

## ESTUDO DE VARIABILIDADE DA REGIÃO CONTROLE DO DNAmIT DE TARTARUGAS MARINHAS DA ESPÉCIE *Caretta caretta* (LINNAEUS, 1758) DE ÁREAS DE DESOVA NOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO E SERGIPE

Reis<sup>1</sup>, E.C.; Albano<sup>2</sup>, R.M.; Lôbo-Hajdu<sup>3</sup>, G.; Marcovaldi<sup>4</sup>, M.A.; Soares<sup>5</sup>, L.

<sup>1,3</sup> Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524 - PHLC - Sala 205, 20.550-013, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ.  
[est.cardinot@gmail.com](mailto:est.cardinot@gmail.com)

<sup>2</sup> Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Bioquímica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de setembro, 87 fundos - 4º andar, 20.551-013, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ.

<sup>4,5</sup> Fundação Centro Brasileiro de Proteção e Pesquisa das Tartarugas Marinhas, Projeto TAMAR-IBAMA, Cx. postal 2219, Rio Vermelho, 41.950-970, Salvador, BA.

### RESUMO

A tartaruga marinha da espécie *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) é considerada ameaçada de extinção ou vulnerável, tanto por órgãos ambientais nacionais quanto internacionais. No Brasil, a espécie é encontrada do litoral norte do Rio de Janeiro até o litoral do Ceará, sendo considerada a mais abundante em relação ao número de desovas. Ainda assim, faltam estudos detalhados da estrutura de suas populações. Dentro deste contexto, o presente estudo tem como objetivo caracterizar a estrutura genética das populações da Baía de Campos - RJ e Pirambu - SE, sendo este o primeiro projeto para tais bases do TAMAR-IBAMA. Foram analisados fragmentos de aproximadamente 420 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (DNAmIT) ou *D-loop* de 63 espécimes de *C. caretta* das temporadas de desova de 2004/2005 e 2005/2006. Após o recebimento das amostras, estas tiveram seu DNA genômico total extraído com tampão de lise contendo CTAB 2% e a região de *D-loop* foi amplificada para posterior purificação e seqüenciamento em MegaBACE 1000. Após edição e análise das seqüências por programas computacionais, foram encontrados os haplótipos CC-A4 (85,71%), CC-A24 (6,35%) e um haplótipo de *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829), que se convencionou chamar de CCxLO (7,94%), revelando o hibridismo entre tais espécies.

Palavras-chave: *D-loop*, hibridismo, tartaruga cabeçuda.

### INTRODUÇÃO

A tartaruga marinha da espécie *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), popularmente conhecida como cabeçuda, pertencente à família Cheloniidae, é considerada espécie ameaçada de extinção pela CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna*), assim como pela NOAA (*National Oceanic and Atmospheric Administration*), e espécie vulnerável pela IUCN (*The World Conservation Union*) e pelo MMA (Ministério do Meio Ambiente). Assim como as demais espécies, apresenta um ciclo de vida longo e complexo, envolvendo migrações transoceânicas, alternância de habitats e de alimentação. A maioria das áreas de desova localiza-se em regiões subtropicais. No Brasil, a espécie é encontrada do norte do litoral do Rio de Janeiro até o litoral do Ceará, sendo considerada a mais abundante em relação ao número de desovas, que ocorrem em maior concentração nas praias dos estados do Espírito Santo e Bahia. Ainda assim, poucos estudos até hoje enfocaram o estudo genético de populações *a priori* brasileiras de *C. caretta*.

Dentro deste contexto, o presente estudo tem como objetivo caracterizar a estrutura genética das populações de *C. caretta* da Baía de Campos - RJ e Pirambu - SE, sendo este o primeiro projeto para tais bases do TAMAR-IBAMA. Sua estrutura genética é caracterizada através da análise da diversidade de haplótipos de região controle do DNA mitocondrial (DNAmIT) ou *D-loop*, um marcador de matrilinearidade, de evolução rápida e amplamente utilizado para estudos populacionais, das fêmeas que desovam nestas áreas. O conhecimento da diversidade haplotípica destas populações permitirá uma maior eficácia de manejo e conservação da espécie no Brasil e conseqüentemente contribuirá para uma maior proteção global destes animais.

