and Population Structure of the Southern White-lipped Mud Turtle *Kinosternon leucostomum postinguinale* (Testudines: Kinosternidae) in the Nus River Drainage, Colombia. **Journal of Herpetology** 50(3): 374–380. 2016.

DELDUQUE, M. Ficha do bicho: muçua. **Globo Rural**. 176: 1-4. 2000.

ERNST, C. H., R. W. BARBOUR. **Turtles of the world**. Washington: Smithsonian Institution Press, USA. 1989.

FANTIN, C. **Desenvolvimento de marcadores moleculares de microssatélites para o estudo do sistema reprodutivo em três espécies de tartarugas do gênero Podocnemis**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal da Amazônia, Instituto de Ciências Biológicas, Manaus, 98f, 2008.

FACHÍN-TERÁN, A., R. C. VOGT, AND J. B. Thorbjarnarson. 2003. Estrutura populacional, razão sexual e abundância de *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemididae) na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. **Phyllomedusa** 2(1): 43-633.

FERRARA, C., C. K. FAGUNDES; T. MORCATTY; THAIS MORCATTY.. Quelônios Amazônicos: Guia de identificação e distribuição. **Wildlife Conservation Society**- Manaus, Brasil, 2017.

FERREIRA-JÚNIOR, P. D., R. L. TREICHEL; T. L. SCARAMUSSA AND J. T. SCALFONI. 2011. Morphometric pattern in *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) (Cheloniidae) hatchlings from nests with different embryo development rates. *Brazilian Journal Biology* 71(1): 151-156.

FOLMER, O.; BLACK, M. B.; HOCH, W.; LUTZ, R. A.; VRIJEHOEK, R. C. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol. Marine Biol. Biotechnol.**, v. 39, p. 294-299, 1994.

FORNEL, R. 2010. Evolução na forma tamanho do crânio no Gênero Ctenomys (Rodentia: Ctenomyidae). Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.

FORERO-MEDINA, G., O. V. CASTAÑO-MORA AND O. MONTENEGRO. 2007. Abundance, Population Structure, and Conservation of *Kinosternon scorpioides albogulare* on the Caribbean Island of San Andrés, Colombia. **Chelonian Conservation and Biology** 6(2):163-169.

FORSMAN, A. 2014. Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species. **Heredity**, 115 (4): 276–284.

GOSNEL, J. S. L., G.L. RIVERA, AND R.W. BLOB. 2009. A Phylogenetic analysis of sexual size dimorphism in turtles. *Herpetologica* 65(1): 70–81.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. ; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. R. Soc. Lond. B**, 270, 313–321(2003).

IVERSON, J.B.; LEM, INGRAM, C.; Molecular phylogenetics of the mud and musk turtle family Kinosternidae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. p. 929-39, 2013.

KALIONTZOPOULOU, A. Geometric morphometrics in herpetology: modern tools for enhancing the study of morphological variation in amphibians and reptiles. **Basic and Applied Herpetology** (25): 5-32. 2011.

KELLER L.F.; WALLER, D.M. Inbreeding effects in wild populations. **Tren. Ecol. Evol.** 17 (5): 230-241, 2002.

KIMURA M, MARUYAMA T. Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population. **Genet. Res.** 18, 125-131, 1971.

KLINGENBERG, C. P. **MorphoJ software**. Version 1.06c. Faculty of Life Sciences, University of Manchester. Disponível em: <http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_page/.htm>. Acesso em 13.03.2017. 2008.

KIRKPATRICK, D. T. Originally published in The Biology, Husbandry and Health Care of Reptiles. p. 447-463 in The Husbandry of Reptiles, volume 2 (L. Ackerman, ed.). T.F.H Publications. 1997.

LAFLEUR, Y.; CHARETTEY, R.; GALLEGOS, F. A. L. **Identification Guide – Turtles & Tortoises/Guide d'identification CITES – Tortues/Guía de identificación de CITES – Tortugas**. Authority of the Minister of Environment. Minister of Supply and Services Canada. Canadian, 1999.

LANFEAR R., FRANDSEN, P. B., WRIGHT, A. M., SENFELD, T., CALCOTT, B. PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses. **Molecular Biology and Evolution**, 34, 772-773, 2017.

LOVICH, J. E., M.D. ZNARI, M. A. A. BAAMRANE, M. NAIMI, AND A. MOSTALIH.. Biphasic geographic variation in sexual size dimorphism of turtle (*Mauremys leprosa*) populations along an environmental gradient in Morocco. **Chelonian Conservation and Biology** 9(1): 45–53. 2010

MACALE, D., A. VENCHI AND M. SCALICI. 2011. Shell shape and size variation in the Egyptian tortoise *Testudo kleinmanni* (Testudinidae, Testudines). **Folia Zoologica** 60(2):167-175.

MOLINA, F.B. 1992. O Comportamento Reprodutivo de Quelônios. **Biotemas**, 5 (2): 61 – 70.

MYERS, E. M.; JANZEN, F. J.; ADAMS, D. C.; TUCKER, J. K. Quantitative genetics of plastron shape in slider turtles (*Trachemys scripta*). **Evolution**, 60 (3): 563 – 572. 2006.

NARO-MACIEL E; REID B.; FITZSIMMONS N.N.; MINH, M.; DESALLE, R., AMATO, G. DNA barcodes for globally threatened marine turtles: **Molecular Ecology Resources**. v.10, p.252–263, 2010.

OLIVEIRA, A. S., C. G. CANDIOTO, D. M. S. SANTOS, J. G. PEREIRA, A. L. SOUSA AND C. R. MACHAD.. Effects of fasting and refeeding on the metabolic functions of the turtle *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) raised in captivity. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 33(8):1041-1044.2013.

PARÉS-CASANOVA, P.M. 2014. Evaluación morfométrica del cráneo de diversas razas bovinas actuales: análisis geométrico según perfiles. *Rev CES Med Zootec* 9(1):58-67.

PEARSE, D. E.; ARNDT, A. D.; VALENZUELA, N.; MILLER, B. A.; CANTARELLI, V.; SITES, J. W. Estimating population structure under non-equilibrium conditions in a conservation context: continent- wide population genetics of the giant Amazon river turtle *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemidae). *Molecular Ecology*, v.15, p. 985-1006. 2006.

PEREIRA, L.A.; A. L. DE SOUSA; M. V. J. CUTRIM; E. G. MOREIRA.. Características Ecológicas do Habitat de *Kinosternon scorpioides* Linnaus. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, 20 (1): 9-14, 2007.

PALUMBI, S.R; BENZIE, J. Large mithochondrial differences between morphologically similar Penaeid shrimp. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 1, n .1, p. 27-34, 1996.

RESCHKE, G. A., C. M. A. ELOI AND R. M. SILVA. Amazônia Maranhense: Diversidade e Conservação. P. 47- 89 In Caracterização climática da Amazônia maranhense Museu Paraense (M. B. Martins and T. G. de Oliveira, eds) Emílio Goeldi- MPEG, Brazil. 2011.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. (2009). Tracer version 1.5 [computer program].

ROHLF, F.J. TPSDig. **Computer program.Version** 2.16. 2010.

RONQUIST, F., TESLENKO, M., VAN DER MARK, P., AYRES, D. L., DARLING, A., HÖHNA, S., LARGET, B., LIU, L., SUCHARD, M. A. & HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, 61, 539–542, 2012.

