

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA

GENÉTICA POPULACIONAL E MUDANÇAS
ECOLÓGICAS ONTOGENÉTICAS DE TARTARUGAS-
DE-PENTE (*ERETMOCHELYS IMBRICATA*) IMATURAS
NO BRASIL

MAIRA CARNEIRO PROIETTI

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Oceanografia Biológica da
Universidade Federal do Rio Grande,
como requisito parcial à obtenção do título
de DOUTOR

Orientador: Eduardo Resende Secchi
Co-orientador: Luis Fernando Marins

RIO GRANDE
Fevereiro de 2014

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores Edu e Luf, agradeço as orientações, apoio e confiança. Obrigada pelos vários anos de convivência e trabalho, e por toda a ajuda e motivação.

À Julia, agradeço sempre a amizade sincera, parceria de trabalho, aprendizado constante e amadurecimento na área de pesquisa. Obrigada pelos quase 11 anos de amizade e colaboração, e pela sua imensa ajuda nesta tese.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado sanduíche na Austrália. À Rufford Foundation agradeço o financiamento do trabalho. Agradeço também ao Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pelas autorizações de pesquisa.

Obrigada à banca de avaliação Alexandre Garcia, Adalto Bianchini e Sandro Bonatto pelas valiosas contribuições à tese.

Agradeço imensamente à Pata da Cobra pelo apoio logístico em inúmeras saídas de campo e à coordenação da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo pela possibilidade de pesquisar nesta área maravilhosa; à coordenação do Parque Nacional Marinho de Abrolhos pelo auxílio nas saídas de campo neste lugar colorido e incrível; à Cecirm e equipe do Transmar III por possibilitar e auxiliar as expedições ao Arquipélago de São Pedro e São Paulo, local único e especial; ao Projeto Tamar ICMBio pelo fornecimento de marcas e amostras do litoral da BA e CE; ao Núcleo de Educação e Monitoramento Ambiental e Centro de Recuperação de Animais Marinhos, em especial Dani, Serginho, Pedrinho e Robs, pela parceria e fornecimento de amostras da Praia do Cassino.

A todos os voluntários de campo, imprescindíveis para o trabalho: Déa, Marianna, Manu B., Tremembé, Diego, Arthur, Theo, Curiri, Tiago, Jaca, Paulinha, Chris, Japa, Ale, Robs, Arnaldinho, Paloma, Iara, Vi, Patrícia, Manu C., Mauro Japa: muito obrigada por toda a ajuda! Um agradecimento especial à Berna Barbosa, Felipe Buloto e Sr. Antônio (querido homem-peixe) pela dedicação e apoio aos trabalhos de campo. A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular e da salinha 4, agradeço pela convivência dentro e fora do laboratório e por toda a ajuda. Dani, Li, Lupe, Ceci, Isabel, Márcio, Bruna, Loraine, Fred, Ana Mai, Cássia: muito obrigada!

Aos professores e amigos da University of Western Australia e de Perth, obrigada pela oportunidade, ajudas, e convivência na experiência maravilhosa que foi residir na Austrália. Ao professor Chari Pattiaratchi e à Julia Reisser, obrigada pela recepção e pelas

inúmeras ajudas com as análises e o trabalho em geral. Agradeço ao professor John Cliff pelas análises de SIMS, ao Wije Sarath pelo auxílio com o modelo de partículas, e à Michele Thums pela oportunidade de trabalhar com as tartarugas australianas. Gabe, Lu, Bev, Asha, e demais colegas do Oceans Institute, obrigada pela convivência agradável. À Shirley Auld, agradeço por nos receber em sua casa e criar um ambiente de lar para nós, juntamente com o lindo e companheiro Benny. Agradeço em especial à Julia e Chris, pela acolhida, carinho e ajuda...foi maravilhoso passar este tempo na Austrália com vocês!

Às amigas do coração Dani, Li, Tati, Vi, Ceci, Isabel, Cá e Cissa, por tudo, tudo mesmo. Vocês são as melhores amigas que alguém poderia ter. Obrigada por serem minha família, obrigada pelo carinho, risadas, conversas, aprendizado, e por serem pessoas tão especiais e diariamente colorirem a minha vida! À família Cassineira que ainda permanece, e aos que já se espalharam pelo mundo: Mari e Adri, Rodrigo e Ro, Bob e Luara, Hugo e Camila, Amália, Elaine e Curiri, Lolô e Arthur, Arnaldinho e Tati, Mari, Benja, Bahia, Piauí, Colombia, Andréia, pentagêmeos, Lu, Carol, turma de 2002, obrigada pela convivência, jantares, mates, cervejinhas, jogos, idas à praia...e por tornar o Cassino um lugar familiar e acolhedor.

Agradeço com todo o coração meus pais, que sempre apoiaram completamente as minhas escolhas e caminhos. Vocês são uma inspiração para mim. Matas, obrigada pela amizade de sempre, e juntamente com a Carmen e Tutu, por me proporcionar a incomensurável alegria de ser tia de uma menininha tão linda e doce.

Ao Chris, obrigada pelo companheirismo, apoio e amor, essenciais para manter a tranquilidade nos momentos mais difíceis, e para viver maravilhosamente bem os momentos mais tranquilos. Te amo!

Por fim, um agradecimento especial às tartarugas marinhas, ao mar, ao sol...por fazerem do meu trabalho o melhor do mundo.

Índice

Resumo.....	6
Abstract.....	8
Capítulo 1. Introdução geral.....	10
1.1. As tartarugas marinhas: espécies existentes e fases de vida	10
1.2. Ameaças e estado de conservação.....	10
1.3. A tartaruga-de-pente	11
1.3.1. Características e distribuição.....	11
1.3.2. Ciclo de vida	12
1.3.3. Desafios no estudo das tartarugas marinhas.....	14
1.3.4. Análise genética aplicada ao estudo de tartarugas marinhas.....	15
1.3.4.1. Hibridização.....	15
1.3.4.2. Estrutura populacional	16
1.3.4.3. Origens de indivíduos em fases não-reprodutivas	17
1.3.5. Correntes oceânicas na inferência de dispersão e migrações.....	20
1.3.6. Análise de isótopos estáveis em tartarugas marinhas	21
1.3.6.1. Isótopos estáveis.....	21
1.3.6.2. Estudos de dieta, ciclo de vida e origens de tartarugas marinhas	24
1.3.7. Objetivos da tese	25
Capítulo 2. Tartarugas-de-pente imaturas na costa brasileira.....	27
2.1. Introdução	27
2.2. Metodologia	28
2.3. Síntese dos resultados	29
2.4. Conclusões	30
Capítulo 3. Ocorrência de híbridos imaturos de tartarugas-de-pente x tartarugas-cabeçudas na costa brasileira	32
3.1. Introdução	32
3.2. Metodologia	34
3.3. Síntese dos resultados	36
3.4. Conclusões	37
Capítulo 4. Estrutura genética e origens de tartarugas-de-pente em áreas de alimentação na costa brasileira.....	39
4.1. Introdução	39
4.2. Metodologia	40
4.3. Síntese dos resultados	42
4.4. Conclusões	44
Capítulo 5. Mudanças ecológicas ontogenéticas de tartarugas-de-pente no Brasil	46
5.1. Introdução	46

5.2. Metodologia	47
5.3. Resultados e discussão	49
Considerações Finais	51
Referências bibliográficas.....	52
Apêndice: artigos do doutorado.....	66
Artigo 1: Immature hawksbill turtles feeding in Brazilian Islands.....	66
Artigo 2: Hawksbill x loggerhead sea turtle hybrids at Bahia, Brazil: where do their hybrid offspring go?.....	71
Artigo 3: Genetic structure and natal origins of immature hawksbill turtles (<i>Eretmochelys imbricata</i>) in Brazilian waters.....	85
Artigo 4: Life history in a tortoiseshell: use of Secondary Ion Mass Spectrometry in stable isotope analysis of hawksbill carapace.....	115
Outras publicações do período do doutorado.....	126

Resumo

Estudos sobre a ecologia, migrações, estrutura das populações, e ciclo de vida de animais marinhos altamente migratórios como tartarugas marinhas, que possuem fases da vida em locais desconhecidos ou inacessíveis, são complexos porém essenciais para orientar estratégias de conservação. Nesta tese, análises da região controle do DNA mitocondrial (mtDNA), de correntes superficiais oceânicas (boias de deriva e modelagem biofísica), e de isótopos estáveis do carbono e nitrogênio, foram realizadas para elucidar algumas características ecológicas e populacionais de tartarugas-de-pente (*Eretmochelys imbricata*) imaturas em águas brasileiras. O Arquipélago de São Pedro e São Paulo (SPSP) e o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos foram identificados como importantes áreas de ocorrência da espécie e recomendados como locais prioritários para a sua conservação e recuperação. Através da análise do mtDNA, registrou-se, pela primeira vez, a ocorrência de híbridos imaturos de tartarugas-de-pente x tartarugas-cabeçudas provenientes da área de desova da Bahia. Estes híbridos foram observados no Ceará e Praia do Cassino (RS), áreas comuns para tartarugas-cabeçudas, porém incomuns para tartarugas-de-pente. Modelos de dispersão de partículas oceânicas demonstraram que tartarugas híbridas possuem maior chance de atingirem a região temperada do sul do Brasil do que tartarugas-de-pente puras. Sugere-se que, apesar da similaridade morfológica com a tartarugas-de-pente, a ecologia dos híbridos assemelha-se mais às tartarugas-cabeçudas. A análise do mtDNA também revelou que as tartarugas-de-pente imaturas na costa brasileira apresentam diversidade haplotípica média ($h = 0.413$), estruturação populacional fraca entre si, e origens principalmente a partir das áreas de desova nacionais, localizadas no litoral da Bahia e na Praia de Pipa (RN). Dados de bóias de deriva corroboraram as contribuições das áreas de desova brasileiras às áreas alimentares, com transporte via as Correntes Norte do Brasil e do Brasil. Por fim, as razões dos isótopos estáveis do carbono e nitrogênio ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) da carapaça e pele de tartarugas-de-pente imaturas foram analisadas por Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas (IRMS) e também por Espectrometria de Massa de Íons Secundários (SIMS) de secções transversais de carapaça. SIMS forneceu análises com alta resolução espacial, sendo possível descrever variações na história de vida de tartarugas de pente incluindo a aparente detecção da transição entre a fase oceânica (dieta oportunista e onívora) e costeira (dieta especializada e carnívora). IRMS revelou maiores valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em pele do que casco. Uma vez que a taxa de renovação da pele é maior

que a do casco, isto indica que a história recente destes animais é caracterizada por uma dieta baseada em organismos de nível trófico mais elevado e ocupação de habitats mais próximos da costa. Através da integração de diferentes ferramentas de estudo aplicadas às tartarugas-de-pente, foi possível obter um melhor entendimento sobre a estrutura das suas populações e ecologia. Estas informações poderão auxiliar tomadores de decisão na elaboração de estratégias de conservação desta espécie criticamente ameaçada de extinção.

Palavras-chave: tartarugas-de-pente, mtDNA, hibridização, estrutura genética, origens, dispersão, isótopos estáveis, mudanças ontogenéticas, dieta, habitat

Abstract

Studying the ecology, migrations population structure and life cycle of highly migratory marine animals such as sea turtles, which present life phases at unknown or inaccessible locations, is a complex task but essential for orienting conservation strategies. In this thesis, analyses of mitochondrial DNA (mtDNA) control region sequences, surface ocean currents (drifters and biophysical models), and stable isotopes of carbon and nitrogen were performed in order to elucidate some ecological and population characteristic of immature hawksbill sea turtles (*Eretmochelys imbricata*) in Brazilian waters. The São Pedro and São Paulo Archipelago (SPSP) and the Abrolhos National Marine Park were identified as important hawksbill occurrence areas, and recommended as priority areas for the conservation and recovery of this species. Through mtDNA analysis, the occurrence of immature hawksbill x loggerhead sea turtle hybrids from the Brazilian rookery of Bahia was observed. These hybrids occurred at Ceará state and Cassino Beach (RS), which are areas common for loggerheads but uncommon for hawksbills. Dispersal models of oceanic particles demonstrated that hybrid turtles have a higher chance of reaching the temperate South Brazil region, when compared to pure hawksbills. It is suggested that, despite the morphological similarity with hawksbills, hybrids display ecology more similar to loggerheads. mtDNA analysis also revealed that immature hawksbills along the Brazilian coast present average haplotype diversities ($h = 0.413$), weak population structure between them, and originate mainly from domestic rookeries located at Bahia state and Pipa Beach (Rio Grande do Norte state). Drifter data corroborate contributions mostly from Brazilian rookeries to the feeding grounds, possibly transported by the North Brazil and Brazil currents. Finally, stable isotope ratios of carbon and nitrogen ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) in the scute and skin of immature hawksbills were analyzed through Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS), as well as by Secondary Ion Mass Spectrometry of carapace transversal cross-sections. SIMS provided high spatial resolution analysis, allowing description of variations in hawksbill life history, including the apparent detection of the transition between an opportunistic and carnivorous diet during the oceanic phase, to a more specialized carnivorous diet at the coastal phase. IRMS analysis revealed higher mean $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in the skin than in carapace of animals. Since the renovation rate of skin is faster than scute, this implies that the recent histories of

hawksbills are characterized by diets based on higher trophic level prey and the occupation of habitats closer to the coast. By integrating different study tools applied to hawksbill turtles, a more thorough understanding of the populations and ecology of these animals was obtained. Such information can aid decision-makers in elaboration of conservation strategies of this critically endangered species.

Keywords: hawksbill turtles, mtDNA, hybridization, genetic structure, origins, dispersal, stable isotopes, ontogenetic changes, diet, habitat

Capítulo 1. Introdução geral

1.1. As tartarugas marinhas: espécies existentes e fases de vida

As tartarugas marinhas são componentes antigos da biodiversidade marinha com surgimento há mais de 200 milhões de anos, e descrição de mais de 50 gêneros e 100 espécies (Pritchard 1997). Atualmente existem sete espécies viventes, divididas em duas famílias e seis gêneros. A família Cheloniidae inclui seis espécies: a tartaruga-cabeçuda *Caretta caretta* (Linnaeus), verde *Chelonia mydas* (Linnaeus), de pente *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus), oliva *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz), de Kemp *Lepidochelys kempii* (Garman) e plana *Natator depressus* (Garman). A segunda família, Dermochelyidae, é composta por apenas uma espécie vivente, a tartaruga-de-couro *Dermochelys coriacea* (Vandelli). Excetuando a tartaruga-de-Kemp, restrita ao Golfo do México, e a plana, restrita à costa australiana, as tartarugas marinhas apresentam distribuição circumglobal, com alcance latitudinal variando de acordo com a adaptação térmica. Nos extremos térmicos estão a tartaruga-de-couro, com distribuição abrangente e registro de forrageio em águas de até 0.4°C (James et al. 2006), e a tartaruga-de-pente, com distribuição mais restrita a águas tropicais (Meylan 1999).

1.2. Ameaças e estado de conservação

Atualmente, todas as espécies de tartarugas marinhas são classificadas como ameaçadas de extinção pela IUCN (União Internacional de Conservação da Natureza), com diferentes populações classificadas de ‘Vulneráveis’ a ‘Criticamente Ameaçadas’. Este estado de conservação se deve principalmente à sobre-exploração histórica de fêmeas para consumo e/ou comercialização de seus ovos e carne (Lutcavage et al. 1997). Embora atualmente as tartarugas marinhas sejam protegidas por lei na maior parte do mundo, outros fatores incluindo comércio ilegal continuam ameaçando as populações destes animais. A crescente e desordenada ocupação da costa provoca degradação e até perda de habitats de desova e alimentação (Lutcavage et al. 1997). A industrialização e constante crescimento da frota pesqueira mundial vem causando um grande aumento da captura acidental de tartarugas marinhas, especialmente em redes de arrasto, espera e espinhel pelágico (Wallace et al. 2010). A poluição marinha, principalmente lixo plástico, também é uma grave ameaça: as tartarugas marinhas podem se enredar em materiais descartados de pesca, ou ingerirem material plástico provocando asfixia, fecalomas (endurecimento de

fezes no intestino e colon) e/ou falsa sensação de saciedade, podendo levar à morte do animal (Schuyler et al. 2013). Embora algumas populações de tartarugas marinhas estejam em processo de recuperação e crescimento, os fatores citados continuam dificultando a conservação destas espécies.

1.3. A tartaruga-de-pente

1.3.1. Características e distribuição

As tartarugas-de-pente possuem casco rígido de coloração marrom-amarelada com um padrão caracteristicamente radial e rajado. As características morfológicas que a distinguem das demais espécies são: escudos do casco sobrepostos; quatro pares de escudos laterais; escudo nucal separado do primeiro lateral; escudos marginais com pontas na parte posterior; três pares de escudos pós-orbitais; dois escudos pré-frontais; cabeça alongada; bico longo e fino (Pritchard & Mortimer 2000, Wyneken 2001) (Figura 1).

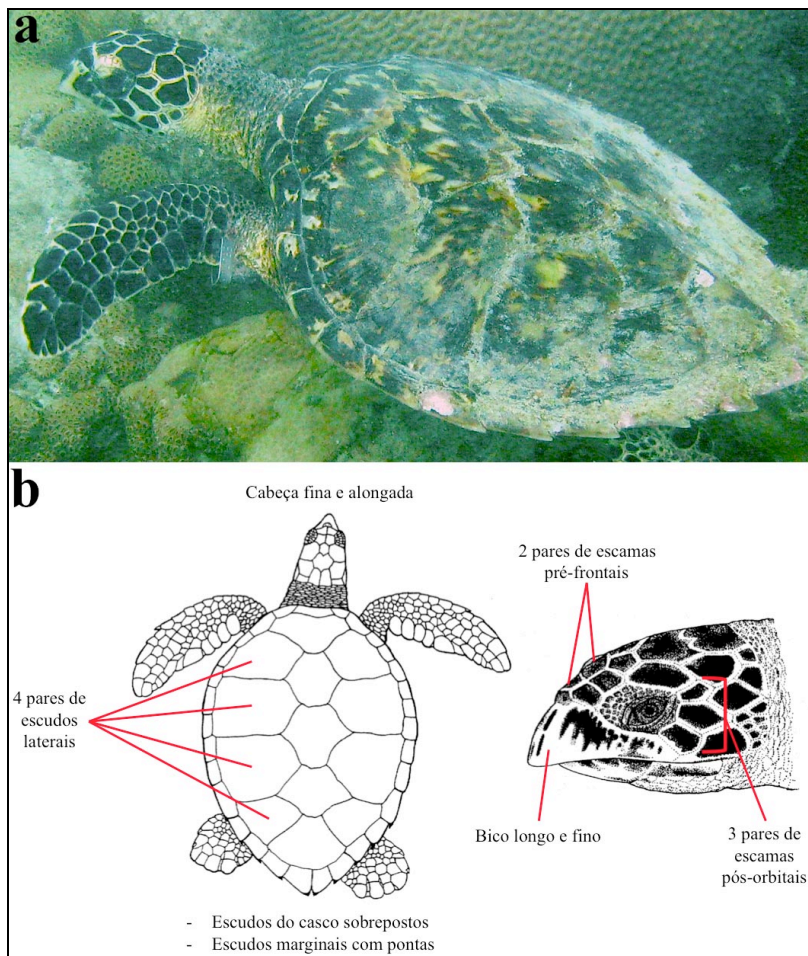


Figura 1. A tartaruga-de-pente: a) imagem subaquática (foto: Maira Proietti); b) características morfológicas da espécie (adaptado de Pritchard & Mortimer 2000).