Este estudo é parte do Projeto Mamíferos e Quelônios Marinhos coordenado e financiado pela Gerência de Avaliação e Monitoramento Ambiental do Centro de Pesquisas da PETROBRAS (CENPES) e conta com a parceria e apoio do Projeto TAMAR-IBAMA.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de tecido de 63 fêmeas de *C. caretta* foram coletadas em praias do litoral norte do estado do Rio de Janeiro - Bacia de Campos (N = 49) e Sergipe - Pirambu (N = 14), monitoradas pelo Projeto TAMAR-IBAMA durante suas atividades rotineiras de conservação nas temporadas de desova de 2004/2005 e 2005/2006. O material foi então acondicionado em frascos contendo etanol 70% e enviados ao Laboratório de Genética Marinha (LGMAR) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

A extração do DNA genômico total foi realizada segundo protocolo modificado de DAMATO & CORACH (1996) e faz uso de tampão de lise contendo brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB 2% / 100 mM Tris-Cl pH 8,0 / 20 mM EDTA / 1,4 M NaCl). Em seguida, este foi quantificado em gel de agarose 0,8% visualizado após incubação em brometo de etídeo (0,6 • g/mL). A amplificação da região controle do DNAmít ou *D-loop* (BOWEN *et al.*, 1994; BOWEN *et al.*, 1995) foi realizada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR; MULLIS & FALOONA, 1987), utilizando-se os primers LCM15382 (Abreu-Grobois, comunicação pessoal 2005) e HDCM1 (ALLARD *et al.*, 1994). O fragmento amplificado foi, em seguida, purificado utilizando-se *GFX™ PCR DNA and gel band purification kit* (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. O seqüenciamento foi realizado utilizando-se *ET Dye terminator cycle sequence kit* (Amersham Biosciences) conforme especificações para uso no seqüenciador automático MegaBace 1000. As seqüências foram geradas pelo menos quatro vezes tanto no sentido senso quanto no anti-senso. Para cada amostra, a seqüência consenso foi gerada através dos programas *CAP3 Sequence Assembly Program* (HUANG & MADAN, 1999) e *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.1. Os haplótipos foram definidos a partir da comparação com os já depositados em bancos de dados, como o *Archie Carr Center for Sea Turtle Research* (ACCSTR). Neste, encontram-se depositados 41 haplótipos da região controle do DNAmít para *C. caretta* do Atlântico e Mediterrâneo.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após alinhamento e edição das seqüências geradas das 63 amostras, estas foram comparadas e identificadas segundo as seqüências de haplótipos já depositadas em bancos de dados. A freqüência dos haplótipos encontrados foi definida por região estudada (Rio de Janeiro e Sergipe), primeiro separadamente e depois em conjunto (Tab.1). Separadamente, as amostras do Rio de Janeiro - Bacia de Campos (N = 49) são representantes do haplótipo CC-A4 em 100% de sua amostragem. As novidades ficam por conta das amostras de Sergipe - Pirambu (N = 14), das quais cinco apresentam haplótipo convencionalmente chamado CCxLO, de espécimes considerados híbridos por apresentarem morfologia externa mais parecida com *C. caretta* e DNAmít de *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829); quatro são representantes do haplótipo CC-A24 e as demais são representantes do CC-A4. A ocorrência de hibridismo entre *C. caretta* e *L. olivacea* na amostragem proveniente de Sergipe pode estar relacionada à sobreposição das duas espécies durante o período de reprodução e desova, já que nesta região encontra-se a maior população de *L. olivacea* no país.

Quando as duas áreas são analisadas em conjunto, 85,71% das amostras são representantes do haplótipo CC-A4, 6,35% do CC-A24 e 7,94% de híbridos, convencionalmente chamados CCxLO (Tab.1). Este resultado mostra semelhança estatística ( $P = 0,05$ ) com o de SOARES (2004, dados não publicados), para as bases da Bahia e Espírito Santo, corroborando a hipótese de que as populações de *C. caretta* em áreas de desova do Brasil apresentam um perfil haplotípico distinto do das demais regiões do mundo.

Tabela 1 - Freqüência dos haplótipos encontrados para as localidades de Rio de Janeiro (Bacia de Campos) e Sergipe (Pirambu), analisadas separadamente e em conjunto. Onde: N = número amostral; % = porcentagem; RJ = Rio de Janeiro; SE = Sergipe.