SPINKS, P.Q.; SHAFFER, H.B.; IVERSON, J. B.; MCCORD, W.P. Phylogenetic hypotheses for the turtle family Geoemydidae. **Molecular Phylogenetics and Evolution** (32):164–182. 2014.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, K.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis using. Maximum Likelihood, Evolutionary distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; SEGATTO, A. L. A.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; FREITAS, L. B. Guia prático para estudos filogeográficos. Editora SBG:Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP, 2013. 105p.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO. CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS. NÚCLEO GEOAMBIENTAL-NUGEO. **Bacias hidrográficas e climatologia no Maranhão / Universidade Estadual do Maranhão**. - São Luís, 2016. 165 p

VALENZUELA, N., D. C. ADAMS, R. M. BOWDEN, A. C. GAUGER, AND M. E. DOUGLAS. Geometric Morphometric Sex Estimation for Hatchling Turtles: A Powerful Alternative for Detecting Subtle Sexual Shape Dimorphisms. **Copeia** (4):735- 742. 2004

VAN DIJK, P. P. V., J. B. IVERSON, A. G. J. RHODIN, H. B. SHAFFER; R. BOUR. **Turtles of the World, in Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution with Maps, and Conservation Status**. Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises, Chelonian Research. p.329-479, 2014.

VALENZUELA, N. Multiple paternity in side-neck turtles *Podocnemis expansa*: evidence from microsatellite DNA data. **Molecular ecology**. v. 09. n. 01. p. 99-105, 2000.

VOGT, R. C. 2008. Tartarugas da Amazônia. Pp. 80-83. **Biblos**, Peru.

WRIGHT, S. Variability within and among populations. **Evolution and the genetics of populations**. v.4. The University of Chicago Press, Chicago. 1978.

YE, R.; ZHENG, R.; WANG, L.; DU, W. Polymorphic microsatellite loci in the Chinese pond turtle (*Chinemys reevesii*). **Conservation genetics**, v. 10 p. 1045–1048, 2009.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Os espécimes amostrados pertencem à espécie *Kinosternon scorpioides*, e considerando as características fenotípicas e a região geográfica de estudo, acreditamos que se trata da subespécie *K. s. scorpioides*;
2. A utilização da ferramenta morfometria geométrica foi um meio eficaz para avaliação morfológica das estruturas externas dos quelônios, permitindo inferências sobre o formato intra e interpopulações. O seu emprego no estudo da espécie *K. scorpioides* é inovador, sendo de baixo custo, de fácil execução e poderá ser um outro veículo rotineiro para aquisição de dados morfológicos;
3. Os resultados da morfometria geométrica indicaram que o dimorfismo sexual está presente na espécie, conforme já mencionado anteriormente pela literatura, utilizando apenas avaliações da morfometria tradicional (dados biométricos lineares). As variações de formato existem entre populações de diferentes regiões geográficas, aquelas que próximas entre si, tendem a compartilhar o mesmo padrão morfológico. E para nossa espécie, em virtude do abaulamento do casco, a região ventral (plastrão) revelou ser a região indicada para avaliações morfométricas;
4. O marcador molecular mtDNA/ COI foi eficiente na avaliações genéticas para espécie, permitindo verificar as relações filogenéticas com as demais espécie da família. As sequências obtidas para as populações brasileiras não existiam, sendo, portanto dados inéditos e que serão depositados no Brazilian Barcode of Life para contribuir a preservação da espécie e auxiliar em novas pesquisas;
5. O desenvolvimento dos primers específicos para espécie foi um marco para comunidade científica, permitindo uma melhor avaliação da genética de populações. E os resultados gerados pelos microssatélites revelaram uma razoável diversidade genética entre as populações brasileira e, entre o Brasil e Colômbia;

6. Apoiado pelos resultados morfológicos e genéticos acreditamos que os animais brasileiros são populações diferenciadas dos indivíduos da Colômbia, e dos espécimes de *K. scorpoides* (Panamá e Honduras) depositados no Genbank;

7. É possível que a ampla distribuição geográfica da espécie, barreiras geológicas ou hidrográficas sejam os principais responsáveis pela diversidade genética entre as subpopulações. Desta forma, sugerimos que novos estudos sejam realizados, com ampliação da área amostral, a fim de refinar o conhecimento e consequentemente obter informações valiosas a serem utilizadas em programas de conservação do jurará.



APÊNDICE

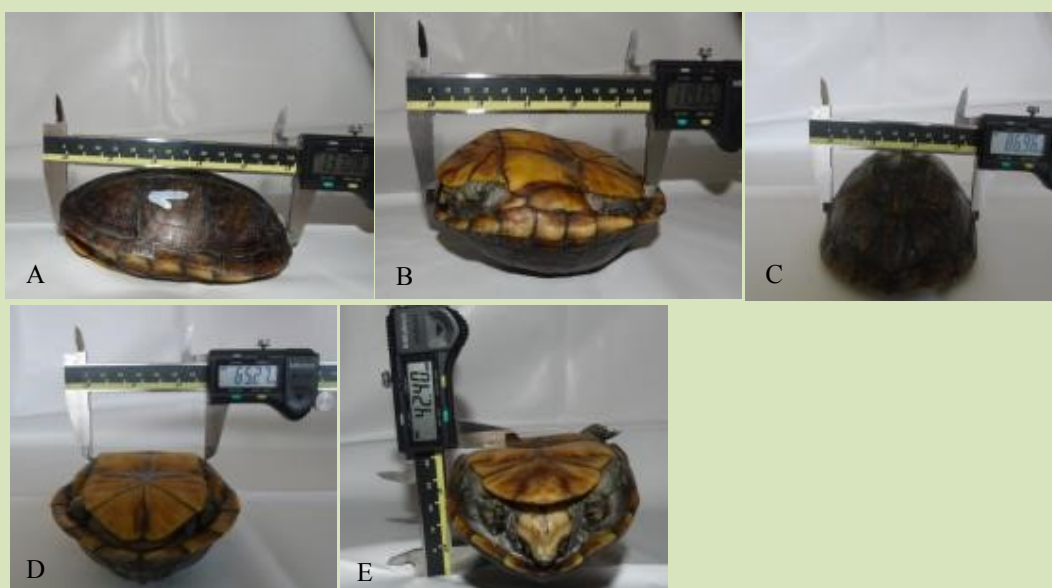


Figura 1. Biometria dos *Kinosternon scorpioides*. A- comprimento de carapaça; B- comprimento de plastrão; C- largura de carapaça; D- largura de plastrão; E- altura.



Figura 2. Dimorfismo sexual de *Kinosternon scorpioides*. Em A- fêmea e B- macho.

Tabela 01: Dados biométricos das amostras de *Kinosternon scorpioides*.