Sua distribuição é circumglobal, com ocupação latitudinal preferencialmente tropical e ocasionalmente subtropical/temperada (León & Bjorndal 2002) (Figura 2). Geralmente habitam recifes de corais ou rochosos em águas costeiras rasas, onde se alimentam principalmente de animais bentônicos incrustantes como esponjas, zoantídeos e anêmonas (Meylan 1988, León & Bjorndal 2002, Proietti et al. 2012). Acredita-se que esta espécie contribua para a saúde e diversidade recifal por alterar a composição e distribuição de organismos bentônicos, permitindo a colonização de locais expostos pela predação e disponibilizando nutrientes e alimento (León & Bjorndal 2002, Wilson et al. 2010). Além disso, esta espécie comumente apresenta relações ecológicas com organismos recifais (Sazima et al. 2004, 2010).

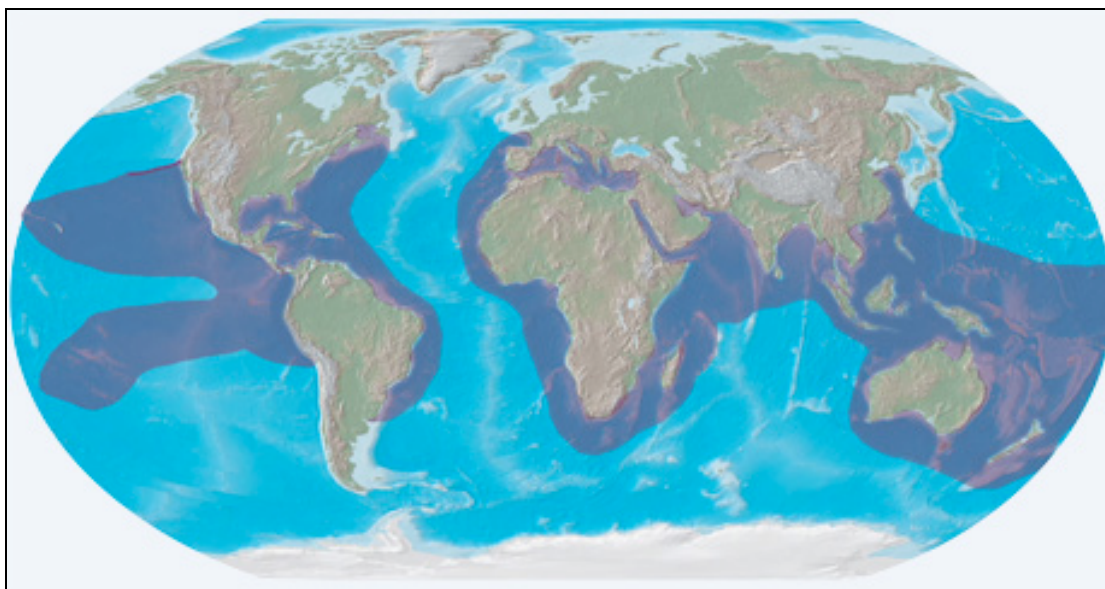


Figura 2. Distribuição global das tartarugas-de-pente (fonte: <http://www.seaworld.org/animal-info/info-books/sea-turtle/habitat-&-distribution.htm>)

1.3.2. Ciclo de vida

A vida das tartarugas-de-pente, como de todas as tartarugas marinhas, se inicia em uma praia de desova. Ovos são depositados em ninhos na areia e incubados por entre 50 e 60 dias; após esse período os filhotes eclodem, sobem à superfície, e correm imediatamente até o mar onde nadam continuamente até alcançarem o oceano aberto (Musick & Limpus 1996). Os pequenos animais permanecem no ambiente pelágico por alguns anos, onde acredita-se que sejam transportados por correntes oceânicas (Okuyama et al. 2009, Witherington et al. 2012) e se alimentem oportunisticamente do material presente na camada epipelágica do oceano (Limpus & Boyle 2008). Devido à dificuldade

de obtenção de informações sobre esta fase de vida, ela é comumente denominada de “anos perdidos” (Musick & Limpus 1996). Após atingirem um certo tamanho (entre 20 e 35cm de comprimento curvilíneo da carapaça), os animais recrutam a áreas costeiras para alimentação e desenvolvimento (Musick & Limpus 1996). Áreas de alimentação geralmente contêm indivíduos provindos de diversos estoques reprodutivos, sendo designadas “estoques mistos” (Bass et al. 2006). Tartarugas-de-pente podem apresentar fidelidade a áreas de alimentação, com estabelecimento de pequenas áreas de vida nessa fase do ciclo (van Dam & Diez 1998, Scales et al. 2011, Hart et al. 2012). As tartarugas atingem a maturidade geralmente entre 15 e 40 anos e aproximadamente 88 a 90 cm de comprimento curvilíneo de carapaça (Boulon 1994, Chaloupka & Limpus 1997). Com a maturidade, iniciam as migrações reprodutivas, comumente se deslocando por grandes distâncias até uma área de reprodução (Plotkin 2003). Estes animais apresentam comportamento de filopatria natal, retornando à região onde nasceram em ciclos reprodutivos subsequentes (Bass et al. 1996, Bowen & Karl 2007, Lee et al. 2007). A cópula ocorre geralmente em águas próximas às praias de desova, e as fêmeas saem do mar e sobem à praia para depositar em média 140 ovos por ninho, podendo construir de 2 a 6 ninhos por temporada (Miller 1997). Após a reprodução, os animais retornam para suas áreas de forrageio, onde permanecem de 2 a 3 anos armazenando energias para o próximo ciclo reprodutivo (Plotkin 2003). O ciclo de vida do tipo “oceânico-costeiro” das tartarugas marinhas está esquematizado na Figura 3.

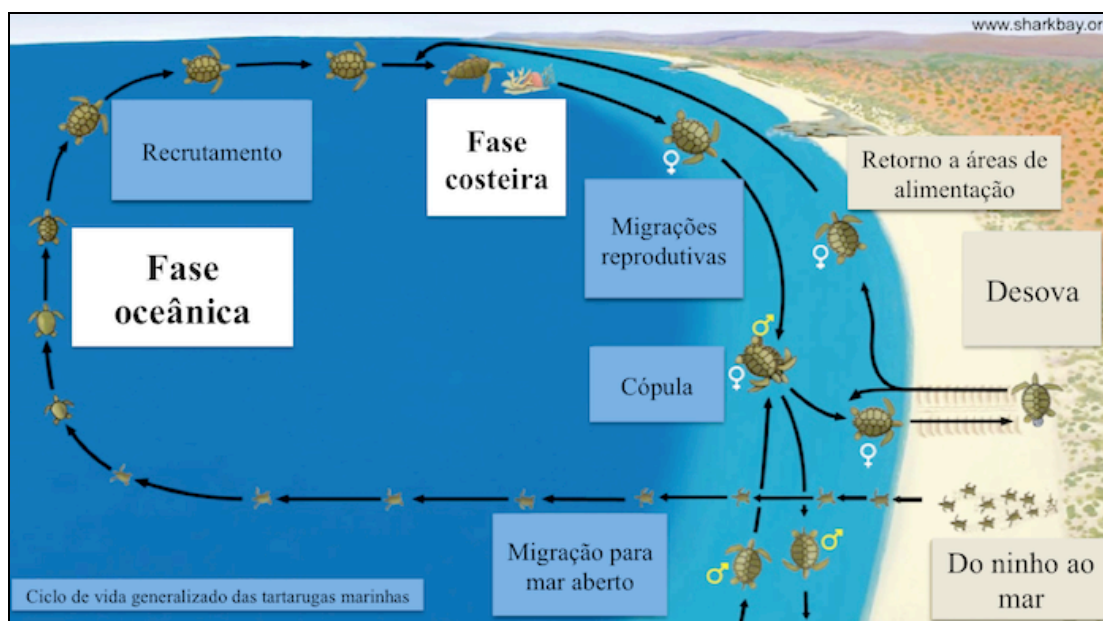


Figura 3. Ciclo de vida generalizado das tartarugas marinhas, com descrição das diferentes etapas das fases oceânica e costeira (fonte: www.sharkbay.org).

1.3.3. Desafios no estudo das tartarugas marinhas

A complexidade do ciclo de vida das tartarugas marinhas, com fases crípticas, ocupação de diferentes habitats, e realização de extensas migrações, dificulta seu estudo e conservação. Até algum tempo atrás, grande parte do estudo destes animais era realizada apenas nas praias de desova, com monitoramento e coleta de dados das fêmeas e ninhos (Bjorndal 2000). Atualmente, as observações diretas no habitat marinho, via estudos subaquáticos, monitoramento da pesca e rastreamento por satélite estão sendo crescentemente aplicados para se entender outras fases de vida das tartarugas (Hamann et al. 2010). Estudos diretos das tartarugas marinhas fornecem informações essenciais quanto à sua biologia, ecologia e comportamento, porém muitas características destes animais não são detectáveis diretamente. Por exemplo, dados de marcação já haviam evidenciado que fêmeas retornavam fielmente a uma determinada área reprodutiva. Carr (1967) propôs que esta filopatria era natal, enquanto Owens et al. (1962) propuseram a hipótese de facilitação social para explicar o comportamento filopátrico: uma tartaruga inexperiente seguiria outra com experiência de deslocamento até uma área de reprodução, e ali se fixaria para futuras temporadas reprodutivas. Devido à impossibilidade de se marcar um filhote recém-nascido para recuperação das marcas décadas depois, estas hipóteses não eram diretamente testáveis. No entanto, elas gerariam previsões genéticas testáveis: a filopatria natal resultaria em áreas de desova com caracteres genéticos distintos, enquanto a facilitação

social permitiria maiores fluxos gênicos entre áreas (Meylan et al. 1990, Bowen et al. 1992). Deste modo, os modelos de filopatria natal e facilitação social foram avaliados indiretamente através da análise do DNA mitocondrial (mtDNA), herdado maternalmente. Estudos de marcação haviam demonstrado que áreas de alimentação de tartarugas-verdes no Brasil eram compartilhadas por tartarugas das áreas reprodutivas do Suriname e Ilha de Ascensão. Apesar deste compartilhamento de áreas alimentares brasileiras, as análises de sequências de mtDNA demonstraram forte diferenciação genética entre Suriname e Ascensão (Bowen et al. 1992), corroborando as expectativas genéticas da filopatria natal e apoiando este modelo comportamental.

Com o desenvolvimento de novas tecnologias e análises científicas, métodos indiretos têm sido consistentemente aplicados para um melhor entendimento das tartarugas marinhas, com obtenção de informações essenciais para a elaboração de estratégias de conservação destas espécies ameaçadas. A seguir serão abordadas metodologias e informações provenientes de três tipos de análises indiretas usadas nesta tese: caracteres genéticos, correntes oceânicas, e isótopos estáveis.

1.3.4. Análise genética aplicada ao estudo de tartarugas marinhas

O acelerado progresso de tecnologias para sequenciamento e genotipagem de DNA tem expandido rapidamente a abrangência de estudos envolvendo análises genéticas. No caso das tartarugas marinhas, estudos genéticos (em especial do mtDNA) estão sendo crescentemente aplicados e possuem um importante papel na resolução de questões relevantes à conservação destes animais (Jensen et al. 2013). Fatores que podem ser esclarecidos através da análise genética incluem: filogenia e sistemática, sistemas reprodutivos e múltipla paternidade, proporções sexuais de filhotes e adultos, fluxo gênico e filopatria natal, hibridização, estrutura populacional, e origens de indivíduos em fases não-reprodutivas (Avice 2007, Bowen & Karl 2007, Jensen et al. 2013). Os três últimos fatores, assim como a importância de seu entendimento para a conservação, serão abordados neste trabalho.

1.3.4.1. Hibridização

A ocorrência de hibridização natural entre espécies de tartarugas marinhas da família Cheloniidae já foi registrada em diversos locais, e acredita-se que a inexistência de barreiras reprodutivas (Seminoff et al. 2003) e a compatibilidade cromossômica entre

espécies permita este inter cruzamento (Karl et al. 1995). Inicialmente, a descrição de híbridos era baseada em características morfológicas intermediárias de duas espécies (e.g. Wood et al. 1983). Atualmente, marcadores moleculares permitem confirmar e avaliar a extensão destes eventos de hibridização (Lara-Ruiz et al. 2006, Vilaça et al. 2012). que são geralmente esporádicos e envolvendo poucos indivíduos. Porém, no Brasil observa-se uma frequência excepcionalmente alta (46%) de híbridos entre os grupos reprodutivos de tartarugas-de-pente e tartarugas-cabeçudas na costa da Bahia (Lara-Ruiz et al. 2006). As tartarugas híbridas apresentam morfologia de tartarugas-de-pente, mas análises genéticas revelaram mtDNA de tartarugas-cabeçudas. Apesar de não terem estudos quanto à sua fecundidade, estas fêmeas híbridas são reprodutivamente viáveis e produzem filhotes (Lara-Ruiz et al. 2006).

A hibridização pode ser um processo natural ou provocada por fatores antrópicos como reduções populacionais e perda de habitats, podendo levar à extinção de espécies raras (Allendorf et al. 2001). No caso das tartarugas marinhas, ainda não se sabe se este processo pode afetar sua aptidão reprodutiva e sobrevivência. Maiores investigações são necessárias para definir se medidas específicas devem ser adotadas no manejo de animais híbridos.

1.3.4.2. Estrutura populacional

O sucesso de estratégias de conservação de populações depende da manutenção da diversidade genética a nível de espécies, populações e regiões geográficas (e.g. Moritz & Faith 1998). Populações geneticamente diferenciadas devem ser consideradas unidades de conservação e manejo distintas para auxiliar na manutenção desta diversidade (Moritz 1994). Estudos de diferenciação entre populações de tartarugas marinhas tem sido realizados principalmente para avaliar o grau de distinção entre colônias de desova, em especial de tartarugas-verdes e cabeçudas. De modo geral, as áreas reprodutivas de todas as espécies apresentam alto grau de estruturação regional com pouco fluxo genético entre elas, devendo serem consideradas unidades de manejo distintas para a manutenção da diversidade genética (Bowen et al. 1992, 1998, 2005, Karl et al. 1992, Encalada et al. 1996, Dutton et al. 1999, Formia et al. 2006, Bourjea et al. 2007, Leroux et al. 2012). Por exemplo, áreas de desova de tartarugas-verdes no Oceano Atlântico formam quatro agrupamentos com elevada diferenciação genética: um grupo a oeste (México, Costa Rica e Florida), um central (Ilha Aves, Suriname), um a sul/sudeste (Brasil, Ascensão e Guiné

Bissau), e um a leste, no Mediterrâneo (Chipre) (Bowen et al. 1992, Encalada et al. 1996). A análise de estrutura genética entre populações de desova de tartarugas-de-pente no Atlântico também revelou a presença de quatro grupos regionais com alto grau de distinção genética, com áreas localizadas no Golfo do México, Caribe, Brasil e África (Leroux et al. 2012). Estudos da estrutura entre agregações de tartarugas em áreas de alimentação são menos comuns, mas também demonstram distinção entre populações regionais, embora em menor grau que as áreas reprodutivas (Bowen & Karl 2007, Blumenthal et al. 2009, Amorochio et al. 2012, Proietti et al. 2012). Estas agregações em áreas de alimentação serão referidas ao longo da tese como “populações de alimentação” para simplificação.

1.3.4.3. Origens de indivíduos em fases não-reprodutivas

Um grande desafio no estudo das tartarugas marinhas é o entendimento das conexões entre suas diferentes fases de vida, como por exemplo a origem natal de indivíduos em áreas não reprodutivas. Devido ao comportamento de filopatria natal de fêmeas e consequente estruturação genética entre colônias reprodutivas, diferentes áreas de desova apresentam distintas “assinaturas” de haplótipos do mtDNA (Bowen et al. 1996, Lahanas et al. 1998). As assinaturas haplotípicas de cada área podem ser usadas para verificar a relação entre populações reprodutivas e alimentares através de uma análise denominada Análise de Estoque Misto (Mixed Stock Analysis – MSA). Esta análise utiliza diferenças e semelhanças nas frequências de haplótipos para estimar, através de um algoritmo Bayesiano e Cadeias Markov, as contribuições de populações de desova (“estoques”) a populações alimentares (Pella & Masuda 2001, Bolker et al. 2002). A MSA foi inicialmente desenvolvida para a avaliação de estoques pesqueiros (Pella & Masuda 2001), mas é comumente aplicada ao entendimento de estoques de tartarugas marinhas (e.g. Bowen et al. 1994, 2007, Bass et al. 2006, Reece et al. 2006, Naro-Maciel et al. 2007, Blumenthal et al. 2009, Amorochio et al. 2012, Proietti et al. 2012). Existem dois principais modelos de análise de estoque: 1) modelo “muitas-a-uma”, em que são estimadas as contribuições de diversas áreas de desova e uma única área alimentar; 2) modelo “muitas-a-muitas”, em que as contribuições de diversas áreas de desova são estimadas a diversas áreas alimentares, fornecendo um cenário metapopulacional mais completo (Bolker et al. 2007).

A MSA apresenta algumas limitações: 1) o marcador mtDNA muitas vezes não consegue distinguir precisamente todas as áreas de desova, portanto a determinação exata

de uma origem natal muitas vezes não é possível; 2) alguns locais apresentam números amostrais pequenos ou moderados, o que pode resultar em amplos intervalos de confiança; e 3) a análise pressupõe que todos os potenciais estoques foram amostrados, porém quando este não se cumpre, há possibilidade de um animal de uma área alimentar ter originado de um estoque reprodutivo não amostrado (Awise 2007). Apesar destas limitações, esta abordagem genética permite maior entendimento das ligações entre populações de alimentação e suas origens, e consequentemente do movimento realizado entre elas. Estas informações são dificilmente obtidas através de observações em campo ou estudos de marcação.

Em termos de relevância para a conservação, uma importante descoberta obtida através da MSA foi a confirmação de que populações alimentares de tartarugas marinhas são geralmente misturas de indivíduos de diferentes áreas de desova (Awise 2007, Bowen & Karl 2007) (Figura 4). Portanto, apesar da aparente independência entre áreas de desova, elas podem ser demograficamente interconectadas nas outras fases de vida; isto significa que impactos em áreas não-reprodutivas podem indiretamente impactar múltiplas, e muitas vezes distantes, populações reprodutivas (Mortimer et al. 2007). O entendimento do alcance geográfico das tartarugas marinhas é extremamente importante para o desenvolvimento de planos de conservação. Além disso, como estes animais comumente passam por diferentes fronteiras geopolíticas, a cooperação internacional pode ser fundamental para sua efetiva conservação (Jensen et al. 2013).

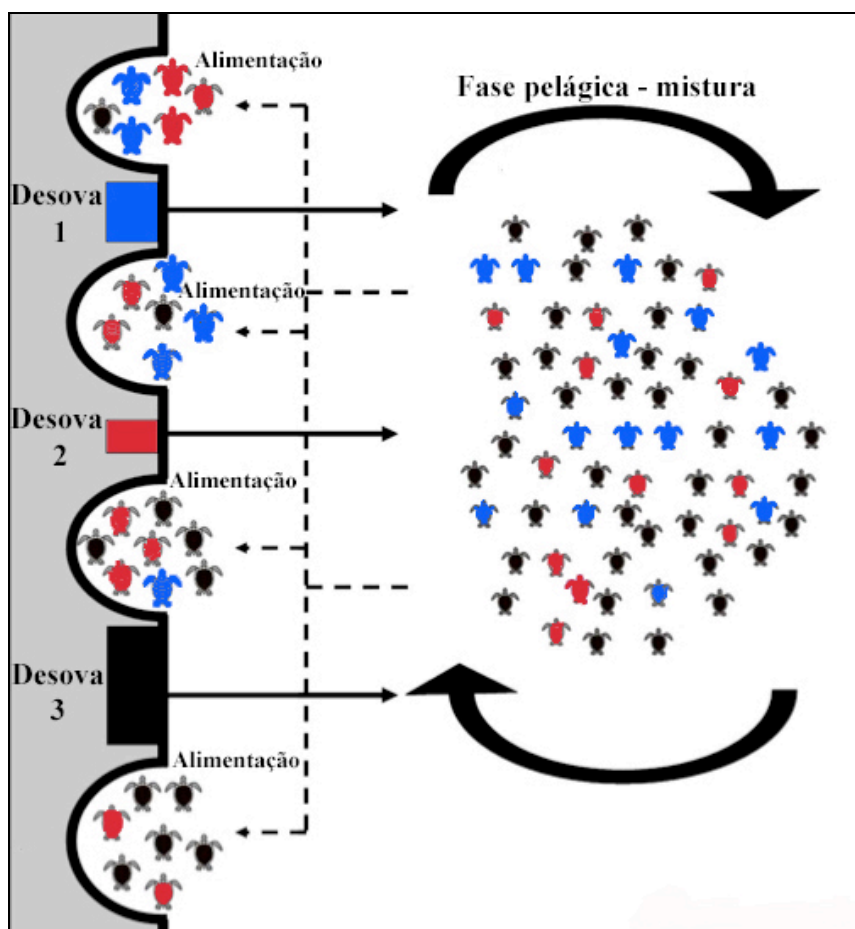


Figura 4. Modelo teórico de estoques mistos. Quadrados coloridos representam diferentes áreas de desova e suas diferentes “assinaturas” de mtDNA. Animais nascidos nestas áreas se misturam no ambiente pelágico e ao recrutarem para suas áreas de alimentação (áreas curvas da costa) formam “estoques mistos” (Adaptado de Jensen 2010).