Haplótipos	RJ (N)	RJ (%)	SE (N)	SE (%)	RJ+SE (N)	RJ+SE (%)
CC-A4	49	100	5	35,71	54	85,71
CC-A24	0	0	4	28,58	4	6,35
CCxLO	0	0	5	35,71	5	7,94
	Total = 49		Total = 14		Total = 63	

## CONCLUSÕES

Pela análise destes resultados, pode-se afirmar que as populações do Rio de Janeiro e Sergipe apresentam perfis haplotípicos que as diferem. Enquanto a população da Bacia de Campos - RJ mostra-se exclusivamente representada pelo haplótipo CC-A4, a população de Sergipe apresenta maior variação, com a ocorrência também do haplótipo CC-A24 e de um haplótipo de *L. olivacea* (CCxLO), revelando a ocorrência de hibridismo entre estas duas espécies nesta localidade. Este fato está provavelmente associado à grande ocorrência de *L. olivacea* em Sergipe e a uma possível sobreposição de áreas de reprodução e desova entre estas duas espécies.

A ocorrência de híbridos entre espécies de tartarugas marinhas é um fato recorrente na literatura, tendo sido primeiramente mencionada por CONCEIÇÃO *et al.* (1990). Entretanto, o hibridismo entre *C. caretta* e *L. olivacea* não foi reportado por SOARES (2004, dados não publicados), sendo este o primeiro registro para o Brasil.

Avaliando-se conjuntamente Rio de Janeiro e Sergipe, a análise estatística do presente trabalho corrobora os dados apresentados por SOARES (2004, dados não publicados). Isto indica que tais populações apresentam um perfil haplotípico característico de populações brasileiras.

## REFERÊNCIAS

- ACCSTR - Archie Carr Center for Sea Turtle Research. (<http://www.accstr.ufl.edu/ccmtdna.html>). Página acessada em dezembro de 2006.
- ALLARD, MW; MIYAMOTO, MM; BJORN DAL, KA; BOLTEN, AB & BOWEN BW (1994). Support for natal homing in green turtles from mitochondrial DNA sequences. *Copeia*, P 34-41.
- BIOEDIT - BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.1. Copyright© 1997-2004, Tom Hall. Isis Pharmaceuticals, Inc. (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).
- BOWEN, BW & AVISE, JC (1995). Conservation Genetics of Marine Turtles. Conservation Genetics: Case histories from nature. P 190-235, Chapman and Hall, New York.
- BOWEN, BW; KAMEZAKI, N; LIMPUS, CL; HUGHES, GH; MEYLAN, AB & AVISE, JC (1994). Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. *Evolution*, 48:1820-1828.
- CITES - Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna (apêndice I). ([www.cites.org](http://www.cites.org)). Página acessada em dezembro de 2006.
- CONCEIÇÃO, MB; LEVY, JA & MARCOVALDI, MA (1990). Eletrophoretic characterization of a hybrid between *Eretmochelys imbricata* and *Caretta caretta* (Cheloniidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, B 97:275-278.
- DAMATO, ME & CORACH, D (1996). Genetic diversity of populations of the freshwater shrimp *Macrobrachium borelli* (Cardidea, Palaemonidae) evaluated by RAPD analysis. *Journal of Crustacean Biology*, 16:650-655.
- HUANG, X & MADAN, A (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9: 868-877.
- IUCN - The World Conservation Union. ([www.iucn.org](http://www.iucn.org)). Página acessada em dezembro de 2006.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. Espécies ameaçadas. ([www.mma.gov.br](http://www.mma.gov.br)). Página acessada em dezembro de 2006.
- MULLIS, KB & FALOONA, F (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155:335-350.
- NOAA - National Oceanic and Atmospheric Administration. ([www.noaa.org](http://www.noaa.org)). Página acessada em dezembro de 2006.
- SOARES, LS (2004). O uso da análise genética da região controle do mtDNA na identificação das populações de tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*, Linnaeus 1758) nas áreas de desova e captura incidental no litoral brasileiro. Tese para obtenção do título de Mestre em Zoologia. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Belo Horizonte. Brasil.