Nº	SEXO	CC* (cm)	LC (cm)	CP (cm)	LP (cm)	ALTURA (cm)	PESO (g)	LOCALIDADE
1	F	12,99	8,78	12,19	6,71	5,01	380	Anajatuba
3	F	13,42	8,84	12,49	6,72	5,13	320	Anajatuba
4	F	12,92	8,40	11,94	6,30	4,75	300	Anajatuba
5	F	13,39	8,71	12,06	7,38	4,57	300	Anajatuba
6	F	11,82	8,02	11,01	5,94	4,22	220	Anajatuba
7	F	12,73	8,76	12,01	6,24	4,95	320	Anajatuba
9	F	11,51	7,59	10,51	7,50	4,21	200	Anajatuba
10	F	12,72	8,40	11,46	6,24	4,85	240	Anajatuba
11	F	12,35	8,21	11,40	6,54	4,25	240	Anajatuba
13	F	12,59	8,37	11,92	6,24	4,84	250	Anajatuba
14	F	12,84	8,71	11,96	5,92	4,22	250	Anajatuba
16	F	13,29	8,80	12,39	7,61	4,52	280	Anajatuba
17	F	12,34	7,39	12,02	6,54	4,75	240	Anajatuba
18	F	13,10	8,69	6,52	11,90	4,35	282	Anajatuba
19	F	13,39	8,87	6,00	12,19	4,91	289	Anajatuba
20	F	13,39	8,77	6,83	12,62	4,71	300	Anajatuba
21	F	13,39	8,64	6,65	11,32	4,36	253	Anajatuba
22	F	12,52	8,76	6,55	12,17	4,88	302	Anajatuba
23	F	13,61	9,05	6,16	12,27	3,08	305	Anajatuba
24	F	13,44	8,44	6,04	11,77	4,67	270	Anajatuba
25	F	12,98	8,97	6,01	12,08	4,77	320	Anajatuba
26	F	13,70	7,73	5,30	10,17	4,24	203	Anajatuba
27	F	10,90	8,56	6,56	11,46	4,52	264	Anajatuba
28	F	13,55	9,09	10,16	7,16	4,96	370	Anajatuba
29	F	13,24	8,55	12,27	6,60	5,08	280	Anajatuba
30	F	15,10	10,25	13,94	7,60	6,16	450	Anajatuba
31	F	12,62	8,83	11,34	6,79	4,76	250	Anajatuba
32	F	13,54	8,69	12,36	6,40	4,45	320	Anajatuba
33	F	12,89	8,97	11,64	6,48	4,02	250	Anajatuba
35	F	13,66	9,01	12,97	7,14	4,84	360	Anajatuba
38	F	13,40	8,71	12,32	8,65	4,65	320	Anajatuba
40	F	13,22	9,12	11,92	6,86	4,21	320	Anajatuba
41	F	13,08	8,98	12,68	8,99	4,68	400	Anajatuba
43	F	13,24	8,92	12,12	7,54	4,17	340	Anajatuba
44	F	13,11	8,87	12,14	7,81	4,55	320	Anajatuba
46	F	13,03	8,05	12,15	6,94	4,56	320	Anajatuba
47	F	14,31	9,35	13,05	6,46	5,28	420	Anajatuba
48	F	14,59	9,49	13,64	8,85	5,25	410	Anajatuba
50	F	14,24	9,50	13,03	6,62	5,56	400	Anajatuba
51	F	14,24	9,11	13,04	7,14	5,21	350	Pinheiro
52	F	13,45	9,13	12,14	6,68	4,86	320	Pinheiro
54	F	13,70	9,32	13,14	9,19	5,28	300	Pinheiro

55	F	12,98	8,79	11,80	6,71	4,79	320	Pinheiro
56	F	12,98	9,02	11,35	6,76	4,93	300	Pinheiro
57	F	13,06	8,04	11,26	6,07	4,14	240	Pinheiro
59	F	12,98	8,80	11,45	6,76	4,98	300	Pinheiro
60	F	13,55	8,87	12,94	6,78	5,87	380	Pinheiro
61	F	11,47	8,17	11,14	6,99	4,58	200	Pinheiro
62	F	13,47	8,71	11,87	6,54	4,71	260	Pinheiro
64	F	15,34	9,34	12,67	8,58	5,19	360	Pinheiro
65	F	13,05	10,23	13,92	7,29	6,09	510	Pinheiro
66	F	11,92	8,52	11,91	6,10	4,88	320	Pinheiro
67	F	13,57	9,35	11,08	6,62	4,70	210	Pinheiro
68	F	13,30	9,27	7,25	9,22	5,27	290	Pinheiro
70	F	11,63	8,20	10,77	6,51	4,17	220	Pinheiro
71	F	12,65	8,14	11,98	8,20	4,30	370	Pinheiro
72	F	12,61	8,58	11,79	8,30	4,00	280	Pinheiro
73	F	12,54	8,53	11,90	6,21	4,39	320	Pinheiro
75	F	13,55	9,08	12,62	7,11	5,29	390	Pinheiro
76	F	14,38	9,58	12,96	8,27	5,22	400	Pinheiro
77	F	14,39	9,89	13,33	7,26	4,86	400	Pinheiro
79	F	13,70	8,70	12,50	6,30	4,80	330	Pinheiro
82	F	12,30	8,00	11,70	5,90	4,90	265	Pinheiro
83	F	12,80	8,70	11,60	6,70	4,80	315	Pinheiro
84	F	12,30	8,20	10,80	5,90	5,00	280	Pinheiro
85	F	11,60	7,80	10,60	5,20	4,40	230	Pinheiro
87	F	10,90	7,10	9,50	4,60	4,00	170	Pinheiro
88	F	10,10	6,70	9,40	4,70	3,70	155	Pinheiro
89	F	13,10	8,50	12,50	6,50	4,30	235	Pinheiro
90	F	13,90	9,00	13,20	6,20	5,60	400	Pinheiro
92	F	15,50	9,90	14,50	7,00	5,70	475	Pinheiro
93	F	12,50	8,00	11,60	6,20	4,50	270	Pinheiro
94	F	13,50	8,80	12,50	6,80	5,70	330	Pinheiro
95	F	15,00	9,90	14,30	7,20	5,50	425	Pinheiro
96	F	14,20	9,50	13,50	6,70	4,70	335	Pinheiro
98	F	14,50	9,30	13,60	7,10	5,10	370	Pinheiro
99	F	14,50	9,40	13,30	7,20	5,50	400	Pinheiro
100	F	13,40	9,50	7,30	13,30	5,40	343	Pinheiro
101	F	14,92	10,18	14,02	8,35	5,69	492,51	São Bento
102	F	14,21	9,78	13,27	7,33	5,40	388,22	São Bento
103	F	14,61	9,74	14,46	7,70	5,00	452,68	São Bento
104	F	13,87	9,13	12,68	6,61	4,70	440,25	São Bento
105	F	13,57	9,58	12,88	6,84	4,22	318,99	São Bento
106	F	16,21	9,81	14,75	7,88	5,87	618,58	São Bento
107	F	13,03	8,56	12,02	6,65	4,40	319,11	São Bento
108	F	13,48	8,88	12,65	6,35	4,77	367,80	São Bento
109	F	12,36	8,32	12,01	6,31	3,90	313,87	São Bento
110	F	13,28	9,26	12,49	7,07	4,40	355,19	São Bento
111	F	13,84	8,95	12,91	6,90	4,62	381,59	São Bento

112	F	12,02	8,04	11,42	5,70	3,90	251,80	São Bento
113	F	13,47	9,41	12,11	6,77	4,88	374,67	São Bento
122	F	12,48	8,78	11,72	6,78	4,70	306	São Bento
123	F	11,69	8,18	10,70	6,19	4,58	254	São Bento
124	F	11,67	7,83	10,60	6,40	4,42	238	São Bento
125	F	12,37	8,15	11,42	6,18	4,77	295	São Bento
127	F	12,50	8,43	11,82	6,46	4,98	330	São Bento
128	F	11,62	8,44	11,43	6,73	4,37	286	São Bento
129	F	12,43	8,56	11,53	6,60	4,66	333	São Bento
130	F	11,38	8,18	10,93	5,89	4,77	302	São Bento
135	F	12,48	8,77	11,82	6,66	4,57	319	São Bento
138	F	12,20	9,00	11,90	6,70	5,40	320	São Bento
139	F	13,20	9,00	12,30	7,10	5,10	355	São Bento
140	F	13,20	8,60	12,50	6,80	5,10	315	São Bento
141	F	14,70	9,70	13,60	7,60	5,60	455	São Bento
142	F	13,10	9,50	12,50	7,10	5,20	360	São Bento
145	F	14,50	9,60	13,40	7,30	5,40	475	São Bento
146	F	14,60	9,20	13,80	7,60	6,30	435	São Bento
147	F	12,80	9,70	12,20	7,50	5,00	355	São Bento
148	F	13,50	9,10	12,70	7,00	5,10	360	São Bento
149	F	13,10	9,50	12,50	7,10	5,20	365	São Bento
150	F	13,50	8,90	12,90	7,50	5,90	400	São Bento
152	F	15	7,3	10,6	7,2	5,5	460	Belém
154	F	16,7	7,4	8,5	7,2	5,6	500	Belém
156	F	13,8	8,6	10,1	5,1	5	300	Belém
159	F	15,9	10,5	14,3	7,3	5,6	480	Belém
162	F	15,2	10,4	14,9	7,9	5,5	480	Belém
163	F	15,9	9,8	14,7	7,6	5,4	450	Belém
164	F	13,5	10	12,9	7,9	4,9	380	Belém
165	F	15	8,9	12,8	7	5,3	360	Belém
166	F	13,7	9,6	13,6	7,4	5,2	360	Belém
167	F	14,6	9,8	13	7,8	4,5	380	Belém
169	F	14,3	9,6	13,5	7,3	5,4	450	Belém
171	F	15,9	11	13,9	8,1	5,3	560	Belém
172	F	15,9	10,4	13,5	7,2	5,2	490	Belém
173	F	14,7	10,3	14,4	8,2	4,7	490	Belém
175	F	16,5	10,3	15,3	8,5	5,7	560	Belém
176	F	14	10,2	13,4	7,5	5,4	420	Belém
177	F	15,7	11	14,3	8,7	5,5	520	Belém