Como exemplo da aplicação direta da identificação de origens natais para o manejo de animais será detalhado o caso da tartaruga-de-pente no Caribe. Frente às drásticas reduções populacionais desta espécie, seu comércio internacional foi proibido pela Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção (CITES). No entanto, há diversos interesses na reabertura do lucrativo comércio internacional de cascos de tartarugas-de-pente. Frente às petições do governo Cubano para a reabertura deste comércio, foram avaliadas as ligações entre áreas de desova e alimentação, para verificar se esta exploração impactaria outras áreas da região (Bowen et al. 2007, Mortimer et al. 2007). Através da MSA, Bowen et al. (2007) verificaram que a exploração de tartarugas-de-pente de qualquer área de desova pode impactar múltiplas áreas de alimentação em águas internacionais, e vice-versa. Deste modo, qualquer nação que permita o uso destes animais poderia prejudicar os esforços de

conservação em outros locais. Com base nestes resultados, a CITES continua mantendo a ilegalidade do comércio internacional de tartarugas-de-pente (Mortimer et al. 2007).

Outra característica interessante da MSA, por ser uma análise Bayesiana, é a possibilidade de se inserir informações ecológicas prévias como *prioris*. Dados como tamanhos populacionais e distâncias entre áreas de desova e de alimentação são comumente aplicados como *prioris*, baseando-se no pressuposto de que estes fatores influenciam a composição de um estoque misto (e.g. Okuyama & Bolker 2005, Blumenthal et al. 2009, Amorocho et al. 2012, Proietti et al. 2012). Correntes oceânicas superficiais também podem ser bons indicadores de como tartarugas marinhas nascidas em uma determinada área de desova dispersam até áreas alimentares, uma vez que as correntes oceânicas aparentemente influenciam como estes animais se movimentam (Luschi et al. 2003). A combinação de características genéticas e ecológicas é ideal para a obtenção de cenários de conectividade mais completos.

1.3.5. Correntes oceânicas na inferência de dispersão e migrações

Após o nascimento, os filhotes de tartarugas marinhas iniciam uma trajetória oceânica que pode se estender por grandes distâncias e envolver movimentos transoceânicos. Estes movimentos são aparentemente influenciados pelos padrões de correntes (Musick & Limpus 1996, Luschi 2013), apesar dos pequenos animais terem alguma capacidade de resposta a mudanças ambientais para permanecerem em habitats favoráveis (Lohmann & Lohmann 1996, Cain et al. 2005). À medida que se desenvolvem, acredita-se que a influência das correntes diminua mas ainda ocorra, uma vez que comparações entre trajetórias de animais rastreados por satélite e padrões de correntes oceânicas consistentemente demonstram similaridades (Luschi et al. 1998, 2003, Craig et al. 2004, Lambardi et al. 2008). Portanto, é possível assumir que as correntes oceânicas influenciem o padrão de dispersão das tartarugas após o nascimento e em quais locais eles recrutam após a fase pelágica.

Dados de correntes, principalmente obtidos através de boias de deriva superficiais e modelagem de partículas, podem ser utilizados de modo independente na inferência de padrões de dispersão de tartarugas (Hamann et al. 2011, Gaspar et al. 2012, Putman & Naro-Maciel 2013). Podem também serem inseridos diretamente na MSA como *prioris* ecológicas (Proietti et al. 2012), ou apenas comparados às origens natais estimadas geneticamente (Blumenthal et al. 2009, Monzón-Argüello et al. 2010, Amorocho et al.

2012). Por exemplo, Blumenthal et al. (2009) descreveram as origens genéticas de tartarugas-de-pente de áreas de alimentação caribenhas, e compararam estas origens a um modelo de dispersão de partículas. De modo geral, estes autores detectaram significativa correlação entre os perfis genéticos das agregações alimentares e os padrões de distribuição de partículas, identificando um alto grau de mistura na região mas com alguma estrutura genética aparentemente determinada por correntes oceânicas. Isto demonstra o potencial de uma abordagem multidisciplinar para o melhor entendimento da conectividade de populações deste animal migratório.

1.3.6. Análise de isótopos estáveis em tartarugas marinhas

1.3.6.1. Isótopos estáveis

A análise de isótopos estáveis (IE) tem se tornado uma importante ferramenta em estudos ecológicos, principalmente para a determinação de níveis tróficos e identificação de fontes alimentares (e.g. Arthur et al. 2008). Isótopos estáveis são formas estáveis e naturais de elementos que apresentam diferentes massas nucleares, o que resulta em propriedades físicas que levam a diferentes comportamentos em processos biogeoquímicos (Rubenstein & Hobson 2004). A análise de IE baseia-se no princípio de que a razão entre isótopos estáveis de elementos (principalmente C, N, S, O, H) nos tecidos de um consumidor refletirá a composição dos itens de sua dieta (Peterson & Fry 1987). Razões entre $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$, expressas na notação delta $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, são as mais comumente analisadas em estudos ecológicos. O $\delta^{15}\text{N}$ é fracionado metabolicamente, com o ^{15}N sendo preferencialmente retido e o ^{14}N excretado, causando um enriquecimento (aumento do isótopo mais pesado, i.e. aumento do δ) geralmente entre 2 e 5‰ do consumidor em relação ao seu alimento (e.g. Figura 5). Com isto, há um progressivo enriquecimento de ^{15}N com um aumento na cadeia alimentar, tornando o $\delta^{15}\text{N}$ um indicador útil do nível trófico de um animal (e.g. Peterson & Fry 1987, Post 2002). Por outro lado, razões entre isótopos do carbono podem ser usadas como indicativos do habitat de um animal, com enriquecimento tipicamente entre 0 a 1‰ da presa ao predador. Em sistemas marinhos, há variação do $\delta^{13}\text{C}$ entre teias alimentares costeiras e pelágicas, com a anterior apresentando maiores valores de $\delta^{13}\text{C}$ (e.g. Rubenstein & Hobson 2004, Hobson et al. 2010). O $\delta^{13}\text{C}$ de um animal marinho pode indicar também a latitude da cadeia trófica da qual fazia parte, uma vez que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ do fitoplâncton tendem a ser mais

depletos (diminuição do isótopo mais pesado, i.e. diminuição do δ) em altas latitudes do que próximo ao equador (Goericke & Fry 1994) (e.g. Figura 6). Acredita-se que este maior $\delta^{13}\text{C}$ em locais costeiros e de baixa latitude ocorra devido à menor turbulência destas áreas, o que levaria a uma camada limite mais larga e estagnada do fitoplâncton, aumentando a resistência à difusão do causando maior assimilação do ^{13}C (France 1995). Deste modo, os valores de isótopos de nitrogênio e carbono são geralmente analisados conjuntamente para a obtenção de informações sobre a ecologia trófica e distribuição espacial dos organismos.

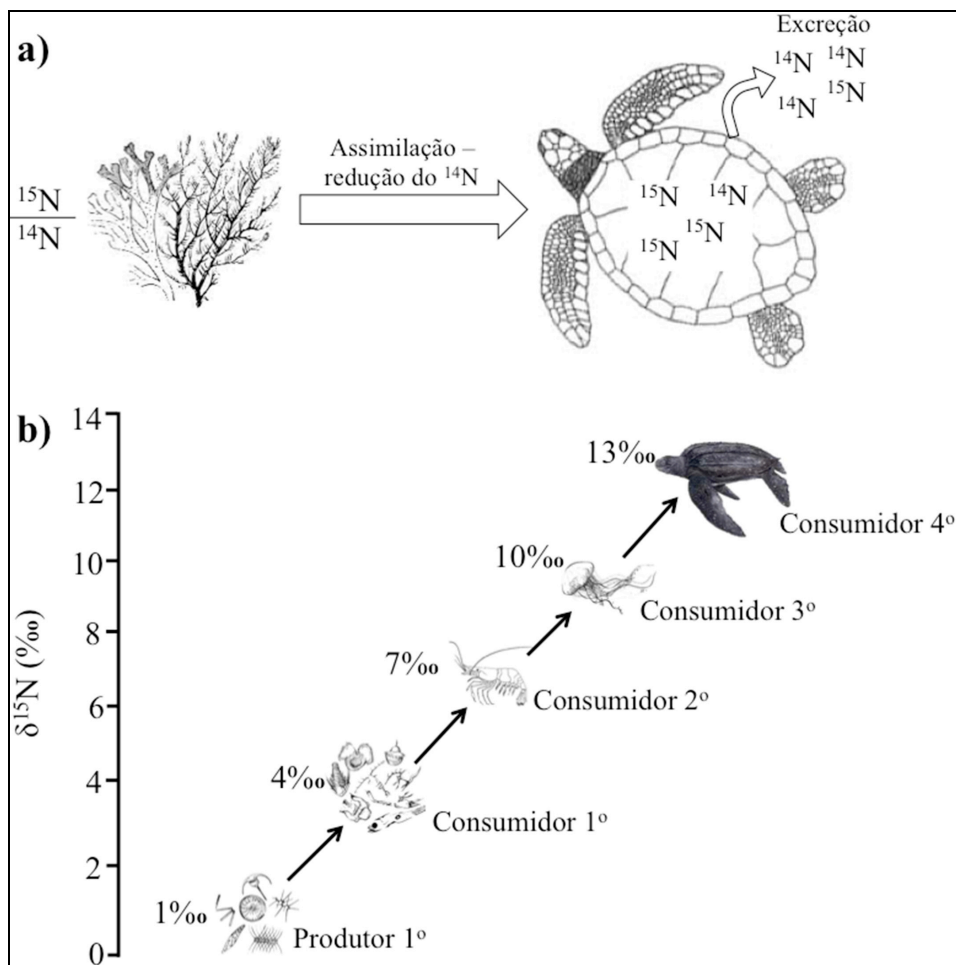


Figura 5. Modelo de enriquecimento de ^{15}N em tartarugas marinhas. a) apresentação conceitual da retenção do isótopo pesado ^{15}N e maior taxa de excreção do isótopo leve ^{14}N durante a digestão/excreção de uma tartaruga-verde; b) modelo de progressivo enriquecimento do ^{15}N ao longo da cadeia trófica da tartaruga-de-couro (adaptado do livro “The Biology of Sea Turtles, Vol. III”).

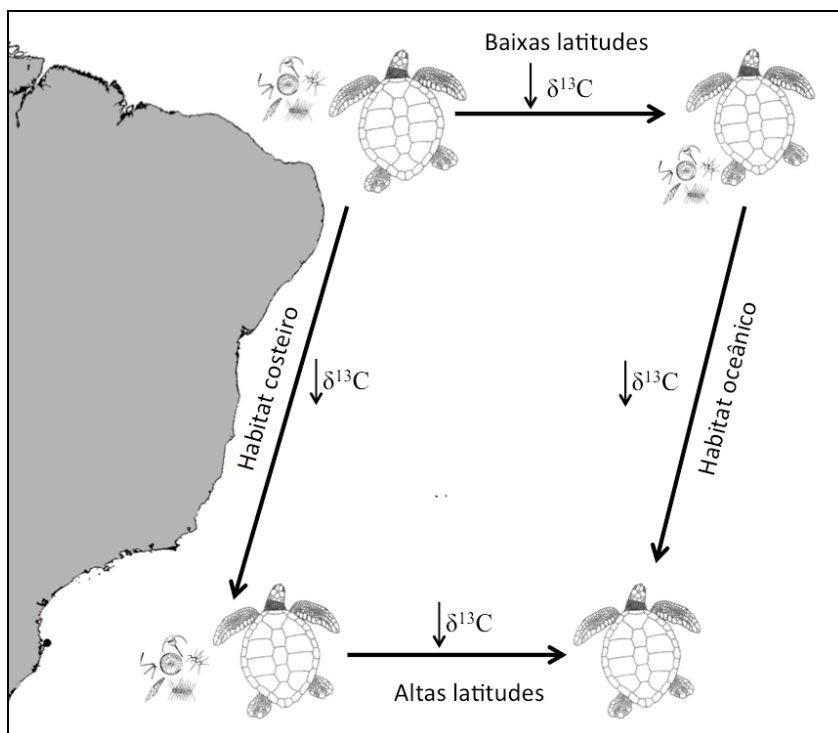


Figura 6. Modelo de variação do $\delta^{13}\text{C}$ em tartarugas marinhas de acordo com o tipo de habitat. Tartarugas em baixas latitudes e ambientes costeiros terão $\delta^{13}\text{C}$ mais elevado devido ao maior $\delta^{13}\text{C}$ dos produtores primários; tartarugas em altas latitudes e ambientes oceânicos terão $\delta^{13}\text{C}$ mais baixos devido ao menor $\delta^{13}\text{C}$ dos produtores primários.

Os valores de discriminação de IE – i.e. diferença de composição isotópica entre a dieta e os tecidos – variam de acordo com a espécie, idade e tipo de tecido analisado. Para tartarugas marinhas, esta discriminação já foi determinada para estudos de alguns tecidos de tartarugas-verdes, cabeçudas e de couro (Seminoff et al. 2006). O tempo de residência do isótopo (“turnover”) em um determinado tecido, i.e. o tempo que leva para um sinal anterior ser completamente substituído pelo sinal novo da dieta, também é uma questão importante na análise de isótopos estáveis (Peterson & Fry 1987, Hobson 1999). Tecidos com maior metabolismo/taxa de renovação, como fígado ou plasma, refletem a dieta recente (dias/semanas), enquanto tecidos com menor metabolismo/renovação, como epiderme, penas e carapaça, refletem períodos mais prolongados da dieta (meses/anos) (Hobson 1999). Deste modo, a análise de IE pode fornecer informação integrada de dietas de períodos maiores que estudos tradicionais. Isto é especialmente útil para organismos migratórios, uma vez que podem reter informações sobre habitats previamente ocupados e permitir inferência sobre suas migrações e origens.

1.3.6.2. Estudos de dieta, ciclo de vida e origens de tartarugas marinhas

Estudos de dieta de tartarugas marinhas baseiam-se principalmente em observações diretas, conteúdo estomacal/esofágico e material fecal (Bjorndal et al., 1991; Burke et al., 1994; León & Bjorndal, 2002; Reisser et al., 2013). No entanto, este tipo de análise só representa a alimentação recente dos animais, e também pode subestimar alimentos de digestão rápida. Com isso, razões entre IE do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) tem sido determinadas nos tecidos de diversas espécies de tartarugas marinhas. Análises de IE já foram utilizadas no estudo da dieta de tartarugas-cabeçudas na costa da Carolina do Norte, E.U.A. (Wallace et al. 2009) e oeste do Mediterrâneo (Revelles et al. 2007); tartarugas-verdes na Califórnia, E.U.A. (Lemons et al. 2011), leste da Austrália (Boyle 2006, Arthur et al. 2009), Japão (Hatase et al. 2006), e Mauritânia (Cardona et al. 2009); tartarugas-de-pente no Havaí (Graham et al. 2009) e Bahamas (Bjorndal & Bolten 2010); e tartarugas-de-couro na costa leste dos E.U.A. (Dodge et al. 2011). Estes trabalhos exploram a relação de IE entre presa/predador, e diferenças entre tecidos analisados, regiões geográficas e classes de tamanhos. Em alguns casos, estudos revelaram questões inéditas sobre os hábitos alimentares dos animais. Por exemplo, tartarugas-verdes não necessariamente se encaixam no padrão comumente aceito de serem neríticas e herbívoras após o recrutamento. Análises de IE revelaram que esta espécie pode apresentar maior onivoria e ocupar habitats oceânicos mesmo após atingirem a fase adulta (Hatase et al. 2006, Arthur et al. 2009, Cardona et al. 2009). Isótopos estáveis também evidenciaram maior dependência de habitats de fanerógamas por tartarugas-de-pente do que se acreditava anteriormente, possivelmente devido ao declínio na qualidade e quantidade de recifes de coral nos oceanos (Bjorndal & Bolten 2010).

A análise de IE também tem permitido um melhor entendimento das mudanças ontogenéticas de dieta e uso de habitat destes animais. Por exemplo, a mudança de habitat que ocorre após a fase pelágica de tartarugas-verdes juvenis é acompanhada de uma alteração do seu habito alimentar, passando de uma dieta onívora neustônica a uma predominantemente herbívora composta por macroalgas, fanerógamas e folhas de mangue (Bjorndal et al. 1991). Reich et al. (2007), Arthur et al. (2008) e Cardona et al. (2009) demonstraram esta mudança ontogenética através de análise de IE na epiderme e carapaça de tartarugas-verdes, com animais menores e tecidos mais antigos (representando fases mais iniciais dos animais, i.e. seu passado) apresentando maior $\delta^{15}\text{N}$ e menor $\delta^{13}\text{C}$ do que

animais maiores e tecidos mais recentes (representando fases atuais dos animais, i.e. seu presente). McClellan et al. (2010) demonstraram que tartarugas-cabeçudas carnívoras apresentam dicotomia na sua estratégia alimentar de acordo com o ambiente, com animais neríticos apresentando maiores valores de $\delta^{15}\text{N}$ do que animais oceânicos. Vander Zanden et al. (2010) também observaram um comportamento alimentar bimodal para esta espécie.

Além da importância para determinação de dieta, nível trófico e comportamento alimentar de tartarugas marinhas, assinaturas regionais de IE (“isoscapes”, Hobson et al. 2010) podem fornecer informações de migrações e origens de animais. Allen et al. (2013) determinaram as origens de tartarugas-cabeçudas capturadas em redes de deriva no Pacífico leste comparando o $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ de indivíduos de diferentes locais no Pacífico. Três principais áreas de alimentação de tartarugas-cabeçudas pós-desova da Florida foram identificadas por Ceriani et al. (2012) via rastreamento por satélite e análise de isótopos de N e C. Zbinden et al. (2011) e Seminoff et al. (2012) avaliaram as migrações de tartarugas-cabeçudas e de couro através de rastreamento por satélite e isótopos estáveis respectivamente, e encontraram padrões de migrações semelhantes com as duas metodologias. López-Castro et al. (2013) analisaram razões de isótopos de carbono e nitrogênio na carapaça de tartarugas-verdes para caracterizar seis áreas de alimentação da fase oceânica, determinando significativa estruturação isotópica entre áreas. Assinaturas regionais de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ podem inclusive serem utilizadas para identificação forense da origem de produtos de tartarugas-de-pente comercializados ilegalmente (Ishibashi et al. 2000). Deste modo, o uso de isótopos estáveis como uma ferramenta adicional para o entendimento das ligações entre regiões e populações de tartarugas marinhas apresenta grande potencial.