*CC: comprimento carapaça; LC: largura de carapaça;
CP: comprimento de plastrão; LP: largura de plastrão;



Figura 3. Variações de coloração da carapaça de *Kinosternon scorpioides* de diferentes populações. Colômbia, Pará, Anajatuba, Pinheiro, São Bento.

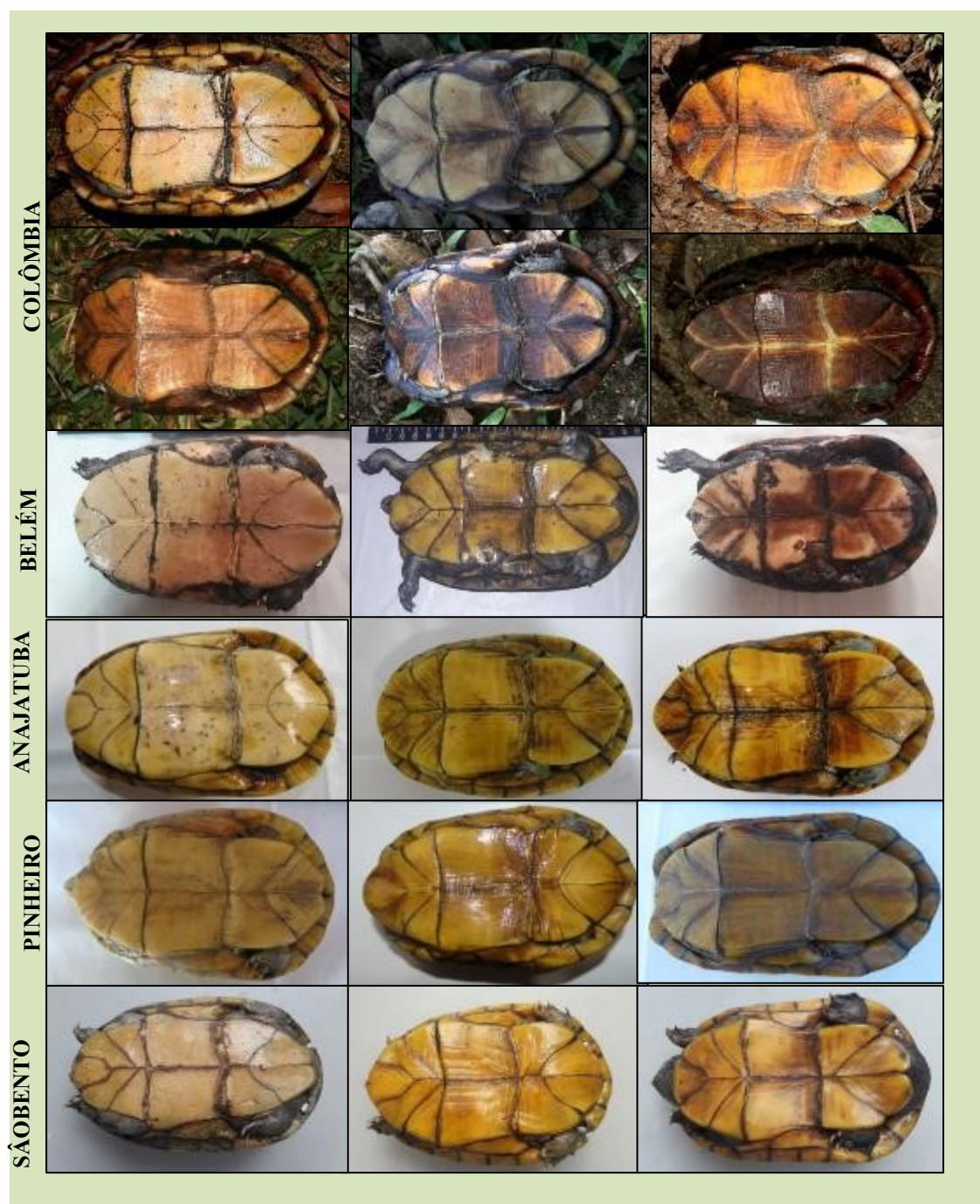


Figura 4. Variações de coloração de plastrão de *Kinosternon scorpioides* de diferentes populações. Colômbia, Pará, Anajatuba, Pinheiro, São Bento.

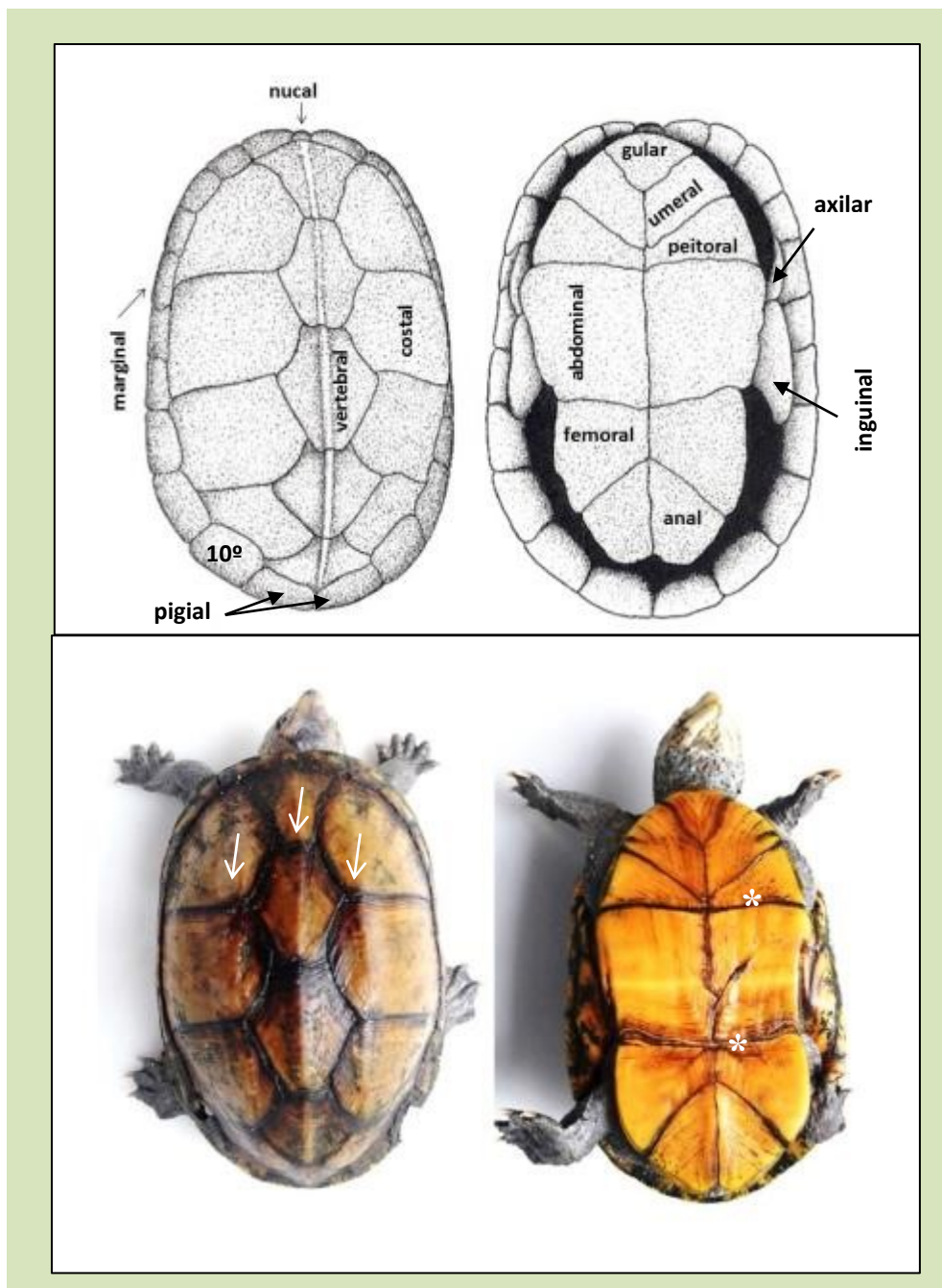
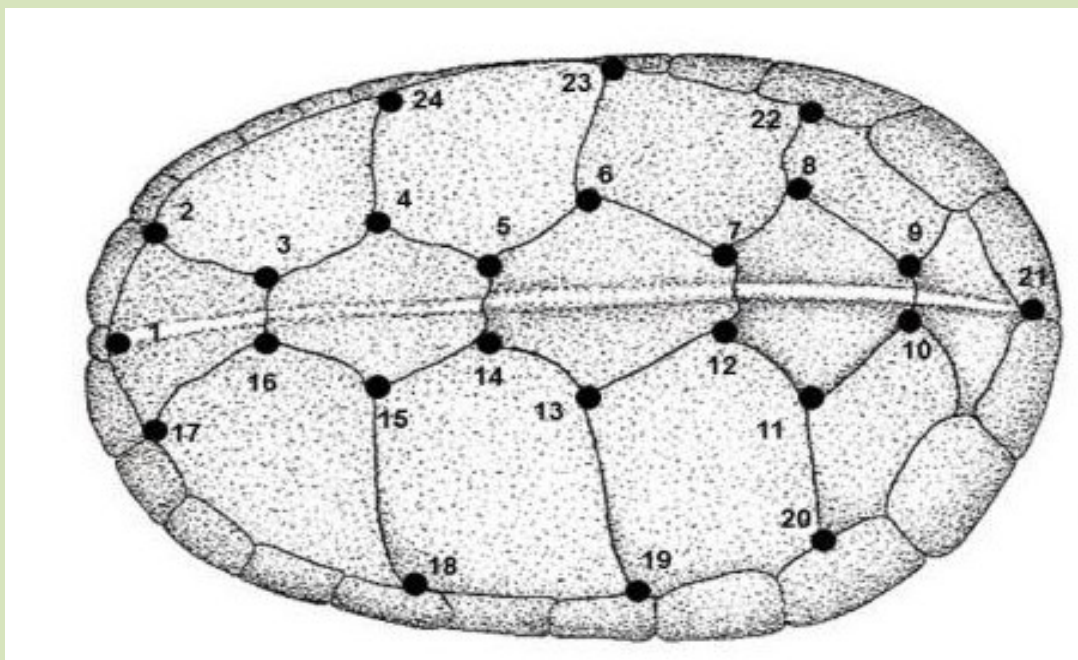
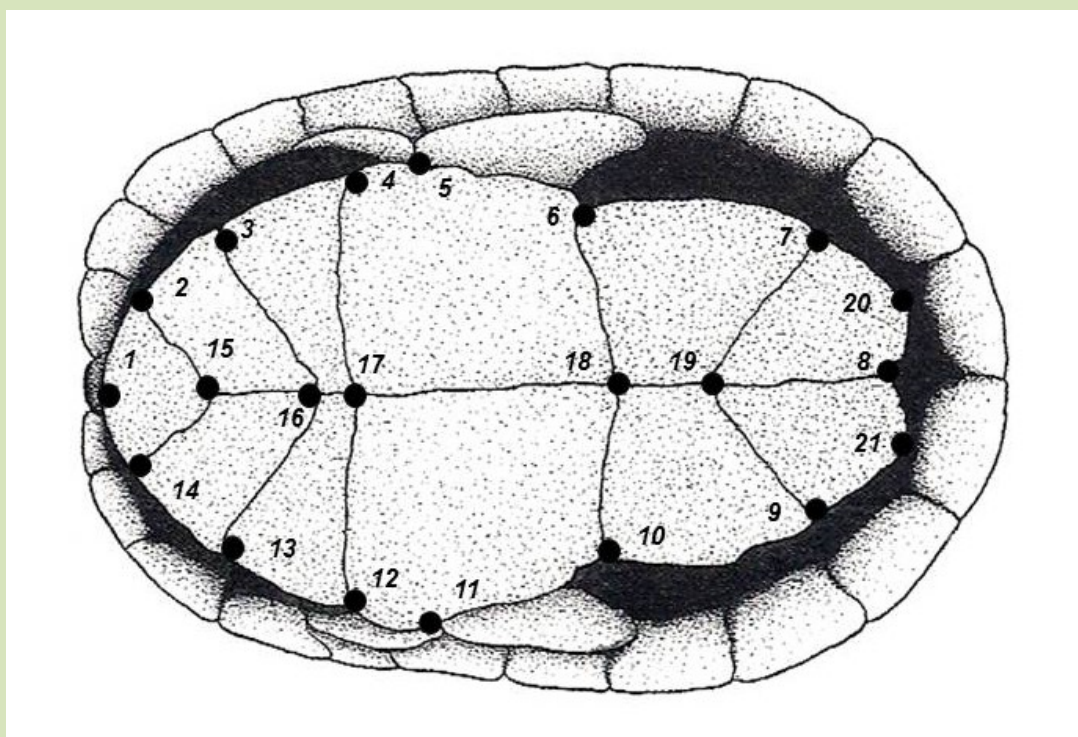


Figura 5. Morfologia e localização das placas dérmicas de *Kinosternon scorpioides*. Setas: as elevações do casco- carinas e asteriscos: dobradiças. Fonte: Autor, modificado de Rueda-Almonacid et al., 2007).



LEGENDA: 24 landmarks → 1-região caudal ao escudo nuchal; 2- interseção anterior direita entre o primeiro escudo vertebral e primeiro escudo costal direito; 3- interseção posterior entre o primeiro escudo vertebral, primeiro escudo costal e segundo escudo vertebral direito; 4- interseção entre segundo escudo vertebral e entre o primeiro e segundo escudo costal direito; 5- interseção entre segundo e terceiro escudo vertebral, e segundo escudo costal direito; 6- interseção entre terceiro escudo vertebral e entre o segundo e terceiro escudo costal direito; 7- interseção entre terceiro e quarto escudo vertebral e terceiro escudo costal direito; 8- interseção entre terceiro e quarto escudo costal direito e quarto escudopleural ; 9- interseção entre quarto e quinto escudo vertebral e quarto escudo costal direito; 10- interseção esquerda entre quarto e quinto escudo vertebral e quarto escudo costal esquerdo; 11- interseção esquerda entre quarto e terceiro escudo costal e quarto escudo vertebral; 12- interseção esquerda entre terceiro e quarto escudo vertebral e terceiro escudo costal esquerdo; 13- interseção esquerda entre segundo e terceiro escudo costal e terceiro escudo vertebral; 14- interseção esquerda entre terceiro e segundo escudo vertebral e segundo escudo costal; 15- interseção esquerda entre primeiro e segundo escudo costal e segundo escudo vertebral; 16- interseção esquerda entre primeiro e segundo escudo vertebral e primeiro costal esquerdo; 17- interseção anterior esquerda entre o primeiro escudo vertebral e primeiro escudo costal esquerdo; 18- interseção esquerda entre o primeiro e segundo escudo costal; 19- interseção esquerda segundo e terceiro escudo costal; 20- interseção esquerda entre terceiro e quarto escudo costal; 21- ponto extremo caudal do último escudo vertebral; 22- interseção direita entre terceiro e quarto escudo costal; 23- interseção direita entre segundo e terceiro escudo costal; 24- interseção direita entre primeiro e segundo escudo costal; Fonte: autor, 2017.