1.4. Objetivos da tese

Como explanada ao longo deste capítulo, o entendimento da ecologia, migrações, populações, e ciclo de vida das tartarugas-de-pente é uma tarefa complexa, porém essencial para orientar estratégias para sua conservação. Nesta tese, foram realizadas análises da região controle do DNA mitocondrial (mtDNA), de correntes superficiais oceânicas (boias de deriva e modelagem biofísica), e de isótopos estáveis do carbono e nitrogênio de tartarugas-de-pente (*Eretmochelys imbricata*) imaturas em águas brasileiras, com o objetivo de:

- Avaliar diversidade genética, estrutura populacional e origens natais das tartarugas-de-pente imaturas em águas brasileiras;
- Verificar a ocorrência de indivíduos imaturos híbridos de *Eretmochelys imbricata* x *Caretta caretta* na costa;
- Detectar mudanças ontogenéticas de habitat e dieta nos tecidos de tartarugas-de-pente.

Capítulo 2. Tartarugas-de-pente imaturas na costa brasileira

Artigo 1: “Immature hawksbill turtles feeding in Brazilian islands”, publicada na *Marine Turtle Newsletter* em outubro de 2012.

2.1. Introdução

O litoral brasileiro abriga as duas maiores áreas de desova de tartarugas-de-pente do Atlântico sul: o litoral da Bahia (Marcovaldi et al. 2007) e a Praia de Pipa, RN (Santos et al. 2013). Estas áreas de desova são monitoradas pelo Projeto Tamar ICMBio, sendo foco de diversos estudos reprodutivos, genéticos e comportamentais dos animais. Por outro lado, pouco se sabe sobre a ecologia de tartarugas-de-pente imaturas na costa, com estudos restritos às ilhas oceânicas de Fernando de Noronha e Atol das Rocas (Bellini 1996, Marcovaldi et al. 2000, Vilaça et al. 2013).

No artigo apresentado neste capítulo, foram estudadas tartarugas-de-pente imaturas em três locais de alta diversidade no litoral brasileiro: o Arquipélago de São Pedro e São Paulo, o Parque Nacional Marinho de Abrolhos e a Reserva Biológica Marinha do Arvoredo. O Arquipélago de São Pedro e São Paulo (SPSP) localiza-se a mais de 1000km da costa do Rio Grande do Norte, e é composto por ilhas rochosas oceânicas de alta profundidade que agregam grande diversidade e quantidade de animais marinhos (Hazin et al. 2009). O Parque Nacional Marinho de Abrolhos está localizado a aproximadamente 70km da costa da Bahia, e seus rasos recifes coralíneos abrigam uma das maiores diversidades do litoral brasileiro (Werner et al. 2000). A Ilha do Arvoredo, próxima à costa de Santa Catarina, é a maior ilha da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo e seus recifes rochosos temperados já foram caracterizados como uma importante área de alimentação de tartarugas-verdes (Reisser et al. 2013) (ver Figura 7 para localização das áreas).

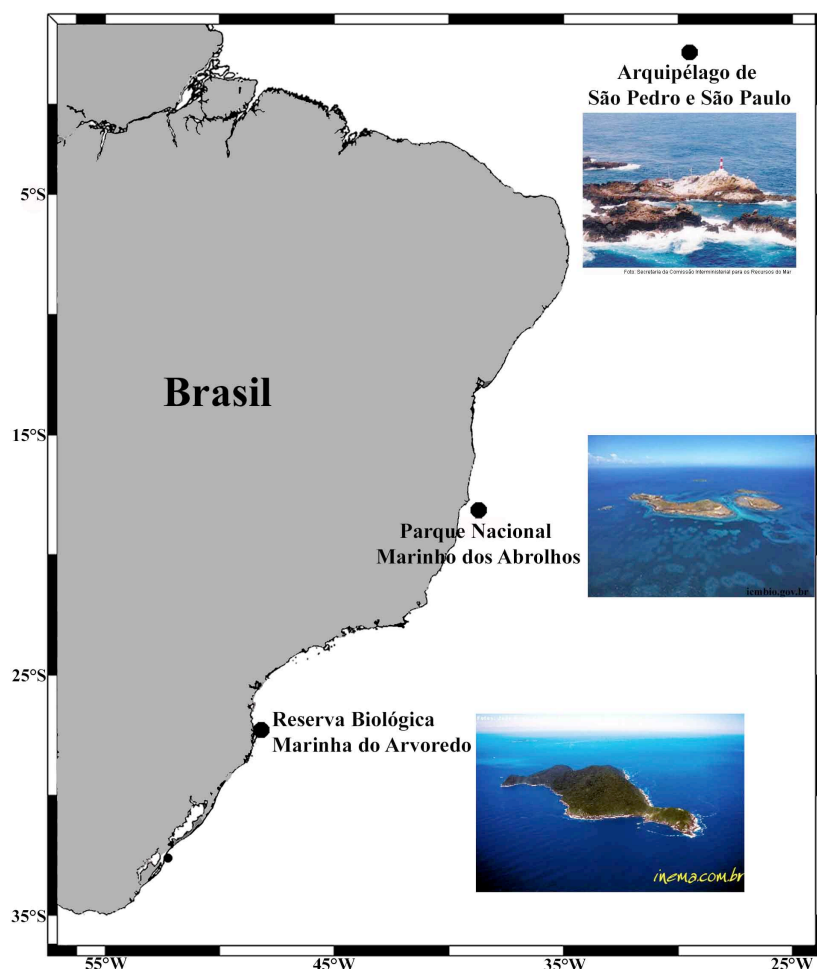


Figura 7. Localização e imagens aéreas dos locais de estudo na costa brasileira.

2.2. Metodologia

Mergulhos em apneia e com cilindro foram realizados nas áreas para observação subaquática e captura de tartarugas marinhas. Para cada observação foram registradas: data, hora, local do mergulho, substrato, tamanho aproximado de carapaça, comportamento (natação, alimentação, descanso no fundo, descanso assistido no fundo – tartaruga descansando embaixo de qualquer estrutura – e associações com peixes recifais, e outras características relevantes (adaptado de Houghton et al. 2003). Os comportamentos e perfis faciais dos animais eram fotografados sempre que possível. Quando praticável, as tartarugas eram capturadas após a avistagem. Animais capturados eram marcados (marcas de Inconel fornecidas pelo Projeto Tamar ICMBio), pesados, medidos (comprimento curvilíneo de carapaça – CCC), foto-identificados (Reisser et al. 2008), e amostras de epiderme e carapaça eram coletadas para análises genéticas e isotópicas (ver metodologia

de campo na Figura 8). Após estes procedimentos, as tartarugas eram imediatamente liberadas próximo ao local de sua captura.

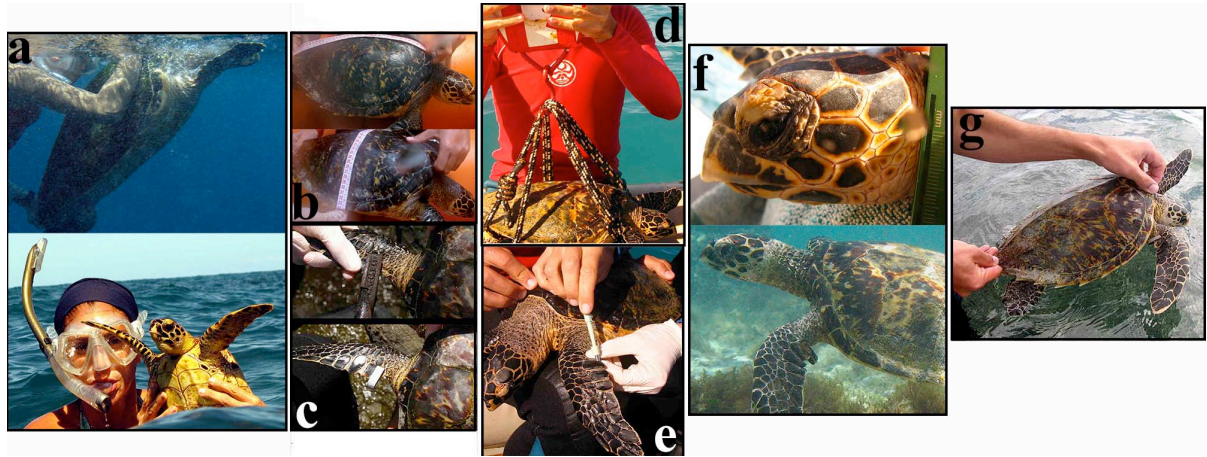


Figura 8. Metodologia em campo: a) captura; b) medição de comprimento e largura de carapaça; c) marcação; d) pesagem; e) coleta de tecido; f) foto-identificação por perfil lateral da cabeça; g) liberação do animal.

2.3. Síntese dos resultados

Em um total de 80.1 horas de mergulho conduzidas no Parque Marinho dos Abrolhos, foram feitas 162 avistagens subaquáticas (2 avistagens/hora de mergulho) e 65 capturas individuais de tartarugas-de-pente. Em SPSP foram realizadas 29.2 horas de mergulho, 73 avistagens (2.5 avistagens/hora) e 12 capturas individuais. Na Ilha do Arvoredo, em 235 horas de mergulho, foram feitas 22 observações (0.1 avistagens/hora) e 6 capturas de tartarugas-de-pente. O tamanho das tartarugas capturadas variou de 24.5 a 63.0 cm CCC em Abrolhos (média = 37.9 cm), de 30 a 75 cm em SPSP (média = 53.7 cm), e de 30 a 59.5 cm (média = 41.3 cm) na Ilha do Arvoredo. Tamanhos médios de SPSP foram significativamente maiores em relação às outras duas áreas (teste-*t* de Student, $p < 0.05$). Já os tamanhos médios das tartarugas em Abrolhos e Arvoredo não diferiram significativamente entre si (teste-*t* de Student, $p > 0.05$). Devido à elevada abundância de tartarugas-de-pente pequenas no Parque de Abrolhos, acredita-se que esta possa ser uma importante área de recrutamento desta espécie na costa brasileira. Por outro lado, foram observadas classes de tamanho relativamente grandes em SPSP, indicando que esta área é importante para a alimentação de indivíduos maiores, possivelmente devido à sua proximidade com a região caribenha, onde se localiza a maioria das áreas de desova do Oceano Atlântico (SWOT 2007).

Tartarugas-de-pente foram observadas se alimentando em 28.9% (n = 71) das observações, geralmente em áreas recifais rasas (profundidades menores que 4 m) em Abrolhos e no Arvoredo, e em maiores profundidades em SPSP (mais de 8 m). Houve registro de alimentação em todas as horas amostradas (de 0600 às 1900 horas). Os animais aparentemente procuravam seu alimento enquanto nadavam devagar e próximos ao recife ou rochas. Em todas as observações, os animais selecionavam animais bentônicos incrustantes em especial zoantídeos (*Zoanthus sociatus* e *Palythoa caribaeorum*) e ocasionalmente esponjas.

Comportamento de descanso (20.3% das observações, n = 50) também foi observado ao longo de todo o dia em áreas mais profundas. As tartarugas estavam geralmente descansando a mais de 4m em Abrolhos e no Arvoredo, e a mais de 10 m em SPSP. Em 70% (n = 35) dos registros de descanso as tartarugas escolheram locais debaixo de pedras, demonstrando uma preferência por descanso assistido.

A frequência de outros comportamentos foi de 48% (n = 118) para natação e 2.8% (n = 7) para atividades associadas a peixes de recife. Foi registrada a limpeza do casco ou pescoço de tartarugas-de-pente por três diferentes espécies de peixes: o peixe limpador neon (*Elacatinus figaro*), em quatro ocasiões; a donzelinha endêmica *Stegastes sanctipauli*, em duas ocasiões; e um juvenil de peixe frade (*Pomacantus paru*), em uma ocasião. Este tipo de associação já foi registrada para diversas espécies de peixe, incluindo *P. paru* (Sazima et al. 2010), mas é o primeiro registro para as espécies *E. figaro* e *S. sanctipauli*.

Através do registro fotográfico de perfis faciais foi possível foto-identificar 31 indivíduos em 52 ocasiões durante mergulhos, demonstrando o potencial da foto-id na condução de estudos populacionais não-intrusivos. Intervalos entre a captura inicial de indivíduos e sua recaptura (através de foto-id ou nova captura manual) variaram de 1 a 242 dias em SPSP, 1 a 297 dias em Abrolhos, e 367 a 671 no Arvoredo, indicando fidelidade, ao menos de curto prazo, a estes locais.

2.4. Conclusões

O Parque Nacional Marinho dos Abrolhos e o Arquipélago de São Pedro e São Paulo são importantes áreas de desenvolvimento para as tartarugas-de-pente, que se alimentam principalmente de zoantídeos nestes locais. O Parque dos Abrolhos é uma

possível região de recrutamento da espécie na costa brasileira, enquanto no SPSP há ocorrência de animais maiores possivelmente devido à proximidade com o Caribe. Os animais apresentam certa fidelidade a estes locais. Estas duas áreas devem ser consideradas prioritárias para a conservação e a recuperação desta espécie na costa brasileira. A Reserva Biológica Marinha do Arvoredo apresenta pouca ocorrência de tartarugas-de-pente, porém é notável a permanência de um indivíduo desta espécie tropical por quase dois anos na região, uma vez que no inverno as águas podem atingir temperaturas abaixo de 13°C. Nas três regiões, as tartarugas-de-pente se associam com peixes recifais, incluindo uma espécie já conhecida por se alimentar de incrustações em tartarugas, e duas espécies sem registro deste tipo de relação.

Capítulo 3. Ocorrência de híbridos imaturos de tartarugas-de-pente x tartarugas-cabeçudas na costa brasileira

Artigo 2: “Hawksbill x loggerhead sea turtle hybrids at Bahia, Brazil: where do their offspring go?”, em revisão na revista *Peer J*.

3.1. Introdução

A hibridização pode ter efeitos positivos, contribuindo para a evolução de táxons (Barton 2001), ou negativos levando a menor aptidão, fertilidade e até extinção genética de espécies (Rhymer & Simberloff 1996). No ambiente marinho, a hibridização já foi descrita para diversos organismos incluindo corais (Willis et al. 2006), mexilhões (Rawson et al. 1999), peixes (Hubbs 2013), cetáceos (Yazdi 2002, Glover et al. 2013), pinípedes (Kovacs 1997) e tartarugas (Karl et al. 1995). Hibridização natural entre espécies de tartarugas marinhas da família Cheloniidae foi relatada para a tartaruga-verde *Chelonia mydas* x tartaruga-de-pente *Eretmochelys imbricata*, cabeçuda *Caretta caretta* x de pente, verde x cabeçuda, cabeçuda x oliva *Lepidochelys olivacea*, e oliva x de pente (Wood et al. 1983, Conceição et al. 1990, Karl et al. 1995, Seminoff et al. 2003, James et al. 2004, Lara-Ruiz et al. 2006, Reis et al. 2010, Vilaça et al. 2012). A possível esterilidade e menor aptidão destes híbridos é preocupante, porém as causas e consequências exatas desta hibridização não são bem compreendidas.

Como comentado no Capítulo 1, no Brasil os grupos reprodutivos de tartarugas-de-pente e cabeçudas apresentam taxas de hibridização excepcionalmente altas (Lara-Ruiz et al. 2006). As maiores áreas de desova de ambas espécies se sobrepõem ao longo da costa da Bahia, com aproximadamente 420 tartarugas-de-pente e 1240 cabeçudas desovando em cada temporada (Marcovaldi & Chaloupka 2007, Marcovaldi et al. 2007). A sobreposição é também temporal, com tartarugas-cabeçudas desovando de setembro a fevereiro e tartarugas-de-pente de novembro a março (Marcovaldi & Chaloupka 2007, Marcovaldi et al. 2007). Foi demonstrado que 42% de tartarugas fêmeas com morfologia de tartarugas-de-pente apresentavam os haplótipos de mtDNA BR3 e BR4, típicos de tartarugas-cabeçudas (Lara-Ruiz et al. 2006). Como o mtDNA é herdado maternalmente, a primeira geração (F1) destes híbridos é o cruzamento de tartarugas-cabeçudas fêmeas e de pente machos; isto pode indicar um viés de gênero, uma vez que nenhum animal híbrido com mtDNA de tartaruga-de-pente foi encontrado (Vilaça & Santos 2013). Este viés tem sido

atribuído ao maior tamanho da população de tartarugas-cabeçudas, e à sobreposição temporal das duas espécies. Como a temporada de tartarugas-de-pente se inicia próximo ao pico de desova de cabeçudas (novembro-dezembro), tartarugas-de-pente machos encontram grande número de fêmeas de ambas espécies para a cópula. Por outro lado, quando as tartarugas-de-pente fêmeas chegam em maiores números na área, machos de tartarugas-cabeçudas já copularam e deixaram o local (Vilaça et al. 2012) (Figura 9). As fêmeas híbridas são reprodutivamente viáveis e produzem filhotes, possivelmente devido a um processo contínuo de introgressão (Lara-Ruiz et al. 2006, Vilaça et al. 2012).

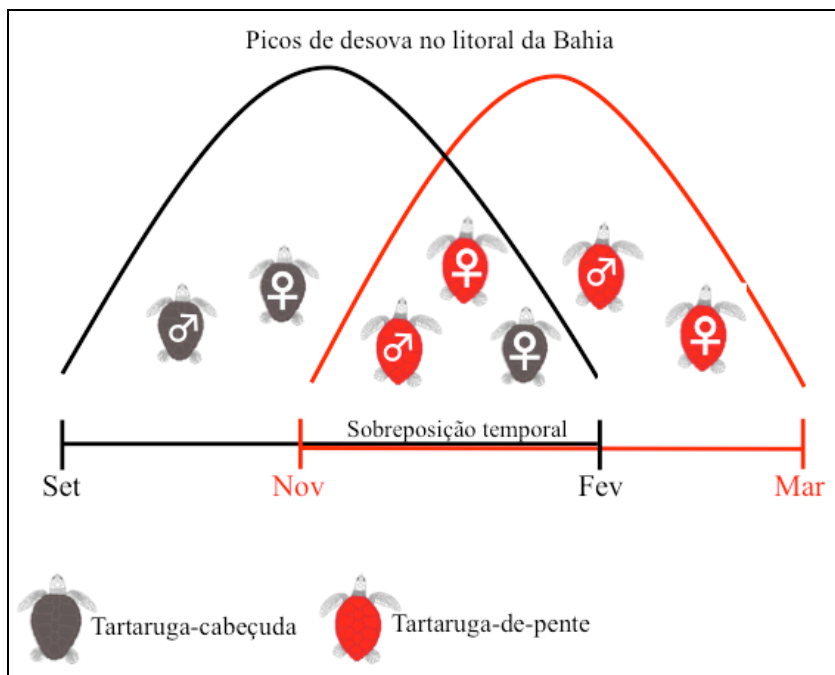


Figura 9. Picos de desova de tartarugas-cabeçudas (curva preta) e tartarugas-de-pente (curva vermelha) no litoral da Bahia, ilustrando a sobreposição temporal entre as espécies.