Figura 6. Identificação dos landmarks na carapaça *Kinosternon scorpioides*.



LEGENDA: Landmarks: 21 marcos: 1- região cranial ao escudo gular; 2- interseção anterior direita entre o gular e umeral; 3- interseção posterior entre o escudo umeral e peitoral direitos; 4- interseção entre escudo peitoral e abdominal direito; 5- interseção entre escudo abdominal e ponte; 6- interseção entre escudo abdominal direito e escudo femoral; 7- interseção entre escudo femoral e anal direito; 8- interseção entre escudos anais; 9- interseção entre escudo anal e femoral esquerdos; 10- interseção entre escudo abdominal e escudo femoral esquerdos; 11- interseção entre escudo abdominal e ponte esquerda; 12- interseção entre escudo peitoral e abdominal esquerdos; 13- interseção posterior entre o escudo umeral e peitoral esquerdos; 14- interseção anterior esquerda entre o gular e umeral; 15- interseção entre região caudal do escudo gular com umeral; 16- interseção entre região caudal do escudo umeral com escudos peitorais; 17- interseção entre região caudal do escudo peitoral com escudos abdominais; 18- interseção entre região caudal do escudo abdominal e escudos femorais; 19- interseção entre região caudal do escudo femorais com escudos anais; 20- região mediana entre 7 e 8; 21- região mediana entre 8 e 9. Fonte: autor, 2017.

Figura 7. Identificação dos landmarks no plastrão de *Kinosternon scorpioides*.

Tabela 2. Sequências externas originadas do Genbank do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade 1-CO1 utilizadas no alinhamento das amostras no Programa MEGA 6.06

	IDENTIFICAÇÃO	ID GENBANK
1	<i>Kinosternon alamosae</i> :México	HQ329708.1
2	<i>Kinosternon angustipons</i> : Panamá	HQ329709.1
3	<i>Kinosternon chimalhuaca</i> : México	HQ329711.1
4	<i>Kinosternon creaseri</i> : México	HQ329712.1
5	<i>Kinosternon dunni</i> :Colômbia	HQ329713.1
6	<i>Kinosternon hirtipes</i> :Mexico	HQ329716.1
7	<i>Kinosternon integrum</i> : México	HQ329717.1
8	<i>Kinosternon subrubrum</i>	KC750821.1
9	<i>Kinosternon acutum</i> : Guatemala	HQ329707.1
10	<i>Kinosternon durangoense</i> : México	HQ329714.1
11	<i>Kinosternon leucostomum</i> : Honduras	MH274191
12	<i>Kinosternon leucostomum</i>	MH140215
13	<i>Kinosternon flavescens</i> : EUA	MH274188.1
14	<i>Kinosternon integrum</i> : México	HQ329715.1
15	<i>Kinosternon arizonense</i> : EUA	HQ329710.1
16	<i>Kinosternon scorpioides</i> : Panamá	MH140218.1
17	<i>Kinosternon scorpioides</i> : Honduras	MH274192.1
18	<i>Sternotherus odoratus</i> : EUA	MH274688.1
19	<i>Sternotherus carinatus</i>	KU986153.1
20	<i>Terrapene carolina</i>	KC181202.1

Tabela 3. Descrição das amostras de *Kinosternon scorpioides* utilizadas na avaliação genética/ mt DNA; São Luís-MA, 2019

PAÍS	ESTADO	MUNÍCIOPIO /Povoados	AMOSTRAS*	INSTITUIÇÃO/ CONTATO
Brasil	Maranhão	Pinheiro	CMRKS 186	UEMA/ E. Chaves, Almerinda M. Medeiros, Nathália R. Aragão
			CMRKS 205	
		CMRKS 206		
		CMRKS 208		
		CMRKS 210		
	São Bento	CMRKS 07		
		CMRKS 08		
	CMRKS 76			
	CMRKS 77			
	Anajatuba	CMRKS 213		
		CMRKS 214		
		CMRKS 215		
CMRKS 216				
Raposa	CMRKS 217			
	CMRKS 74	UFMA- QUEAMAR/Mayara S. Monteles		
CMRKS 75				
Tocantins	Araguaína	CMRKS 231	NATURATINS-Araguaína/ T. B. Lima.	
Mato Grosso		CMRKS 229		
Amazonas	Manaus	CMRKS 84	Centro de Estudos dos Quelônios da Amazônia - CEQUA	
		CMRKS 85		
Pará	Belém	CMRKS 259	Museu Emílio Goeldi e Bosque Rodrigues	
		CMRKS 260		
		CMRKS 261		
		CMRKS 264		
		CMRKS 265		
		CMRKS 266		
		CMRKS 267		
		CMRKS 271		
		CMRKS 276		
		CMRKS 278		
		CMRKS 279		
CMRKS 281				
CMRKS 282				
Colômbia		CMRKS 252	Universidade de Los Andes /Natália Galego	
		CMRKS 253		
		CMRKS 254		
		CMRKS 255		
		CMRKS 256		
Total de amostras			39	

Tabela 4. Índice de Distância Média entre os grupos para o gene COI /mtDNA. São Luís-MA, 2019. Programa MEGA

GRUPOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1 Baixada-MA																							
2 Amazonas	0,01																						
3 Mato Grosso	0,01	0,02																					
4 Tocantins	0,01	0,01	0,00																				
5 Pará	0,02	0,01	0,02	0,02																			
6 Colômbia	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03																		
7 Ilha Curupu-MA	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,03																	
8 <i>K._acutum</i>	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13																
9 <i>K._alamosae</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,12															
10 <i>K._angustipons</i>	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,08	0,11														
11 <i>K._arizonense</i>	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08	0,07	0,07	0,12	0,08	0,09													
12 <i>K._chimalhuaca</i>	0,06	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,06	0,11	0,07	0,10	0,08												
13 <i>K._creaseri</i>	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13	0,00	0,12	0,08	0,12	0,11											
14 <i>K._dunni</i>	0,10	0,09	0,10	0,10	0,10	0,09	0,10	0,08	0,10	0,03	0,09	0,10	0,08										
15 <i>K._duragoense</i>	0,06	0,06	0,08	0,06	0,07	0,06	0,06	0,12	0,07	0,09	0,05	0,07	0,12	0,08									
16 <i>K._flavescens</i>	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08	0,07	0,07	0,13	0,06	0,10	0,07	0,08	0,13	0,11	0,05								
17 <i>K._hirtipes</i>	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,12	0,06	0,10	0,07	0,04	0,12	0,10	0,06	0,07							
18 <i>K._integrum</i>	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,12	0,06	0,10	0,07	0,06	0,12	0,09	0,06	0,07	0,05						
19 <i>K._leucostomum</i>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,11	0,10	0,09	0,10	0,07	0,10	0,10	0,09	0,08	0,09	0,10	0,11	0,10					
20 <i>K._scorpioides</i>	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,12	0,07	0,09	0,07	0,06	0,12	0,09	0,06	0,08	0,06	0,05	0,11				
21 <i>K._subrubrum</i>	0,09	0,08	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,11	0,08	0,09	0,08	0,08	0,11	0,09	0,07	0,08	0,08	0,09	0,11	0,09			
22 <i>K._odoratus</i>	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,12	0,12	0,10	0,11	0,11	0,11	0,12	0,11	0,10	0,11	0,11	0,12	0,11	0,12	0,10		
23 <i>K._carinatus</i>	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,10	0,09	0,10	0,09	0,09	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,11	0,10	0,09	0,06	
24 <i>Terrapene carolina</i>	0,20	0,19	0,20	0,20	0,19	0,20	0,20	0,21	0,20	0,18	0,19	0,20	0,21	0,18	0,19	0,20	0,21	0,19	0,19	0,19	0,22	0,20	0,20