Após o nascimento, tartarugas-de-pente passam por uma fase de dispersão epipelágica seguida por recrutamento a uma área tropical costeira (Bolten 2003), onde se alimentam de organismos bentônicos incrustantes (León & Bjørndal 2002, Proietti et al. 2012). Tartarugas-cabeçudas também passam por uma fase inicial de dispersão mas possuem maior distribuição latitudinal, recrutando às áreas costeiras ou oceânicas de zonas tropicais a temperadas, onde se alimentam de crustáceos, moluscos e peixes (Davenport 1997, Witzell 2002). No Brasil, a distribuição de tartarugas-cabeçudas imaturas na costa não é bem conhecida, mas esta espécie é frequente em águas temperadas da plataforma continental do Rio Grande do Sul e na Elevação do Rio Grande, um monte submarino localizado a aproximadamente 800 km da costa (Bugoni et al. 2003, Monteiro et al. 2006,

Sales et al. 2008). Áreas de alta ocorrência de tartarugas-de-pente incluem as ilhas oceânicas do Atol das Rocas, Fernando de Noronha e São Pedro e São Paulo, e as ilhas costeiras do Parque Nacional Marinho dos Abrolhos (Marcovaldi et al. 1998, Proietti et al. 2012). A caracterização genética de tartarugas-de-pente nestas áreas até hoje foi realizada somente para o Atol das Rocas e Fernando de Noronha, e somente um indivíduo híbrido de tartarugas-de-pente x cabeçuda, retrocruzado com uma tartaruga-de-pente (i.e. híbrido de geração >F1) foi encontrado. No entanto, este animal provavelmente se originou do oeste da África, uma vez que apresentava um haplótipo de mtDNA típico de tartarugas-de-pente da área de desova de São Tomé e Príncipe (Monzón-Argüello et al. 2011). Portanto, apesar da elevada taxa de hibridização entre estas espécies na Bahia, a dispersão e recrutamento dos filhotes híbridos ainda é um mistério. Isto se deve possivelmente ao fato de ser um fenômeno relativamente recente, calculado como aproximadamente 40 anos (Lara-Ruiz et al. 2006), bem como à limitada investigação em áreas de alimentação de tartarugas-de-pente e cabeçudas.

Um melhor entendimento de como a hibridização afeta a distribuição e ecologia destes animais é fundamental devido à sua elevada ocorrência na costa do Brasil. Neste trabalho, o mtDNA de 157 tartarugas imaturas com características morfológicas de tartarugas-de-pente, em locais de ocorrência alta e ocasional desta espécie na costa do Brasil, foi caracterizado. Pela primeira vez é reportada a ocorrência de tartarugas-de-pente x cabeçudas imaturas em águas brasileiras. Além disso, foi inferida a dispersão de filhotes nascidos na área de desova da Bahia, através da análise de modelos de trajetórias de partículas. Por fim, as implicações deste fenômeno para a conservação das espécies é discutida.

3.2. Metodologia

Foi caracterizada a região controle do mtDNA de 157 tartarugas imaturas, morfolologicamente identificadas como tartarugas-de-pente, de três áreas de alimentação importantes para esta espécie na costa brasileira: o Arquipélago de São Pedro e São Paulo (SPSP; $n = 12$); o litoral da Bahia ($n = 32$); e o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos ($n = 65$). Também foram analisadas amostras de tartarugas-de-pente de três áreas com ocorrência esporádica: a Reserva Biológica Marinha do Arvoredo ($n = 6$); o litoral do Ceará ($n = 23$); e a Praia do Cassino ($n = 19$). Amostras foram coletadas de animais

capturados manualmente através de mergulhos em SPSP, Abrolhos, e Arvoredo, e de indivíduos acidentalmente capturados na pesca ou encalhados nas praias do Ceará, Bahia, e Cassino (Figura 10).

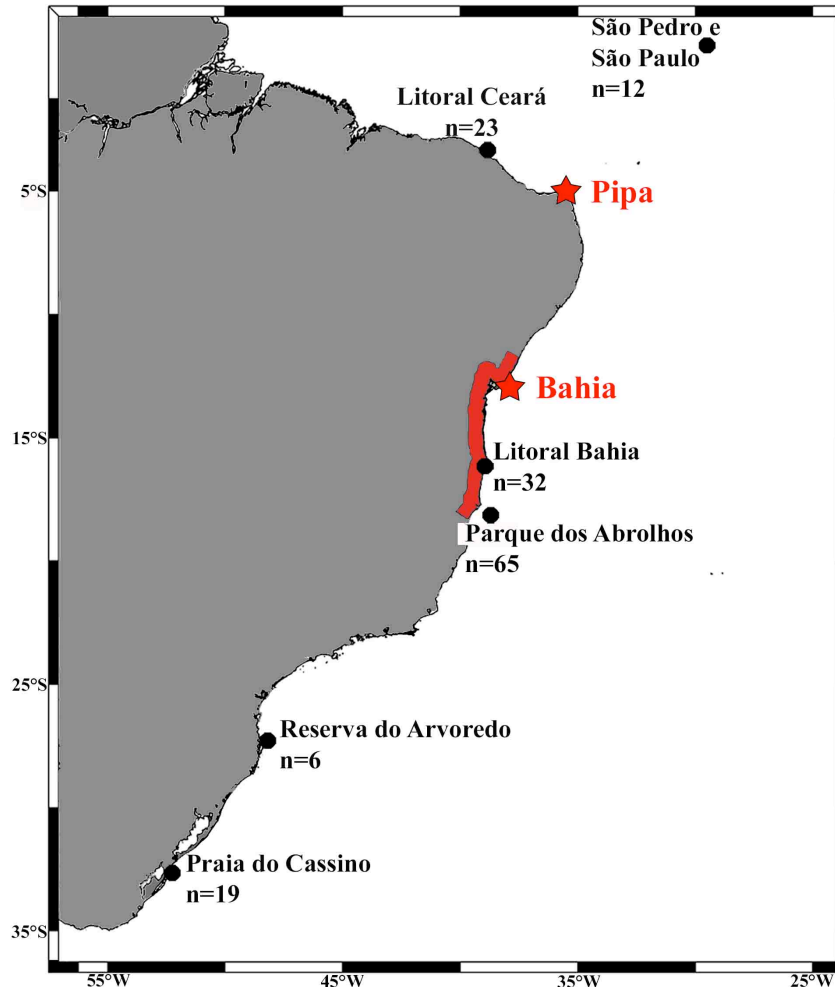


Figura 10. Áreas de estudo e número de amostras deste trabalho (pontos pretos) e principais áreas de desova de tartarugas-de-pente da costa brasileira (estrelas vermelhas). A área em vermelho corresponde à região onde desovas de tartarugas-de-pente e cabeçudas se sobrepõem.

Amostras de tecido foram maceradas e mantidas em tampão de lise contendo Proteinase K em estufa a 37°C até sua completa digestão. DNA foi extraído usando kits de extração (Norgen Biotek) ou método fenol:clorofórmio adaptado de Hillis et al. (1996). Fragmentos de aproximadamente 850 pb da região controle do mtDNA foram amplificados via reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) usando os primer LCM15382/H950 (Abreu-Grobois et al. 2006), nas seguintes condições: desnaturação de 5' a 94°C; 36 ciclos de 30'' a 94°C, 30'' a 50°C, 1' a 72°C; extensão final de 10' a 72°C. Kits de purificação (Illustra GFX – GE Healthcare) foram usados para purificar os produtos da PCR, e cada amostra foi sequenciada em ambas as direções através de

eletroforese capilar (Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer). Sequências foram alinhadas, cortadas a 740pb usando o programa Clustal X 2.0 (Larkin et al. 2007), e classificadas de acordo com o GenBank® e o banco de dados de haplótipos de tartarugas-de-pente do Oceano Atlântico (A. Abreu-Gobrois, com. pess.).

Modelagem biofísica foi efetuada usando a ferramenta para rastreamento de partículas ICHTHYOP-3.2 (<http://www.previmar.org/en/ichthyop>), com metodologia do modelo descrita em Lett et al. (2008). Campos de velocidade superficial foram extraídos do modelo global HYbrid Coordinate Ocean Model (HyCOM) com reanálises das saídas de 1/12° em intervalos diários (<http://hycom.org>). Para simular a advecção Lagrangiana de partículas individuais foi usado o esquema numérico de quarta ordem Runge-Kutta no ICHTHYOP-3.2. As posições das partículas virtuais foram calculadas a cada 180 s (*timestep*) e salvas (*output*) a cada 24 h. Partículas foram liberadas a cada cinco dias da área de desova da Bahia (12-13° S, 37-38° W), de modo proporcional ao número mensal de nascimentos de tartarugas-cabeçudas, de pente e híbridas. Partículas foram rastreadas por três anos (entre maio de 2009 e junho de 2013) para abranger a fase oceânica destas tartarugas, de acordo com Putman & He (2013).

A proporção mensal de desovas de tartarugas-cabeçudas e morfologicamente “de pente” (incluindo animais puros e híbridos) foi obtida de Marcovaldi et al. (1999) e Marcovaldi & Chaloupka (2007). O número mensal de desovas de animais morfologicamente identificados como tartarugas-de-pente (Marcovaldi et al. 1999) foi multiplicado pela porcentagem mensal de tartarugas puras ou híbridas, determinada através de análise genética (Lara-Ruiz et al. 2006; L. Soares, dados não publicados). O período de nascimento de tartarugas-cabeçudas, de pente e híbridas foi então calculado somando 60 dias (período aproximado de incubação; Marcovaldi et al. 1997, Godfrey et al. 1999) aos períodos de desova estimados. Finalmente, foi analisada a proporção de partículas que dispersou na direção norte e sul.

3.3. Síntese dos resultados

Dos 157 animais amostrados na costa, quatro eram híbridos de tartarugas-de-pente x tartarugas-cabeçudas. Estes híbridos apresentavam morfologia predominante de tartarugas-de-pente puras e foram identificados como esta espécie, porém seu haplótipos do mtDNA eram característicos de tartarugas-cabeçudas (BR3). O BR3 é um dos dois

haplótipos mais comuns de cabeçudas da área de desova da Bahia (Lara-Ruiz et al. 2006), e foi identificado em uma das 23 amostras do Ceará, no nordeste, e em três de 19 amostras da Praia do Cassino, no extremo sul. No Cassino, um híbrido apresentava carapaça com escudos sobrepostos e laterais serrilhadas, característico de tartarugas-de-pente, mas um pescoço curto e grosso típico de cabeçudas.

Uma grande proporção de partículas dispersou para o sul quando liberadas durante o pico de nascimento de tartarugas-cabeçudas (72%; dezembro – março), alcançando as águas temperadas do Atlântico Sul Ocidental através da Corrente do Brasil. Partículas liberadas durante o pico de nascimento de animais híbridos (janeiro – abril) demonstraram um movimento maior na direção sul (44%) quando comparadas ao pico de tartarugas-de-pente (37%; fevereiro – maio). Dispersão para o norte foi maior para partículas liberadas durante a época de pico de tartarugas-de-pente (63%), seguida por híbridas (56%), e por fim tartarugas-cabeçudas (26%).

3.4. Conclusões

Neste trabalho, são reportados pela primeira vez os destinos de tartarugas híbridas nascidas na Bahia. Animais imaturos híbridos foram observados em áreas incomuns para tartarugas-de-pente, estando ausentes em áreas de elevada ocorrência como Fernando de Noronha e Abrolhos (presente estudo, Vilaça et al. 2013). Os recifes tropicais de Abrolhos se localizam próximo à área de desova da Bahia (~80 km), mas nenhum híbrido foi detectado apesar do número amostral relativamente grande desta área (n = 65). Isto pode ser uma indicação de que apesar da similaridade morfológica com tartarugas-de-pente, o comportamento dos híbridos não é característico desta espécie. A presença de três animais híbridos na Praia do Cassino, local de baixa ocorrência de tartarugas-de-pente porém comum para tartarugas-cabeçudas, pode ser uma evidência de que os híbridos possam estar adotando a ecologia migratória de tartarugas-cabeçudas. Este tipo de alteração ecológica de animais híbridos também já foi observada por Witzell & Schmid (2003) e Marcovaldi et al. (2012).

As simulações biofísicas demonstraram que a dispersão de filhotes da Bahia varia de acordo com a espécie: dispersão para o sul foi proporcionalmente maior na época de tartarugas-cabeçudas, seguido por híbridas, e menor durante o pico de nascimento de tartarugas-de-pente. Isto demonstra que, em comparação às tartarugas-de-pente puras,

tartarugas híbridas possuem maior chance de atingirem a região temperada do sul do Brasil. Isto pode indicar que os animais híbridos possivelmente adotem características de tartarugas-cabeçudas, a partir do momento que entram no oceano. Embora tartarugas-de-pente puras também produzam filhotes que se dispersam ao sul, estes podem ser limitados a menores latitudes devido à disponibilidade de alimento e temperatura da água, enquanto animais híbridos podem apresentar comportamento mais semelhante às tartarugas-cabeçudas e ter uma distribuição mais ampla.

As causas desta elevada taxa de hibridização entre tartarugas-de-pente e cabeçudas na área de desova da Bahia ainda não são claras, mas podem estar relacionadas aos declínios populacionais devido às ações antrópicas e tamanhos populacionais desiguais entre espécies (Lara-Ruiz et al. 2006, Vilaça et al. 2012). Não se sabe se esta hibridização representa uma ameaça a estes animais, e o fenômeno deve ser melhor investigado para definir se medidas especiais de manejo devem ser adotadas para a conservação destas populações. Colaboração internacional pode ser necessária para esta definição, uma vez que o modelo de partículas demonstra a possibilidade de transporte de filhotes híbridos da Bahia para áreas mais distantes como Uruguai, Argentina, costa Oeste da África, e Oceano Índico Ocidental. Maiores estudos genéticos são necessários em áreas de reconhecida e potencial ocorrência de híbridos, como por exemplo habitats de tartarugas-cabeçudas. Estes estudos devem combinar o uso de mtDNA com marcadores herdados biparentalmente para um melhor entendimento da distribuição, espécies parentais e gerações. Estudos sobre parâmetros reprodutivos e sobrevivência destes animais também são essenciais para avaliar potenciais impactos negativos deste processo. Rastreamento por satélite, isótopos estáveis e análise de dieta também podem ser usados para confirmar se seus movimentos e hábitos seguem um padrão específico, e consequentemente guiar as estratégias de conservação destas populações de tartarugas marinhas.

Capítulo 4. Estrutura genética e origens de tartarugas-de-pente em áreas de alimentação na costa brasileira

Artigo 3: “Genetic structure and natal origins of immature hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in Brazilian waters”, aceito com revisões menores na *Plos One*.

4.1. Introdução

O entendimento da conexão entre populações de tartarugas marinhas, assim como a dispersão destes animais de suas áreas natais até áreas de alimentação, é uma tarefa desafiadora porém essencial para a determinação de prioridades e definição de estratégias de conservação (Awise 2007). Neste contexto, estudos genéticos tem se mostrado fundamentais na obtenção de informações relevantes quanto à conectividade interpopulacional, migrações e origens natais de populações alimentares de tartarugas marinhas (e.g. Bowen et al. 2007, Velez-Zuazo et al. 2008, Blumenthal et al. 2009, Richardson et al. 2009).

Como explicado no Capítulo 1, áreas de alimentação são estoques mistos compostos por indivíduos de diferentes áreas de desova (estoques). O DNA mitocondrial DNA (mtDNA) pode ser utilizado para determinar as conexões entre estas áreas através da Análise de Estoque Misto (MSA), destacando-se a metodologia metapopulacional da MSA “muitos-a-muitos” (Bolker et al. 2007). Acredita-se que fatores como tamanhos populacionais dos estoques e correntes oceânicas influenciem estas conexões, e consequentemente a composição de áreas de alimentação. Abordagens multidisciplinares utilizando informações genéticas e oceanográficas estão sendo aplicadas à inferência da dispersão e conexões entre populações de tartarugas marinhas, fornecendo um cenário mais completo destes aspectos (e.g. Blumenthal et al. 2009, Monzón-Argüello et al. 2010, Proietti et al. 2012, Putman & Naro-Maciel 2013).

O entendimento das trajetórias e origens de animais nas suas fases não-reprodutivas é importante para determinar se impactos como exploração direta, degradação de habitats e captura acidental na pesca podem ser compartilhadas por populações aparentemente independentes, mas que na realidade estão conectadas (Awise 2007). Como ressaltado no Capítulo 1, isto é de especial significância para a tartaruga-de-pente, uma vez que o comércio de casco desta espécie criticamente ameaçada (IUCN 2012) ainda é debatido pela CITES (Mortimer & Donnelly 2008). Visto que o uso direto e/ou outros impactos em

uma área poderá afetar indivíduos de múltiplas áreas de desova/alimentação, efetivas estratégias de conservação ou uso sustentável devem ser baseadas na conectividade entre populações. Este tipo de estudo é prioritário para esta espécie altamente migratória e ameaçada (Hamann et al. 2010).

Importantes áreas de desova e alimentação existem ao longo da costa do Brasil (Bellini 1996, Marcovaldi et al. 2000, 2007, Proietti et al. 2012, Santos et al. 2013), porém as conexões entre elas ainda são pouco conhecidas (Vilaça et al. 2013). Neste trabalho esta lacuna do conhecimento foi diminuída através da caracterização do mtDNA de tartarugas-de-pente imaturas em cinco agregações alimentares brasileiras, com avaliação de estrutura genética e origens natais. Adicionalmente, foi verificada a influência de correntes oceânicas na conectividade entre áreas, através da inferência de origens por dados de boias de deriva superficiais no Oceano Atlântico.

4.2. Metodologia

A metodologia de coleta, campo e laboratório pode ser vista no item 3.1.2. Neste trabalho foram utilizadas as mesmas amostras de tartarugas-de-pente descritas na seção anterior, coletadas em São Pedro e São Paulo (SPSP; $n = 12$); litoral da Bahia ($n = 32$), Parque Nacional Marinho dos Abrolhos ($n = 65$), Reserva Biológica Marinha do Arvoredo ($n = 6$), litoral do Ceará ($n = 23$); e Praia do Cassino ($n = 19$) (ver Figura 8). As áreas do Arvoredo e Cassino foram agrupadas como “Sul do Brasil” ($n = 25$) devido ao pequeno tamanho amostral e distância geográfica das outras áreas. Após a obtenção de sequências da região controle do mtDNA, estas foram alinhadas, cortadas a 740 pb, e classificadas de acordo com haplótipos já descritos. Os fragmentos de 740 pb foram utilizados para as análises entre as populações alimentares do Brasil, mas para comparação com todas as outras áreas de alimentação e desova do Oceano Atlântico, foi necessário cortar os haplótipos até 382 pb (classificação original, Bass et al. 1996). O programa de genética populacional Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010) foi utilizado para verificar diversidades haplotípicas (h) e nucleotídicas (π) das áreas.

A divergência genética entre populações em áreas de alimentação do Atlântico foi verificada através de F -st e ϕ -st, respectivamente, usando apenas frequências haplotípicas e um modelo Tamura-Nei de substituição nucleotídica, como determinado através do programa jModelTest 0.1.1 (Darriba et al. 2012). Além das áreas de estudo, as seguintes

áreas de alimentação foram incluídas na análise genética: (1) Fernando de Noronha/Atol das Rocas, Brasil (referido como Noronha, $n = 94$); (2) Ilha São Tomé, São Tomé e Príncipe ($n = 80$); (3) Ilha Boavista, Cabo Verde ($n = 28$); (4) Ilha Buck, Ilhas Virgens dos Estados Unidos ($n = 69$); (5) Ilha Mona, Porto Rico ($n = 256$); (6) República Dominicana ($n = 90$); (7) Turks e Caicos ($n = 38$); (8) Bahamas ($n = 78$); (9) Cuba ($n = 210$); (10) Ilhas Cayman ($n = 92$); (11) Yucatán, México ($n = 21$); (12) costa do Texas, E.U.A. ($n = 42$); e (13) costa da Florida, E.U.A. ($n = 106$) (Bowen et al. 1996, 2007, Díaz-Fernández et al. 1999, Velez-Zuazo et al. 2008, Blumenthal et al. 2009, Richardson et al. 2009, Monzón-Argüello et al. 2010, Monzón-Argüello et al. 2011, Vilaça et al. 2013, Wood et al. 2013). Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi utilizada para verificar estrutura dentro da bacia oceânica do Atlântico, através do agrupamento de áreas de alimentação brasileiras, africanas, caribenhas e do Golfo do México. Para identificar estrutura populacional entre agrupamentos de áreas brasileiras, estas foram divididas em dois grupos: áreas influenciadas principalmente pelas correntes Sul Equatorial/Norte do Brasil (SPSP, Noronha e Ceará) e aquelas influenciadas pela Corrente do Brasil (Bahia, Abrolhos e Sul do Brasil).

Análise de estoque misto (MSA) “muitos-a-muitos” foi implementada através do pacote “mixstock” no programa R (Bolker et al. 2007, R Core Team 2013) para estimar contribuições de áreas de desova para as áreas de alimentação brasileiras (centrada em áreas de alimentação – “feeding ground-centric”), assim como os destinos de animais nascidos nas áreas de desova do Brasil (centrada em áreas de desova – “rookery-centric”). Para esta análise metapopulacional foram incluídas todas as áreas de alimentação do Atlântico citadas acima (18 áreas, $n = 1361$ indivíduos), e treze áreas de desova ($n = 875$): (1) litoral Bahia/Sergipe (referido como Bahia, $n = 92$); (2) Praia de Pipa (referida como Pipa, $n = 27$); (3) Ilha Príncipe, São Tomé e Príncipe ($n = 20$); (4) Barbados ($n = 84$); (5) Ilha Trois, Guadeloupe ($n = 74$); (6) Baía Jumby, Antigua e Barbuda ($n = 70$); (7) Ilha Buck, Ilhas Virgens dos Estados Unidos ($n = 67$); (8) Ilha Mona, Porto Rico ($n = 93$); (9) Jaragua e Saona, República Dominicana ($n = 48$); (10) Doce Leguas, Cuba ($n = 70$); (11) Tortuguero, Costa Rica ($n = 60$); (12) Pearl Cays, Nicaragua ($n = 95$); (13) Yucatán e Quintana Roo, México ($n = 73$) (Díaz-Fernández et al. 1999, Tröeng et al. 2005, Lara-Ruiz et al. 2006, Bowen et al. 2007, Velez-Zuazo et al. 2008, Browne et al. 2010, Monzón-Argüello et al. 2011, Leroux et al. 2012, Carreras et al. 2013). O tamanho populacional

(número estimado de fêmeas por temporada reprodutiva) de cada área de desova foram incluídos na MSA como uma covariável ecológica, como descrito por Bolker et al. (2007). Uma Cadeia de Markov para simulação de Monte Carlo (MCMC) foi implementada para cada área de desova, com tamanho de cadeia de 20000, e metade da cadeia descartada como “burn-in”. Fatores de convergência de Gelman-Rubin variaram de 1.0 a 1.04 (média 1.02), indicando convergência.

Dados de boias Lagrangianas também foram utilizados para inferir sobre o papel das correntes superficiais oceânicas na dispersão dos filhotes, através da metodologia descrita em Proietti et al. (2012). Para isso, foram obtidos dados de boias disponíveis no Programa Global de Derivadores da NOAA (www.aoml.noaa.gov/envids/gld). Áreas de tamanho 4° x 4° (latitude e longitude) foram delineadas em volta de todas as áreas de desova consideradas na MSA ($n = 13$), e foi contado o número de boias que passaram por estas áreas e chegaram às áreas de alimentação da costa brasileira (boias com menos de três meses de transmissão foram excluídos). Para simplificação, áreas de alimentação com padrões de deriva semelhantes foram agrupadas em regiões-alvo: 1) SPSP; 2) Noronha e Ceará; 3) Bahia, Abrolhos e Sul do Brasil. Com base nestas contagens e as informações de tamanho populacional de áreas de desova (fêmeas por estação), foi calculada a probabilidade de que uma tartaruga de uma região-alvo originou de uma determinada área de desova (i.e. origens natais), em um contexto Bayesiano, seguindo Proietti et al. (2012).

Finalmente, estimativas de origens natais inferidas por MSA e boias de deriva, ambas incorporando o tamanho populacional das áreas de desova, foram comparadas para avaliar a influência de correntes oceânicas na composição de agregações alimentares no Brasil. Para isso, foi feita uma correlação via teste de Mantel e uma regressão linear das proporções logarítmicas entre perfis de origens genéticas e oceanográficas, implementadas com o pacote “vegan” no R (Oksanen et al. 2013, R Core Team 2013).

4.3. Síntese dos resultados

Diversidades haplotípicas (h) das áreas de alimentação do Atlântico variaram de 0.143 ± 0.052 em Príncipe a 0.761 ± 0.035 em Turks e Caicos, com h médio de 0.538 ± 0.050 . Diversidades das áreas alimentares brasileiras variaram de 0.215 ± 0.052 em Abrolhos a 0.644 ± 0.124 em SPSP; h médio foi 0.418 ± 0.088 . Nas áreas de estudo foram encontrados dez haplótipos de 740 pb, com alta ocorrência (quase 80%) do haplótipo A01,

seguido por uma frequência de aproximadamente 8% de A62, e menos de 4% para todos os outros haplótipos. Foi encontrado um haplótipo novo (A92) e quatro sequencias híbridas BR3 (Proietti et al. 2013). Quando considerado apenas o fragmento de 382 pb o número de haplótipos foi reduzido para oito.

Foi detectada significativa estruturação genética entre as áreas de desova e alimentação de tartarugas-de-pente do Oceano Atlântico ($p < 0.001$). Valores de F_{st} e ϕ_{st} revelaram que as agregações de alimentação não são homogêneas no Atlântico, com diferenças regionais significativas: a AMOVA confirmou pronunciada estruturação entre áreas brasileiras, africanas e caribenhas ($F_{st} = 0.618$, $p < 0.001$). A estruturação foi pronunciada também quando as áreas foram divididas em grupos do Brasil, África, Caribe e Golfo do México ($F_{st} = 0.553$, $p < 0.001$). Dentre as agregações brasileiras, algumas diferenças foram observadas, com duas áreas mais diferenciadas que o restante: as ilhas oceânicas de Noronha/Rocas, no litoral nordeste, e a área de ocorrência mais ao sul, Sul do Brasil. A estruturação foi significativa ($F_{st} = 0.581$, $p < 0.001$) entre áreas influenciadas pelas correntes Sul Equatorial/Norte do Brasil (SPSP, Noronha e Ceará) e aquelas influenciadas pela Corrente do Brasil (Bahia, Abrolhos e Sul).

A MSA demonstrou que as áreas de alimentação brasileiras são compostas principalmente de estoques nacionais, mas também apresentam algumas origens distantes. Bahia e Pipa foram as principais fontes de animais, com contribuições respectivas de 12% e 28% para SPSP, 30% e 22% para Noronha, 22% e 18% para o Ceará, 36% e 17% para a Bahia, 21% e 28% para Abrolhos, 34% e 30% para o Sul do Brasil. Estoques da África e do Caribe demonstraram contribuições menores porém notáveis: Príncipe, Barbados e Cuba contribuíram respectivamente 8%, 10% e 14% a Noronha; Barbados, Porto Rico e Cuba 12%, 9% e 13% a SPSP; Barbados e Cuba 12% e 15% ao Ceará, 9% e 10% à Bahia, e 8% e 13% a Abrolhos. Resultados centrados nas áreas de desova brasileiras de Bahia e Pipa mostram que estas contribuem principalmente para as áreas de alimentação nacionais: respectivamente 6% e 16% a SPSP; 12% e 9% ao Ceará; 20% e 10% à Bahia; 11% e 17% a Abrolhos; 18% e 18% ao Sul do Brasil; e 10% e 12% a Noronha. As demais contribuições foram menores que 5%.

Um total de 469 boias de deriva passaram por áreas de desova do Atlântico, das quais 388 transmitiram por mais de três meses. Destas, 37 boias chegaram às três regiões-alvo brasileiras, originando das áreas de desova da Bahia, Pipa e Príncipe. As boias que

saíram de Pipa e chegaram às áreas de alimentação principalmente via a Corrente Norte do Brasil; para as que saíram da Bahia, via as Correntes Norte do Brasil/do Brasil; e para as de Príncipe, via a Corrente Sul Equatorial. Nenhuma boia do Caribe chegou à costa do Brasil. Estimativas de origens baseadas nos dados de boias e tamanhos populacionais de áreas de desova mostraram contribuições de: Pipa (58%), Bahia (9%) e Cuba (11%) para SPSP; Pipa (62%), Bahia (14%) e Cuba (10%) para Noronha/Ceará; e Bahia (72%) para Abrolhos/Bahia/Sul do Brasil. Correlação entre origens natais calculadas por MSA (que incluiu dados de genética e de tamanhos populacionais de áreas de desova) e as calculadas por dados de boias/tamanho populacional foi significativa (teste Mantel, $r = 0.791$, $p < 0.05$; regressão linear $r = 0.560$, $p < 0.01$).

4.4. Conclusões

Os haplótipos descritos para as áreas de alimentação brasileiras são comumente observados em áreas de desova do Caribe, Brasil e África. Foram detectados dois haplótipos “órfãos” (i.e. não observados em áreas de desova), o que indica a necessidade de maiores amostragens em áreas de desova. A diversidade haplotípica das populações de alimentação brasileiras foi 0.413, mais alta do que as diversidades das duas áreas africanas descritas ($h = 0.335$), mas menor que a de dez populações caribenhas ($h = 0.647$).

MSA “muitos-a-muitos” demonstrou que áreas de alimentação brasileiras são compostas por poucos estoques, sendo ligadas principalmente às áreas de desova nacionais. No entanto, as estimativas mostraram também que em alguns casos há conectividade com áreas de desova localizadas no Caribe e Oeste da África. Origens calculadas usando dados oceanográficos corroboram as contribuições da Bahia e Pipa, origens da maioria das boias que chegam na costa brasileira, via as Correntes Norte do Brasil e do Brasil. Embora os dados de boias não tenham corroborado todas as origens calculadas por MSA, estes dois tipos de estimativas apresentaram forte correlação, indicando que as correntes oceânicas locais influenciam como são formados os padrões de composição de tartarugas-de-pente da costa. Apesar de algumas limitações das análises aplicadas aqui, a integração de dados genéticos e oceanográficos é uma abordagem valiosa para um melhor entendimento das origens e distribuição de animais. Um cenário ideal integraria diversos indicadores de conectividade. Isótopos estáveis, por exemplo, estão

começando a ser aplicados para distinguir populações e revelar origens de animais marinhos.

As análises de origens demonstram que as populações alimentares de tartarugas-de-pente do Brasil são provenientes especialmente das áreas de desova nacionais, o que é favorável para sua conservação, uma vez que o Projeto Tamar-ICMBio, principal projeto de conservação de tartarugas marinhas no Brasil, atua nestes locais. Apesar desta perspectiva favorável, ainda não se sabe se populações imaturas estão aumentando, e impactos como captura acidental e ingestão de plástico estão crescentemente provocando mortalidade crescente de tartarugas. Além disso, foram demonstradas que algumas áreas brasileiras estão conectadas a estoques longínquos do Caribe e Oeste da África. Estes resultados devem ser incorporados em estratégias nacionais e internacionais para a proteção e recuperação das populações ameaçadas de tartarugas-de-pente.

Capítulo 5. Mudanças ecológicas ontogenéticas de tartarugas-de-pente no Brasil

Artigo 4: “Life history in a tortoiseshell: detecting ontogenetic ecological changes of hawksbill sea turtles through stable isotope analysis”, em preparação para submissão ao *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.

5.1. Introdução

Espécies marinhas altamente migratórias comumente apresentam fases de vida crípticas ou em locais de difícil acesso. Deste modo, o entendimento de aspectos importantes da ecologia destes animais, como dieta, uso de habitat e migrações, pode ser desafiador. A análise de isótopos estáveis é uma poderosa ferramenta para estudos indiretos da ecologia destes animais, fornecendo informações sobre a dieta, nicho trófico e habitat de diversas espécies incluindo tartarugas marinhas (e.g. Godley et al. 1998, Arthur et al. 2008, Wallace et al. 2009, Bjorndal & Bolten 2010, Vander Zanden et al. 2010, Dodge et al. 2011). Esta análise está sendo aplicada também ao estudo de migrações e origens (Zbinden et al. 2011, Ceriani et al. 2012, Seminoff et al. 2012), assim como das variações ontogenéticas na história de vida destes animais (Reich et al. 2007, Arthur et al. 2008). A mudança de habitat e dieta que ocorre após o recrutamento das tartarugas marinhas do ambiente oceânico epipelágico ao costeiro bentônico já foi inclusive detectada na pele e carapaça de tartarugas-verdes. Por exemplo, Arthur et al. (2008) e Reich et al. (2007) encontraram um padrão de enriquecimento de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) associado à transição de habitats oceânicos a neríticos, e uma depleção de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ($\delta^{15}\text{N}$) devido à mudança de uma dieta onívora (fase epipelágica) a uma predominantemente herbívora (fase bentônica). Após a fase epipelágica onívora, as tartarugas-de-pente geralmente recrutam para habitats recifais com abundância de seus itens alimentares preferenciais: esponjas e zoantídeos (Meylan & Donnelly 1999, León & Bjorndal 2002, Proietti et al. 2012). Para esta espécie, no entanto, esta transição ainda não foi identificada através da análise de isótopos estáveis.

Isótopos estáveis de amostras biológicas são comumente determinados através de Espectrometria de Massa de Isótopos Estáveis (IRMS) de fluxo contínuo. Nesta técnica, as amostras são convertidas em gás puro e as razões isotópicas medidas por espectrometria de massa. As razões são então comparadas a um padrão reconhecido do elemento para uma determinação precisa (Muccio & Jackson 2009). A Espectrometria de Massa de Íons

Secundários (SIMS) está surgindo como uma valiosa ferramenta para a análise de isótopos estáveis (Ireland 2004). Esta técnica consiste em aplicar um feixe de íons de alta energia a uma amostra, emitindo átomos, moléculas e íons da superfície amostral; os íons secundários resultantes são então coletados e analisados em um espectrômetro de massa (Ireland 2004). Os íons secundários podem variar de acordo com a química do ambiente e as condições de emissão, fazendo com que a SIMS seja geralmente considerada uma análise qualitativa, com quantificação possível apenas com o uso de padrões internos determinados de acordo com o tipo de material da amostra (Ireland 2004, Betti 2005). A SIMS tem sido pouco utilizado para análises biológicas devido à dificuldade de obtenção de bons padrões internos para tecidos animais e vegetais, mas é de todo modo uma abordagem promissora, considerando a sua sensibilidade e alta resolução espacial (Betti 2005). Por exemplo, Hanson et al. (2010) determinaram isótopos estáveis do oxigênio de otólitos de peixes através de IRMS e SIMS, e reportaram maior número de amostras obtidas por unidade de área utilizando SIMS do que IRMS, e precisões analíticas similares entre os dois métodos.

Neste trabalho foi testada a aplicabilidade da SIMS ao entendimento da história de vida através da análise de isótopos em camadas de carapaça de tartarugas-de-pente imaturas. Diferentemente de tartarugas-verdes, acredita-se que a variação ontogenética do habitat pelágico ao bentônico irá provocar um enriquecimento do $\delta^{15}\text{N}$ devido à transição de uma dieta onívora e oportunista a uma predominantemente carnívora. Também foram determinadas razões de isótopos estáveis de pele e carapaça através de IRMS, que foram comparadas em termos de tipo de tecido, habitat ocupado e tamanho do animal.

5.2. Metodologia

Amostras de carapaça foram coletadas de tartarugas-de-pente imaturas no Arquipélago de São Pedro e São Paulo (SPSP; $n = 3$), Parque Nacional Marinho dos Abrolhos ($n = 13$), Reserva Biológica Marinha do Arvoredo ($n = 1$), e Praia do Cassino ($n = 4$). Amostras (~ 1.5 cm) foram coletadas da porção posterior da primeira placa lateral direita da carapaça. Porções de pele (~ 5 mm) também foram coletadas da nadadeira anterior direita de alguns animais em SPSP ($n = 3$) e Abrolhos ($n = 7$). Os tecidos amostrados foram congelados até a análise, quando foram preparadas através de lavagem

com água destilada, secagem por 48 h em estufa a 60°C e extração de lipídeos através de imersão e sonificação em solução de clorofórmio/metanol (2:1).

A SIMS foi aplicada a sete amostras de carapaça de SPSP (n = 2), Abrolhos (n = 4) e Arvoredo (n = 1). Seções transversais foram cortadas de cada amostra, montadas em resina, polidas, revestidas de ouro, e inseridas no equipamento CAMECA IMS 1280 (Cameca SAS, França) para análise de isótopos. Para determinar razões de isótopos de carbono e nitrogênio ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$), um feixe de íons com diâmetro de 20 μm foi emitido na superfície das amostras entre aparentes linhas de crescimento, da porção mais velha à mais recente (porção superior a inferior da carapaça). Quando possível, 2-3 réplicas foram analisadas por estrato amostral. Razões de isótopos estáveis foram expressas na notação convencional delta (δ) em partes por mil (‰): $\delta = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 1000$; onde R_{amostra} e $R_{\text{padrão}}$ são as razões entre os isótopos pesados e leves ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C} - \delta^{13}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N} - \delta^{15}\text{N}$) nas amostras de padrões. Belemnita PeeDee (PDB) e nitrogênio atmosférico foram utilizados como padrões para carbono e nitrogênio, respectivamente. Apesar de algumas tentativas com diferentes materiais, não foi possível determinar um padrão interno adequado para carapaça de tartaruga, portanto, as razões isotópicas obtidas por SIMS não são absolutas.

Foram analisadas 21 amostras de carapaça e 10 de epiderme por IRMS. Subamostras (duas de cada amostra) de aproximadamente 0.8 mg foram colocadas em cápsulas de estanho e razões de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio determinadas em um espectrômetro de massa de fluxo contínuo Delta V Plus conectado a um Thermo Flush 1112 via Conflo IV (Thermo Finnigan, Alemanha). As razões isotópicas determinadas por IRMS foram expressas em relação aos padrões e notação convencional descritos acima. Erro externo da análise de IRMS foi de 0.10‰ para $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

Razões isotópicas determinadas por SIMS foram plotadas de acordo com a posição na carapaça (média dos valores obtidos por camada amostral) para avaliação da história de vida e detecção de possíveis variações ontogenéticas. Quando detectadas, valores médios antes e depois das variações foram comparados por teste-t de Student. Diferenças entre composições isotópicas médias de carapaça obtidas por IRMS também foram avaliadas por testes-t de acordo com local, tipo de habitat (costeiro/oceânico, baixa/alta latitude) e tamanho de carapaça (animais com mais e menos de 40 cm de comprimento curvilíneo de carapaça – CCC). Finalmente, foram comparadas as razões isotópicas obtidas por IRMS de

pele e carapaça, assim como de amostras de pele de acordo com tamanhos de carapaça dos animais (maior e menor que 40 cm CCL).

5.3. Resultados e discussão

A SIMS de amostras de carapaça permitiu a análise de cinco a dez camadas transversais, dependendo da largura da amostra. A taxa de acreção de queratina na carapaça de tartarugas marinhas não é conhecida. Portanto, não sabemos quanto tempo cada seção transversal de carapaça representa, mas acreditamos que pode conter informações de alguns anos, como descrito por Reich et al. (2007) para a carapaça de tartarugas-cabeçudas. Algumas amostras apresentaram assinaturas relativamente homogêneas, indicando que as tartarugas possivelmente estavam ocupando o mesmo habitat e nicho trófico por algum tempo. Três amostras de Abrolhos apresentaram um gradual aumento do $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ da porção mais antiga à mais recente da carapaça, possivelmente indicando a ocupação de habitats mais costeiros com abundância de animais bentônicos, como é o caso dos recifes de Abrolhos. Em uma destas amostras foi observado um abrupto aumento ($\sim 3\text{‰}$) do $\delta^{15}\text{N}$ na vida do animal, mas como esta mudança ocorreu da primeira à segunda posição da carapaça, não foi possível comparar os valores médios de antes e depois. Uma mudança grande também foi observada em uma amostra da Ilha do Arvoredo, com um aumento de quase 4‰ do $\delta^{15}\text{N}$ entre a quarta e quinta posição amostral. Valores médios antes (4.51‰) e depois (9.49‰) desta posição foram significativamente diferentes ($p < 0.001$), indicando que esta mudança possivelmente reflete a transição de uma dieta oportunista na zona epipelágica a uma especializada nos organismos bentônicos abundantes nos recifes rochosos do Arvoredo (Reisser et al. 2013). O padrão de $\delta^{13}\text{C}$ desta amostra também demonstrou variação, com enriquecimento seguido por depleção. Nós hipotetizamos que isso possa possivelmente ser um reflexo do recrutamento para o ambiente costeiro (aumentando o $\delta^{13}\text{C}$) seguido por migrações para latitudes maiores (diminuindo o $\delta^{13}\text{C}$).