*Programa Mega 6.06; Método: Kimura 2- parameter model; Missing data Treatment: Pairwise deletio

Tabela 5. Descrição dos haplótipos observados na rede de haplótipos gerada pelo Network; São Luís-MA, 2019

DNAsp		Network	
Haplótipos	Identificação	Haplótipos efetivos	Identificação
H1	CMRKS 07	H1	CMRKS 07
	CMRKS 08		CMRKS 08
	CMRKS 76		CMRKS 76
	CMRKS 77		CMRKS 77
	CMRKS 186		CMRKS 186
	CMRKS 205		CMRKS 205
	CMRKS 206		CMRKS 206
H2	CMRKS 208	H3	CMRKS 208
	CMRKS 210		CMRKS 210
	CMRKS 213		CMRKS 213
	CMRKS 214		CMRKS 214
	CMRKS 215		CMRKS 215
	CMRKS 217		CMRKS 217
	CMRKS 74		CMRKS 74
H3	CMRKS 75	H4	CMRKS 75
H4	CMRKS 84		CMRKS 84
H5	CMRKS 213	H5	CMRKS 213
			CMRKS 259
			CMRKS 260
			CMRKS 261
			CMRKS 265
			CMRKS 266
			CMRKS 267
H6	CMRKS 216	H6	CMRKS 276
			CMRKS 278
			CMRKS 282
H7	CMRKS 252	H7	CMRKS 216
			CMRKS 252
			CMRKS 253
H8	CMRKS 253	H8	CMRKS 254
			CMRKS 255
			CMRKS 256
H9	CMRKS 254	H9	CMRKS 229
			CMRKS 231
			CMRKS 281
H10	CMRKS 255	H12	CMRKS 231
			CMRKS 281
			CMRKS 264
H11	CMRKS 256	H13	CMRKS 271
			CMRKS 271
			CMRKS 282
H12	CMRKS 229	H14	CMRKS 264
H13	CMRKS 231		CMRKS 271
H14	CMRKS 281		

Tabela 6. Alelos privados por população e sua frequência relativa para cada locus analisado.

LOCUS	POPULAÇÕES					FREQ
	POP1	FREQ	POP2	FREQ	POP3	
P197	128	0,031	216	0,156	176	0,250
	132	0,031	220	0,056	188	0,250
	136	0,031	224	0,233		
	140	0,031	232	0,178		
	144	0,063	236	0,111		
	148	0,063	240	0,089		
	152	0,063	248	0,078		
	156	0,094				
	160	0,094				
	164	0,063				
	178	0,031				
	180	0,094				
	182	0,031				
	184	0,031				
	194	0,031				
	198	0,031				
P765	160	0,063	226	0,043	174	0,167
	168	0,063	234	0,213	194	0,167
	172	0,125	242	0,138	198	0,167
	176	0,125	250	0,096	202	0,167
	178	0,063	254	0,021		
	192	0,063	258	0,032		
	196	0,188	262	0,021		
	200	0,188	270	0,011		
			274	0,011		
P808			278	0,011		
	146	0,036	262	0,012	280	0,250
	150	0,071	274	0,151		
	154	0,036	286	0,163		
	166	0,036	290	0,163		
	170	0,036	294	0,093		
	186	0,036	310	0,023		
	190	0,036				
	214	0,143				
	218	0,107				
	226	0,107				
	230	0,036				
	242	0,036				
	246	0,071				
	250	0,036				
	254	0,071				

P988	138	0,036	262	0,066	236	0,333
	150	0,071	266	0,053	240	0,167
	158	0,071	274	0,132	256	0,167
	162	0,214	282	0,171		
	170	0,036	286	0,118		
	174	0,036	290	0,026		
	186	0,036				
	198	0,071				
	202	0,036				
	206	0,036				
	210	0,071				
	218	0,036				
	226	0,036				
	230	0,071				
	234	0,036				
	238	0,036				
	246	0,071				
P2000	130	0,028	254	0,014	212	0,167
	134	0,028	258	0,068	220	0,333
	138	0,056	262	0,230	228	0,167
	142	0,083	268	0,014		
	146	0,028	270	0,176		
	150	0,028	274	0,176		
	162	0,028	278	0,081		
	182	0,028	282	0,054		
	190	0,222	286	0,014		
	198	0,056				
	202	0,083				
	206	0,028				
	214	0,056				
	218	0,028				
	222	0,083				
	226	0,111				
	234	0,028				
P2474	62	0,026	194	0,012	180	0,167
	74	0,026	202	0,291	184	0,167
	94	0,026	214	0,070		
	98	0,026	218	0,058		
	102	0,026	222	0,047		
	114	0,026	226	0,012		
	122	0,079	230	0,035		
	126	0,079	234	0,047		
	130	0,026	238	0,023		
	134	0,026	242	0,012		
	138	0,026	246	0,023		

	142	0,053	254	0,012		
	146	0,105				
	150	0,053				
	154	0,053				
	158	0,026				
	162	0,026				
	166	0,079				
	170	0,026				
	174	0,053				
P2505	70	0,192	174	0,033	138	0,250
	82	0,038	178	0,011	148	0,250
	90	0,115	182	0,120		
	102	0,038	186	0,141		
	106	0,115	190	0,120		
	110	0,077	194	0,163		
	122	0,038	198	0,174		
	126	0,115	202	0,098		
	130	0,038	206	0,065		
	134	0,038	210	0,043		
	142	0,038	214	0,011		
			222	0,011		
			230	0,011		
P2609	74	0,028	202	0,022	156	0,167
	86	0,111	222	0,152		
	90	0,028	226	0,207		
	102	0,028	230	0,130		
	110	0,028	234	0,152		
	138	0,028	238	0,098		
	146	0,083	242	0,033		
	150	0,083	246	0,043		
	154	0,111	250	0,022		
	182	0,056	254	0,011		
	190	0,083	258	0,011		
	194	0,028				
P3155	150	0,059	218	0,111	204	0,333
	158	0,059	238	0,111	208	0,167
	162	0,088	242	0,022	244	0,167
	170	0,118	250	0,022		
	178	0,147	254	0,011		
	182	0,176	258	0,011		
	190	0,029	262	0,011		
	198	0,059	274	0,044		
	320	0,088	282	0,011		
	348	0,059	290	0,011		
			294	0,011		

P3686	62	0,071	168	0,021	142	0,167
	68	0,036	170	0,043	154	0,167
	86	0,036	172	0,011		
	90	0,036	174	0,021		
	94	0,071	178	0,085		
	98	0,036	182	0,053		
	102	0,071	186	0,064		
	106	0,071	190	0,181		
	110	0,071	198	0,085		
	114	0,036	202	0,064		
	118	0,036	206	0,064		
	122	0,071	210	0,064		
	126	0,107	222	0,011		
	130	0,143				
	134	0,036				

Legenda: Pop1= Pará, Pop 2= Baixada Maranhense e Pop3= Colômbia;



Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.



Isolation of Genomic DNA from Whole Blood

Sample Size	Lysis Solution		Protein Precipitation Solution	Isopropanol	DNA Rehydration Solution
	Cell	Nuclei			
300µl	900µl	300µl	100µl	300µl	100µl
1ml	3ml	1ml	330µl	1ml	150µl
3ml	9ml	3ml	1ml	3ml	250µl
10ml	30ml	10ml	3.3ml	10ml	800µl

As little as 20µl can be processed with this system. Please see Technical Manual #TM050, Section 3.C.