O $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de amostras de tartarugas-de-pente determinados por IRMS variaram de 4.79‰ a 9.15‰ e -19.85‰ a -10.16‰, respectivamente (Tabela 1). De modo geral, amostras de pele apresentaram valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ significativamente maiores que amostras de carapaça ($p < 0.05$), indicando que a história recente destes animais é caracterizada por uma alimentação de presas de maior nível trófico e ocupação de habitats

mais próximos da costa. O $\delta^{15}\text{N}$ não variou significativamente entre locais de amostragem, mas o $\delta^{13}\text{C}$ foi significativamente menor nas ilhas oceânicas de SPSP e nas áreas costeiras mas de alta latitude do Cassino e Arvoredo, quando comparado à área costeira e de baixa latitude de Abrolhos ($p < 0.05$). Adicionalmente, quando avaliamos as razões isotópicas na carapaça de animais de diferentes classes de tamanho, o $\delta^{15}\text{N}$ foi significativamente maior ($\sim 3\text{‰}$) em animais com comprimento de carapaça maior que 40 cm. Como o IRMS de amostras de carapaça reflete todo o período contido neste tecido, isto indica que animais maiores estiveram se alimentando de organismos de nível trófico mais alto por um maior período de tempo. Por outro lado, o $\delta^{13}\text{C}$ médio da carapaça não variou significativamente entre classes de tamanho, possivelmente refletindo uma maior amplitude de habitats e latitudes ocupadas ao longo da vida refletida neste tecido. O $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ de amostras de pele, que refletem um período mais recente, não variou entre classes de tamanho, indicando que a dieta e habitat recente dos animais é similar apesar das diferenças de tamanho.

Neste trabalho descrevemos pela primeira vez possíveis mudanças ontogenéticas da história de vida de tartarugas-de-pente, detectadas na carapaça. A SIMS e a IRMS apoiaram a hipótese de que o $\delta^{15}\text{N}$ desta espécie é enriquecido após o recrutamento. A SIMS forneceu alta resolução espacial, com análise de até dez seções transversais de cada amostra de carapaça. Devido à sua menor taxa de renovação, a aplicação da SIMS na carapaça permite descrever um histórico cronológico da vida das tartarugas maior que a análise de pele. Apesar de ser limitada apenas a valores relativos de isótopos estáveis, a SIMS apresenta grande potencial para a obtenção de informações detalhadas da ecologia destes animais. Estudos futuros devem focar no desenvolvimento de padrões internos para a determinação de valores absolutos de isótopos, o que permitiria a comparação a dados de IRMS de outras populações e locais. Com base no crescimento e incorporação isotópica dos tecidos, poderia ser possível calcular precisamente a duração da fase pelágica de tartarugas marinhas, como estimado para tartarugas-verdes (Reich et al., 2007), o que ainda é um assunto debatido da biologia destes animais. A definição de aspectos ecológicos como dieta e ocupação de habitats nas fases crípticas das tartarugas marinhas é fundamental para atingir um entendimento completo da história de vida destes animais.

Considerações Finais

Nesta tese, foram integradas diferentes ferramentas de estudo indireto, para melhor entender as características populacionais e ecológicas de tartarugas-de-pente no Brasil. Ao longo dos trabalhos de campo, foi possível identificar duas importantes áreas de alimentação de tartarugas-de-pentes imaturas na costa brasileira: o Arquipélago de São Pedro e São Paulo e o Parque Nacional Marinho de Abrolhos. Através da análise do mtDNA, foi possível determinar que as origens natais são, predominantemente, áreas de desova nacionais. Registrou-se, pela primeira vez, a ocorrência imaturos híbridos de tartarugas-de-pente e tartarugas-cabeçudas provenientes da BA, com indícios de uma possível alteração ecológica em relação a tartarugas-de-pente puras. Foi testada uma nova metodologia para análise de isótopos estáveis, na carapaça de tartarugas-de-pente, com alta resolução espacial amostral, o que permitiu descrever mudanças ontogenéticas nos hábitos alimentares e/ou distribuição espacial. As informações explanadas nesta tese já foram ou estão sendo compartilhadas na forma de artigos científicos e colaborações com projetos de conservação (Projeto Tamar-ICMBio, NEMA), para auxiliar na elaboração de estratégias de conservação das tartarugas-de-pente brasileiras.

Recomenda-se que estudo futuros investiguem, mais detalhadamente, a hibridização, utilizando genes nucleares, avaliação de parâmetros de sobrevivência e análise da migração e dieta dos animais híbridos. Além disso, um aperfeiçoamento da análises de isótopos estáveis por SIMS, com desenvolvimento de padrões internos para possibilitar a quantificação, é necessário para uma maior aplicação desta técnica em tecidos de tartarugas marinhas, assim como de outras espécies.

Referências bibliográficas

- Abreu-Grobois F, Horrocks J, Formia A, Dutton P, LeRoux R, Vélez-Zuazo X, Soares L, Meylan P (2006) New mtDNA Dloop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution of mixed stock analyses. In: Frick M, Panagopoulou A, Rees A, Williams K (eds) Book of Abstracts, Twenty-sixth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. International Sea Turtle Society, Athens, Greece, p 179
- Allen C, Lemons G, Eguchi T, LeRoux R, Fahy C, Dutton P, Peckham S, Seminoff J (2013) Stable isotope analysis reveals migratory origin of loggerhead turtles in the Southern California Bight. *Mar Ecol Prog Ser* 472:275–285
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol Evol* 16:613–622
- Amorocho DF, Abreu-Grobois FA, Dutton PH, Reina RD (2012) Multiple distant origins for green sea turtles aggregating off Gorgona Island in the Colombian eastern Pacific. *PLoS One* 7:e31486
- Arthur KE, Boyle MC, Limpus CJ (2008) Ontogenetic changes in diet and habitat use in green sea turtle (*Chelonia mydas*) life history. *Mar Ecol Prog Ser* 362:303–311
- Arthur KE, McMahon KM, Limpus CJ, Dennison WC (2009) Feeding ecology of green turtles (*Chelonia mydas*) from Shoalwater Bay, Australia. *Mar Turt Newsl* 123:6–12
- Awise JC (2007) Conservation Genetics of Marine Turtles — 10 Years Later. In: *Wildlife Science: Linking Ecological Theory and Management Applications*. p 295–314
- Barton NH (2001) The role of hybridization in evolution. *Mol Ecol* 10:551–68
- Bass AL, Epperly SP, Braun-McNeill J (2006) Green turtle (*Chelonia mydas*) foraging and nesting aggregations in the Caribbean and Atlantic: impact of currents and behavior on dispersal. *J Hered* 97:346–54
- Bass AL, Good DA, Bjorndal KA, Richardson JJ, Hillis ZM, Horrocks JA, Bowen BW (1996) Testing models of female reproductive migratory behaviour and population structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with mtDNA sequences. *Mol Ecol* 5:321–8
- Bellini C (1996) Reproduction and feeding of marine turtles in the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. *Mar Turt Newsl* 74:12–13
- Betti M (2005) Isotope ratio measurements by secondary ion mass spectrometry (SIMS) and glow discharge mass spectrometry (GDMS). *Int J Mass Spectrom* 242:169–182

- Bjorndal K (2000) Priorities for research in foraging grounds. In: Eckert K, Bjorndal K, Abreu-Grobois F, Donnelly M (eds) Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. Marine Turtle Specialist Group IUCN/SSC publication no. 4, p 13–15
- Bjorndal KA, Bolten AB (2010) Hawksbill sea turtles in seagrass pastures: success in a peripheral habitat. *Mar Biol* 157:135–145
- Bjorndal KA, Suganuma H, Bolter AB (1991) Digestive Fermentation in GreenTurtles feeding on Algae. *Bull Mar Sci* 48:166–171
- Blumenthal JM, Abreu-Grobois FA, Austin TJ, Broderick AC, Bruford MW, Coyne MS, Ebanks-Petrie G, Formia A, Meylan PA, Meylan AB, Godley BJ (2009) Turtle groups or turtle soup: dispersal patterns of hawksbill turtles in the Caribbean. *Mol Ecol* 18:4841–53
- Bolker B, Bjorndal KA, Okuyama T, Bolten A (2002) Stock estimation for sea turtle populations using genetic markers: accounting for sampling error of rare genotypes. *Ecol Appl*:1–31
- Bolker BM, Okuyama T, Bjorndal KA, Bolten AB (2007) Incorporating multiple mixed stocks in mixed stock analysis: “many-to-many” analyses. *Mol Ecol* 16:685–95
- Bolten A (2003) Variation in sea turtle life history patterns: neritic vs. oceanic developmental stages. In: Lutz P, Musick J, Wyneken J (eds) The Biology of Sea Turtles, Vol 2. CRC Press, Boca Raton, FL, p 243–257
- Boulon RH (1994) Growth rates of wild juvenile hawksbill turtles, *Eretmochelys imbricata*, in St . Thomas, United States Virgin Islands. *Copeia* 1994:811–814
- Bourjea J, Lapègue S, Gagnevin L, Broderick D, Mortimer JA, Ciccione S, Roos D, Taquet C, Grizel H (2007) Phylogeography of the green turtle, *Chelonia mydas*, in the Southwest Indian Ocean. *Mol Ecol* 16:175–86
- Bowen B, Bass A, Garcia-Rodriguez A, Diez C, Dam R Van, Bolten A, Bjorndal K, Miyamoto M, Ferl R (1996) Origin of hawksbill turtles in a Caribbean feeding area as indicated by genetic markers. *Ecol Appl*:566–572
- Bowen BW, Bass AL, Soares L, Toonen RJ (2005) Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Mol Ecol* 14:2389–402
- Bowen BW, Clark AM, Abreu-Grobois FA, Chaves A, Reichart HA, Ferl RJ (1998) Global phylogeography of the ridley sea turtles (*Lepidochelys spp.*) as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genetica* 101:179–89

- Bowen BW, Grant WS, Hillis-Starr Z, Shaver DJ, Bjorndal KA, Bolten AB, Bass AL (2007) Mixed-stock analysis reveals the migrations of juvenile hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean Sea. *Mol Ecol* 16:49–60
- Bowen BW, Kamezaki N, Limpus CJ, Hughes GR, Meylan AB, Avise JC (1994) Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. *Evolution* (N Y) 48:1820–1828
- Bowen BW, Karl SA (2007) Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Mol Ecol* 16:4886–907
- Bowen BW, Meylan AB, Ross JP, Limpus CJ, Balazs GH, Avise JC (1992) Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution*:865–881
- Boyle MC (2006) Post-hatchling sea turtle biology. PhD thesis, James Cook University, 128 pp
- Browne DC, Horrocks JA, Abreu-Grobois FA (2010) Population subdivision in hawksbill turtles nesting on Barbados, West Indies, determined from mitochondrial DNA control region sequences. *Conserv Genet* 11:1541–1546
- Bugoni L, Krause L, Petry MV (2003) Diet of sea turtles in southern Brazil. *Chelonian Conserv Biol* 4:685–687
- Burke VJ, Morreale SJ, Standora EA (1994) Diet of the Kemps ridley sea turtle, *Lepidochelys kempii*, in New York waters. *Fish Bull* 92:26–32
- Cain SD, Boles LC, Wang JH, Lohmann KJ (2005) Magnetic orientation and navigation in marine turtles, lobsters, and molluscs: concepts and conundrums. *Integr Comp Biol* 45:539–46
- Cardona L, Aguilar A, Pazos L (2009) Delayed ontogenic dietary shift and high levels of omnivory in green turtles (*Chelonia mydas*) from the NW coast of Africa. *Mar Biol* 156:1487–1495
- Carr A (1967) So excellent a fishe: a natural history of sea turtles. Scribner, New York
- Carreras C, Godley BJ, León YM, Hawkes LA, Revuelta O, Raga JA, Tomás J (2013) Contextualising the last survivors: population structure of marine turtles in the Dominican Republic. *PLoS One* 8:e66037
- Ceriani SA, Roth JD, Evans DR, Weishampel JF, Ehrhart LM (2012) Inferring foraging areas of nesting loggerhead turtles using satellite telemetry and stable isotopes. *PLoS One* 7:e45335
- Chaloupka MY, Limpus CJ (1997) Robust statistical modelling of hawksbill sea turtle growth rates (southern Great Barrier Reef). *Mar Ecol Prog Ser* 146:1–8

- Conceição MB, Levy JA, Marins LF, Marcovaldi MA (1990) Electrophoretic characterization of a hybrid between *Eretmochelys imbricata* and *Caretta caretta* (Cheloniidae). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 97B:275–278
- Craig P, Parker D, Brainard R, Rice M, Balazs G (2004) Migrations of green turtles in the central South Pacific. *Biol Conserv* 116:433–438
- Dam RP van, Diez CE (1998) Home range of immature hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata* (Linnaeus)) at two Caribbean islands. *J Exp Mar Bio Ecol* 220:15–24
- Darriba D, Taboada G, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9(8):772
- Davenport J (1997) Temperature and the life-history strategies of sea turtles. *J Therm Biol* 22:479–488
- Díaz-Fernández R, Okayama T, Uchiyama T, Carrillo E, Espinosa G, Márquez R, Diez C, Koike H (1999) Genetic sourcing for the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in the Northern Caribbean Region. *Chelonian Conserv Biol* 3:296–300
- Dodge KL, Logan JM, Lutcavage ME (2011) Foraging ecology of leatherback sea turtles in the Western North Atlantic determined through multi-tissue stable isotope analyses. *Mar Biol* 158:2813–2824
- Dutton PH, Bowen BW, Owens DW, Barragan A, Davis SK (1999) Global phylogeography of the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *J Zool* 248:397–409
- Encalada SE, Lahanas PN, Bjorndal KA, Bolten AB, Miyamoto MM, Bowen BW (1996) Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Mol Ecol* 5:473–483
- Excoffier L, Lischer H (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564–567
- Formia A, Godley BJ, Dontaine J-F, Bruford MW (2006) Mitochondrial DNA diversity and phylogeography of endangered green turtle (*Chelonia mydas*) populations in Africa. *Conserv Genet* 7:353–369
- France RL (1995) Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: foodweb implications. *Mar Ecol Prog Ser* 124:307–312
- Gaspar P, Benson SR, Dutton PH, Réveillère A, Jacob G, Meetoo C, Dehecq A, Fossette S (2012) Oceanic dispersal of juvenile leatherback turtles: going beyond passive drift modeling. *Mar Ecol Prog Ser* 457:265–284

- Glover KA, Kanda N, Haug T, Pastene LA, Øien N, Seliussen BB, Sørvik AGE, Skaug HJ (2013) Hybrids between common and Antarctic minke whales are fertile and can back-cross. *BMC Genet* 14:25
- Godfrey MH, Amato AFD, Marcovaldi MÂ, Mrosovsky N (1999) Pivotal temperature and predicted sex ratios for hatchling hawksbill turtles from Brazil. *Can J Zool* 77:1465–1473
- Godley B, Thompson D, Waldron S, Furness R (1998) The trophic status of marine turtles as determined by stable isotope analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 166:277–284
- Goericke R, Fry B (1994) Variations of marine plankton $\delta^{13}\text{C}$ with latitude, temperature, and dissolved CO_2 in the world ocean. *Global Biogeochem Cycles* 8:85–90
- Graham SC, Gilman WG, King CS, Turner J (2009) Foraging trends of hawksbill turtles on Hawai'i Island: a study utilizing stable isotopes and satellite tracking. PhD thesis, University of Hawai'i, 132 pp
- Hamann M, Godfrey M, Seminoff J, Arthur K, Barata P, Bjørndal K, Bolten A, Broderick A, Campbell L, Carreras C, Casale P, Chaloupka M, Chan S, Coyne M, Crowder L, Diez C, Dutton P, Epperly S, FitzSimmons N, Formia a, Girondot M, Hays G, Cheng I, Kaska Y, Lewison R, Mortimer J, Nichols W, Reina R, Shanker K, Spotila J, Tomás J, Wallace B, Work T, Zbinden J, Godley B (2010) Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endanger Species Res* 11:245–269
- Hamann M, Grech A, Wolanski E, Lambrechts J (2011) Modelling the fate of marine turtle hatchlings. *Ecol Modell* 222:1515–1521
- Hanson NN, Wurster CM, Todd CD (2010) Comparison of secondary ion mass spectrometry and micromilling/continuous flow isotope ratio mass spectrometry techniques used to acquire intra-otolith $\delta^{18}\text{O}$ values of wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Rapid Commun Mass Spectrom* 24:2491–2498
- Hart K, Sartain A, Fujisaki I, Pratt Jr H, Morley D, Feeley M (2012) Home range, habitat-use, and migrations of hawksbill turtles tracked from Dry Tortugas National Park, Florida, USA. *Mar Ecol Prog Ser* 457:193–207
- Hatase H, Sato K, Yamaguchi M, Takahashi K, Tsukamoto K (2006) Individual variation in feeding habitat use by adult female green sea turtles (*Chelonia mydas*): are they obligately neritic herbivores? *Oecologia* 149:52–64
- Hazin F, Viana D, Souza M (2009) O Arquipélago de São Pedro e São Paulo: 10 anos de estação científica (F Hazin, Ed.). Secretaria da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (SECIRM), Brasília, Brasil, Brasília

- Hillis D, Mable B, Larson A, Davis S, Zimmer E (1996) Nucleic acids IV: sequencing and cloning. In: Hillis D, Moritz C, Mable B (eds) Molecular systematics, 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, p 321–381
- Hobson KA (1999) Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120:314–326
- Hobson KA, Barnett-Johnson R, Cerling T (2010) Isoscapes. In: West JB, Bowen GJ, Dawson TE, Tu KP (eds) Understanding Movement, Pattern, and Process on Earth Through Isotope Mapping. Springer Netherlands, Dordrecht, p 273–298
- Houghton J, Callow M, Hays G (2003) Habitat utilization by juvenile hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*, Linnaeus, 1766) around a shallow water coral reef. *J Nat Hist* 37:1269–1280
- Hubbs CL (2013) Hybridization between fish species in nature. *Syst Zool* 4:1–20
- Ireland TR (2004) SIMS Measurement of Stable Isotopes. In: Groot P de (ed) Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques, Volume 1. Elsevier Science, Burlington, p 652–691
- Ishibashi H, Díaz-Fernandez R, Carrillo E, Koike H (2000) ^{15}N and ^{13}C measurement from the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, used for scute sourcing. *Bull Grad Sch Soc Cult Stud Kyushu Univ* 6:37–45
- IUCN (2012) The IUCN Red List of Threatened Species, version 2012.2 <iucnredlist.org> Accessed on November 21, 2013.
- James MC, Davenport J, Hays GC (2006) Expanded thermal niche for a diving vertebrate: a leatherback turtle diving into near-freezing water. *J Exp Mar Bio Ecol* 335:221–226
- James M, Martin K, Dutton P (2004) Hybridization between a green turtle, *Chelonia mydas*, and a loggerhead turtle, *Caretta caretta*, and the first record of a green turtle in Atlantic Canada. *Can F Nat* 118:579–582
- Jensen MP (2010) Assessing the composition of green turtle (*Chelonia mydas*) foraging grounds in Australia using mixed stock analyses. University of Canberra
- Jensen MP, FitzSimmons N, Dutton PH (2013) Molecular genetics of sea turtles. In: Wyneken J, Lohmann KJ, Musick J (eds) The biology of sea turtles, Vol 3. CRC Press, Boca Raton, FL, p 135–161
- Karl SA, Bowen BW, Avise JC (1992) Global Population Genetic Structure and Male-Mediated Gene Flow in the Green Turtle (*Chelonia mydas*): RFLP Analyses of Anonymous Nuclear Loci. *Genetics* 131:163