Red Blood Cell Lysis

1. Using volumes from the table above, combine the appropriate volumes of Cell Lysis Solution and blood. Mix by inversion.
2. Incubate for 10 minutes at room temperature.
3. Centrifuge:

≤300µl sample 13,000–16,000 × g*; 20 seconds
 1–10ml sample 2,000 × g; 10 minutes
4. Discard supernatant. Vortex pellet.

Nuclei Lysis and Protein Precipitation

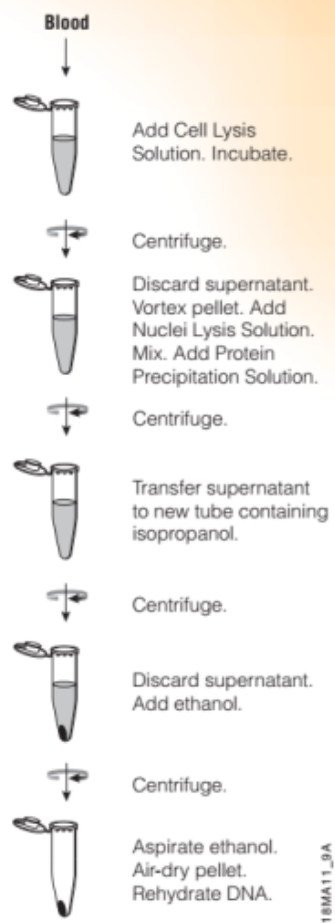
5. Using volumes from the table above, add Nuclei Lysis Solution and mix by inversion.
6. Add Protein Precipitation Solution; vortex for 20 seconds.
7. Centrifuge:

≤300µl sample 13,000–16,000 × g*; 3 minutes
 1–10ml sample 2,000 × g; 10 minutes

DNA Precipitation and Rehydration

8. Transfer supernatant to a new tube containing isopropanol (using volumes from table above). Mix.
9. Centrifuge:

≤300µl sample 13,000–16,000 × g*; 1 minute
 1–10ml sample 2,000 × g; 1 minute
10. Discard supernatant. Add 70% ethanol (same volume as isopropanol).
11. Centrifuge as in Step 9.
12. Aspirate the ethanol and air-dry the pellet (10–15 minutes).
13. Rehydrate the DNA in the appropriate volume of DNA Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.



*Maximum speed on a microcentrifuge.

Additional protocol information is available in Technical Manual #TM050, available online at: www.promega.com

ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:

www.promega.com • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601

©1999–2010 Promega Corporation. All Rights Reserved.



Printed in USA. Revised 10/10
Part #9FB022

Figura 1. Protocolo de extração de Dna utilizado nas amostras de *K. scorpioides*.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47635-4	Data da Emissão: 28/04/2016 23:27	Data para Revalidação*: 28/05/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ALANA LISLEA DE SOUSA	CPF:
Título do Projeto: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DO JURARÁ (KINOSTERNON SCORPIOIDES) DE REGIÕES BRASILEIRAS	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO	CNPJ: 06.352.421/0001-68

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta das amostras e questionário com pescadores	03/2015	04/2015
2	Realização de palestras educativas; Processamento das amostras	04/2015	05/2015
3	Processamento das amostras; ações de manejo e conservação	05/2015	06/2015
4	Realização de palestras e questionários; criação de material didático	06/2015	07/2015
5	Coletas das amostras e processamento; ações de manejo e conservação	07/2015	08/2015
6	Realização de palestras e questionários; criação de material didático	08/2015	09/2015
7	Processamento das amostras; Ações de manejo e conservação	09/2015	10/2015
8	Realização de palestras e questionários; Processamento das amostras	10/2015	11/2015
9	Processamento das amostras; Ações de manejo e conservação	11/2015	12/2015
10	Coleta das amostras e processamento das amostras	12/2015	01/2016
11	Realização de palestras e questionários; Processamento das amostras	01/2016	02/2016
12	Coleta das amostras; Ações de manejo e conservação	02/2016	03/2016
13	Realização de palestras; Processamento das amostras;	03/2016	04/2016
14	Processamento das amostras; Ações de manejo e conservação	04/2016	05/2016
15	Realização de palestras; Processamento das amostras de DNA	05/2016	06/2016
16	Ações de manejo e conservação; Processamento das amostras	06/2016	07/2016
17	Realização de palestras; Processamento das amostras	07/2016	08/2016
18	Coleta das amostras; ações de manejo e conservação;	08/2016	09/2016
19	Realização de palestras; Processamento das amostras	09/2016	10/2016
20	Coleta das amostras; ações de manejo e conservação;	10/2016	11/2016
21	Processamento das amostras	11/2016	12/2016
22	Ações de manejo e conservação: resultados parciais	12/2016	01/2017
23	Análise dos resultados;	01/2017	02/2017
24	Análise dos resultados finais; Apresentação de relatório	02/2017	03/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 69548979



Página 1/4

Figura 2. Licença de autorização concedida pelo IBAMA para coleta de *K. scorpioides*.



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

Centro de Ciências Agrárias
Curso de Medicina Veterinária
Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA)
Credenciamento Provisório - CONCEA/MCT
Processo 01200.002200/2015-06 (449) - Emissão 19/06/2015

DECLARAÇÃO

Declaramos para devidos fins que o projeto intitulado “Desenvolvimento de marcadores nucleares informativos para *Kinosternon scorpioides*” foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal -CEEA do Curso de Medicina Veterinária da Uema, conforme protocolo nº 08/2015 aprovado em 24/11/2015, para a execução da pesquisa pela equipe coordenada pelo Prof. Dr. Alana Lislea de Sousa (UEMA) e os membros Ligia Almeida Pereira, Elba Pereira Chaves, Maria Angelica Miglino, Ligia Tchaidika, Almerinda Macieira Medeiros e Lianne Polianne F. Araújo por atender as normas de Bem Estar Animal da Resolução do CFMV nº 1000/2012 e a Lei 11.794/2008.

São Luís, 27 de novembro de 2015

Prof. Dra. Alana Lislea de Sousa
Presidente do CEEA/CMV/UEMA

Figura 3. Autorização do Comitê de Ética e Experimentação Animal –CEEA para realização da pesquisa com *K. scorpioides*.



11/12/2018 870180161471
15:42
29409161812564553

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 075710 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 06352421000168

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária Paulo VI - Caixa Postal 09 - S/N - Tirirical

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65055-970

País: Brasil

Telefone: (98) 3269.5908

Fax:

Email: nit.ppg.uema@gmail.com

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA Kinosternon scorpioides

Resumo:

A presente invenção diz respeito a marcadores microsatélites para Kinosternon scorpioides a serem utilizados para o conhecimento da diversidade genética desta espécie, contribuindo desta forma com dados que possibilitem a elaboração de estratégias conservacionistas. A presente invenção, marcadores microsatélites para Kinosternon scorpioides, contém 34 loci microsatélites que pode ser utilizado não apenas para Kinosternon scorpioides, mas para outras espécies do gênero Kinosternon, preenchendo lacunas referentes ao padrão genético desses animais.

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4

Nome: ALANA LISLEA DE SOUSA

CPF:

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço:

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65073-383

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: alislea@hotmail.com

Inventor 2 de 4

Nome: LIGIA TCHAIKA

CPF:

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço:

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65075-180

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: ltchacka@yahoo.com.br

Nome: LIGIA ALMEIDA PEREIRA

CPF:

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço:

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65066-140

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: ligialmeida.uema@gmail.com

Inventor 4 de 4

Nome: ELBA PEREIRA CHAVES

CPF:

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço:

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65053-590

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: epcvet2013@hotmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante de pagamento.pdf
Relatório Descritivo	Relatório.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Resumo	Resumo.pdf

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 11/12/2018 às 15:42, Petição 870180161471

Figura 4. Comprovante de registro de patente no INPI.