- Karl S, Bowen B, Avise J (1995) Hybridization among the ancient mariners: characterization of marine turtle hybrids with molecular genetic assays. *J Hered* 86:262–8
- Kovacs K (1997) A harp seal x hooded seal hybrid. *Mar Mammal Sci* 13:460–468
- Lahanas PN, Bjorndal KA, Bolten AB, Encalada SE, Miyamoto MM, Valverde R a., Bowen BW (1998) Genetic composition of a green turtle (*Chelonia mydas*) feeding ground population: evidence for multiple origins. *Mar Biol* 130:345–352
- Lambardi P, Lutjeharms J, Mencacci R, Hays G, Luschi P (2008) Influence of ocean currents on long-distance movement of leatherback sea turtles in the Southwest Indian Ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 353:289–301
- Lara-Ruiz P, Lopez GG, Santos FR, Soares LS (2006) Extensive hybridization in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. *Conserv Genet* 7:773–781
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–8
- Lee PLM, Luschi P, Hays GC (2007) Detecting female precise natal philopatry in green turtles using assignment methods. *Mol Ecol* 16:61–74
- Lemons G, Lewison R, Komoroske L, Gaos A, Lai C-T, Dutton P, Eguchi T, LeRoux R, Seminoff JA (2011) Trophic ecology of green sea turtles in a highly urbanized bay: Insights from stable isotopes and mixing models. *J Exp Mar Bio Ecol* 405:25–32
- León YM, Bjorndal KA (2002) Selective feeding in the hawksbill turtle, an important predator in coral reef ecosystems. *Mar Ecol Prog Ser* 245:249–258
- Leroux RA, Dutton PH, Abreu-Grobois AF, Lagueux CJ, Campbell CL, Delcroix E, Chevalier J, Horrocks JA, Hillis-Starr Z, Troëng S, Harrison E, Stapleton S (2012) Re-examination of population structure and phylogeography of hawksbill turtles in the wider Caribbean using longer mtDNA sequences. *J Hered*:1–15
- Lett C, Verley P, Mullon C, Parada C, Brochier T, Penven P, Blanke B (2008) A Lagrangian tool for modelling ichthyoplankton dynamics. *Environ Model Softw* 23:1210–1214
- Limpus C, Boyle M (2008) The stomach contents of post-hatchling green and loggerhead sea turtles in the southwest Pacific: an insight into habitat association. *Mar Biol* 155:233–241
- Lohmann K, Lohmann C (1996) Orientation and open-sea navigation in sea turtles. *J Exp Biol* 199:73–81

- López-Castro M, Bjørndal K, Kamenov G, Zenil-Ferguson R, Bolten A (2013) Sea turtle population structure and connections between oceanic and neritic foraging areas in the Atlantic revealed through trace elements. *Mar Ecol Prog Ser* 490:233–246
- Luschi P (2013) Long-Distance Animal Migrations in the Oceanic Environment: Orientation and Navigation Correlates. 2013
- Luschi P, Hays GC, Papi F (2003) A review of long-distance movements by marine turtles, and the possible role of ocean currents. *Oikos* 103:293–302
- Luschi P, Hays GC, Seppia C Del, Marsh R, Papi F (1998) The navigational feats of green sea turtles migrating from Ascension Island investigated by satellite telemetry. *Proc Biol Sci* 265:2279–84
- Luschi P, Sale A, Mencacci R, Hughes GR, Lutjeharms JRE, Papi F (2003) Current transport of leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) in the ocean. *Proc Biol Sci* 270 Suppl :S129–32
- Lutcavage M, Plotkin P, Witherington B, Lutz P (1997) Human impacts on sea turtle survival. In: Lutz P, Musick J (eds) *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, FL, p 387–409
- Marcovaldi MÂ, Baptistotte C, Castilhos JC, Gallo BMG, Lima EHSM, Sanches TM, Vieitas CF (1998) Activities by Project TAMAR in Brazilian Sea Turtle Feeding Grounds. *Mar Turt Newsl* 80:5–7
- Marcovaldi M, Chaloupka M (2007) Conservation status of the loggerhead sea turtle in Brazil: an encouraging outlook. *Endanger Species Res* 3:133–143
- Marcovaldi MA, Godfrey MH, Mrosovsky N (1997) Estimating sex ratios of loggerhead turtles in Brazil from pivotal incubation durations. *Can J Zool* 75:755–770
- Marcovaldi M, Lopez G, Soares L, López-Mendilaharsu M (2012) Satellite tracking of hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata* nesting in northern Bahia, Brazil: turtle movements and foraging destinations. *Endanger Species Res* 17:123–132
- Marcovaldi MA, Lopez GG, Soares LS, Santos AJB, Bellini C, Barata PCR (2007) Fifteen years of hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Northern Brazil. *Chelonian Conserv Biol* 6:223–228
- Marcovaldi M, Silva A da, Gallo B, Baptistotte C, Vieitas C, Bellini C, Lima E, Castilhos J, Thomé J, Sanches T (2000) Sea turtle feeding grounds of Brazil. In: Abreu-Gobrois F, Briseno-Dueñas R, Márquez R, Sarti L (eds) *Proceedings of the Eighteenth International Sea Turtle Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC-436, p 150–152

- Marcovaldi M, Vieitas CF, Godfrey MH (1999) Nesting and conservation management of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in northern Bahia, Brazil. *Chelonian Conserv Biol* 3:301–307
- McClellan CM, Braun-McNeill J, Avens L, Wallace BP, Read AJ (2010) Stable isotopes confirm a foraging dichotomy in juvenile loggerhead sea turtles. *J Exp Mar Bio Ecol* 387:44–51
- Meylan AB (1988) Spongivory in hawksbill turtles: a diet of glass. *Science* (80)239:393–395
- Meylan AB (1999) Status of the Hawksbill Turtle (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean Region. *Chelonian Conserv Biol* 3:177–184
- Meylan AB, Bowen BW, Avise JC (1990) A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. *Science* (80)248:724–7
- Meylan AB, Donnelly M (1999) Status justification for listing the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) as Critically Endangered on the 1996 IUCN Red List of Threatened Animals. *Chelonian Conserv Biol* 3:200–224
- Miller J (1997) Reproduction in sea turtles. In: Lutz P, Musick J (eds) *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, FL, p 51–81
- Monteiro D, Bugoni L, Estima S (2006) Strandings and sea turtle fisheries interactions along the coast of Rio Grande do Sul state, Brazil. In: Frick M, Panagopoulou A, Rees A, Williams K (eds) *Book of Abstracts, Twenty-sixth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. International Sea Turtle Society, Athens, Greece, p 257
- Monzón-Argüello C, López-Jurado LF, Rico C, Marco A, López P, Hays GC, Lee PLM (2010) Evidence from genetic and Lagrangian drifter data for transatlantic transport of small juvenile green turtles. *J Biogeogr* 37:1752–1766
- Monzón-Argüello C, Loureiro NS, Delgado C, Marco A, Lopes JM, Gomes MG, Abreu-Grobois FA (2011) Príncipe island hawksbills: genetic isolation of an eastern Atlantic stock. *J Exp Mar Bio Ecol* 407:345–354
- Monzón-Argüello C, Rico C, Marco A, López P, López-Jurado LF (2010) Genetic characterization of eastern Atlantic hawksbill turtles at a foraging group indicates major undiscovered nesting populations in the region. *J Exp Mar Bio Ecol* 387:9–14
- Moritz C (1994) Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Mol Ecol* 3:401–411
- Moritz C, Faith DP (1998) Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Mol Ecol* 7:419–429

- Mortimer JA, Donnelly M (2008) Hawksbill Turtle (*Eretmochelys imbricata*) - Marine Turtle Specialist Group 2008 IUCN Red List status assessment.
- Mortimer JA, Meylan PA, Donnelly M (2007) Whose turtles are they, anyway? *Mol Ecol* 16:17–8
- Muccio Z, Jackson GP (2009) Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Analyst* 134:213–22
- Musick J, Limpus C (1996) Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In: Lutz P, Musick J (eds) *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, FL, p 137–164
- Naro-Maciel E, Becker JH, Lima EHSM, Marcovaldi MÂ, DeSalle R (2007) Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. *J Hered* 98:29
- Oksanen AJ, Kindt R, Legendre P, Hara BO, Simpson GL, Stevens MHH, Wagner H (2013) CRAN-R Vegan: Community Ecology Package. URL vegan.r-forge.r-project.org.
- Okuyama J, Abe O, Nishizawa H, Kobayashi M, Yoseda K, Arai N (2009) Ontogeny of the dispersal migration of green turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings. *J Exp Mar Bio Ecol* 379:43–50
- Okuyama T, Bolker BM (2005) Combining genetic and ecological data To estimate sea turtle origins. *Ecol Appl* 15:315–325
- Owens DW, Grassman MA, Hendrickson J (1962) The imprinting hypothesis and sea turtle reproduction. *Herpetologica* 38:124–135
- Pajuelo M, Bjørndal K, Reich K, Zanden HB Vander, Hawkes L, Bolten A (2012) Assignment of nesting loggerhead turtles to their foraging areas in the Northwest Atlantic using stable isotopes. *Ecosphere* 3:1–18
- Pella J, Masuda M (2001) Bayesian methods for analysis of stock mixtures from genetic characters. *Fish Bull* 99:151–167
- Peterson BJ, Fry B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu Rev Ecol Syst* 18:293–320
- Plotkin P (2003) Adult migrations and habitat use. In: Lutz P, Musick J, Wyneken J (eds) *The biology of sea turtles*, Vol 2. CRC Press, Boca Raton, FL, p 225–241
- Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods and assumptions. *Ecology* 83:703–718
- Pritchard PCH (1997) Evolution, phylogeny, and current status. In: Lutz P, Musick J (eds) *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, FL, p 1–28

- Pritchard PCH, Mortimer JA (2000) Taxonomy, external morphology and species identification. In: Eckert K, Bjorndal K, Abreu-Grobois F, Donnelly M (eds) Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4, p 23–41
- Proietti M, Reisser J, Kinas P, Kerr R, Monteiro D, Marins L, Secchi E (2012) Green turtle *Chelonia mydas* mixed stocks in the western South Atlantic, as revealed by mtDNA haplotypes and drifter trajectories. *Mar Ecol Prog Ser* 447:195–209
- Proietti M, Reisser J, Marins L, Marcovaldi M, Soares L, Monteiro D, Wijeratne S, Pattiaratchi C, Secchi E (2013) Hawksbill x loggerhead sea turtle hybrids at Bahia, Brazil: where do their offspring go? *PeerJ Prepr* 1e159v1 <http://dx.doi.org/107287/peerj.preprints159v1>
- Proietti MC, Reisser J, Secchi ER (2012) Foraging by immature hawksbill sea turtles at Brazilian islands. *Mar Turt Newsl* 135:4–6
- Putman N, He R (2013) Tracking the long-distance dispersal of marine organisms: sensitivity to ocean model resolution. *J R Soc Interface* 10
- Putman NF, Naro-Maciel E (2013) Finding the “lost years” in green turtles: insights from ocean circulation models and genetic analysis. *Proc Biol Sci* 280:20131468
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing.
- Rawson PD, Agrawal V, Hilbish TJ (1999) Hybridization between the blue mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* along the Pacific coast of North America: evidence for limited introgression. *Mar Biol* 134(1):201–211
- Reece JS, Ehrhart LM, Parkinson CL (2006) Mixed stock analysis of juvenile loggerheads (*Caretta caretta*) in Indian River Lagoon, Florida: implications for conservation planning. *Conserv Genet* 7:345–352
- Reich KJ, Bjorndal KA, Bolten AB (2007) The “lost years” of green turtles: using stable isotopes to study cryptic lifestages. *Biol Lett* 3:712–714
- Reis EC, Soares LS, Lôbo-Hajdu G (2010) Evidence of olive ridley mitochondrial genome introgression into loggerhead turtle rookeries of Sergipe, Brazil. *Conserv Genet* 11:1587–1591
- Reis EC, Soares LS, Vargas SM, Santos FR, Young RJ, Bjorndal KA, Bolten AB, Lôbo-Hajdu G (2009) Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. *Conserv Genet* 11:1467–1477
- Reisser J, Proietti M, Kinas P, Sazima I (2008) Photographic identification of sea turtles: method description and validation, with an estimation of tag loss. *Endanger Species Res* 5:73–82

- Reisser J, Proietti M, Sazima I, Kinas P, Horta P, Secchi E (2013) Feeding ecology of the green turtle (*Chelonia mydas*) at rocky reefs in western South Atlantic. *Mar Biol* 160:3169–3179
- Revelles M, Cardona L, Aguilar A, Borrell A, Fernández G, Félix MSAN (2007) Stable C and N isotope concentration in several tissues of the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* from the western Mediterranean and dietary implications. *Sci Mar* 71:87–93
- Rhymer M, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annu Rev Ecol Syst* 27:83–109
- Richardson PB, Bruford MW, Calosso MC, Campbell LM, Clerveaux W, Formia A, Godley BJ, Henderson AC, McClellan K, Newman S, Parsons K, Pepper M, Ranger S, Silver JJ, Slade L, Broderick AC (2009) Marine turtles in the Turks and Caicos Islands: remnant rookeries, regionally significant foraging stocks, and a major turtle fishery. *Chelonian Conserv Biol* 8:192–207
- Rubenstein DR, Hobson KA (2004) From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. *Trends Ecol Evol* 19:256–263
- Sales G, Giffoni B, Barata P (2008) Incidental catch of sea turtles by the Brazilian pelagic longline fishery. *J Mar Biol Assoc UK* 88:853–864
- Santos A, Bellini C, Vieira D, Neto L, Corso G (2013) Northeast Brazil shows highest hawksbill turtle nesting density in the South Atlantic. *Endanger Species Res* 21:25–32
- Sazima I, Grossman A, Sazima C (2004) Hawksbill turtles visit moustached barbers: cleaning symbiosis between *Eretmochelys imbricata* and the shrimp *Stenopus hispidus*. *Biota Neotrop* 4:1–6
- Sazima C, Grossman A, Sazima I (2010) Turtle cleaners: reef fishes foraging on epibionts of sea turtles in the tropical Southwestern Atlantic, with a summary of this association type. *Neotrop Ichthyol* 8:187–192
- Scales KL, Lewis JA, Lewis JP, Castellanos D, Godley BJ, Graham RT (2011) Insights into habitat utilisation of the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766), using acoustic telemetry. *J Exp Mar Bio Ecol* 407:122–129
- Schuyler Q, Hardesty BD, Wilcox C, Townsend K (2013) Global analysis of anthropogenic debris ingestion by sea turtles. *Conserv Biol* 00:1–11
- Seminoff JA, Benson SR, Arthur KE, Eguchi T, Dutton PH, Tapilatu RF, Popp BN (2012) Stable isotope tracking of endangered sea turtles: validation with satellite telemetry and $\delta^{15}\text{N}$ analysis of amino acids. *PLoS One* 7:e37403
- Seminoff J, Jones T, Eguchi T, Jones D, Dutton P (2006) Stable isotope discrimination ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) between soft tissues of the green sea turtle *Chelonia mydas* and its diet. *Mar Ecol Prog Ser* 308:271–278

- Seminoff JA, Karl SA, Schwartz T, Resendiz A (2003) Hybridization of the green turtle (*Chelonia mydas*) and hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in the Pacific Ocean: indication of absence of gender bias in the directionality of crosses. *Bull Mar Sci* 73:643–652
- SWOT (2007) The State of the World's Hawksbills. The State of the World's Sea Turtles Report - Volume III, 46 pp
- Tröeng S, Dutton PH, Evans D (2005) Migration of hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata* from Tortuguero, Costa Rica. *Ecography (Cop)* 28:394–402
- Velez-Zuazo X, Ramos WD, Dam RP van, Diez CE, Abreu-Grobois A, McMillan WO (2008) Dispersal, recruitment and migratory behaviour in a hawksbill sea turtle aggregation. *Mol Ecol* 17:839–53
- Vilaça ST, Lara-Ruiz P, Marcovaldi MA, Soares LS, Santos FR (2013) Population origin and historical demography in hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) feeding and nesting aggregates from Brazil. *J Exp Mar Bio Ecol* 446:334–344
- Vilaça ST, Santos FR dos (2013) Molecular data for the sea turtle population in Brazil. *Dataset Pap Sci* 2013:1–7
- Vilaça ST, Vargas SM, Lara-Ruiz P, Molfetti É, Reis EC, Lôbo-Hajdu G, Soares LS, Santos FR (2012) Nuclear markers reveal a complex introgression pattern among marine turtle species on the Brazilian coast. *Mol Ecol* 21:4300–4312
- Wallace BP, Avens L, Braun-McNeill J, McClellan CM (2009) The diet composition of immature loggerheads: insights on trophic niche, growth rates, and fisheries interactions. *J Exp Mar Bio Ecol* 373:50–57
- Wallace BP, Lewison RL, McDonald SL, McDonald RK, Kot CY, Kelez S, Bjorkland RK, Finkbeiner EM, Helmbrecht S, Crowder LB (2010) Global patterns of marine turtle bycatch. *Conserv Lett* 3:131–142
- Werner TB, Pinto LP, Dutra GF, Pereira PGDP (2000) Abrolhos 2000: conserving the Southern Atlantic's richest coastal biodiversity into the next century. *Coast Manag* 28:99–108
- Willis BL, Oppen MJH van, Miller DJ, Vollmer SV, Ayre DJ (2006) The role of hybridization in the evolution of reef corals. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37:489–517
- Wilson E, Miller K, Alison D, Magliocca M (2010) Why healthy oceans need sea turtles: the importance of sea turtles to marine ecosystems. *Oceano.org* report, 20 pp
- Witherington B, Hiram S, Hardy R (2012) Young sea turtles of the pelagic Sargassum-dominated drift community: habitat use, population density, and threats. *Mar Ecol Prog Ser* 463:1–22

- Witzell W (2002) Immature Atlantic loggerhead turtles (*Caretta caretta*): suggested changes to the life history model. *Herpetol Rev* 33:266–269
- Witzell WN, Schmid JR (2003) Multiple recaptures of a hybrid hawksbill-loggerhead turtle in the Ten Thousand Islands, Southwest Florida. *Herpetol Rev* 34:323–325
- Wood L, Hardy R, Meylan P, Meylan A (2013) Hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) foraging aggregation in a high-latitude reef community in Southeastern Florida. *Herpetol Conserv Biol* 8:258–275
- Wood J, Wood F, Critchley K (1983) Hybridization of *Chelonia mydas* and *Eretmochelys imbricata*. *Copeia* 1983:839–842
- Wyneken J (2001) The Anatomy of Sea Turtles. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470 The, Miami, FL
- Yazdi P (2002) A possible hybrid between the dusky dolphin (*Lagenorhynchus obscurus*) and the southern right whale dolphin (*Lissodelphis peronii*). *Aquat Mamm* 28:211–217
- Zanden HB Vander, Bjorndal KA, Reich KJ, Bolten AB (2010) Individual specialists in a generalist population: results from a long-term stable isotope series. *Biol Lett* 6:711–4
- Zbinden J, Bearhop S, Bradshaw P, Gill B, Margaritoulis D, Newton J, Godley B (2011) Migratory dichotomy and associated phenotypic variation in marine turtles revealed by satellite tracking and stable isotope analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 421:291–302

Artigo 1: Immature Hawksbill Sea Turtles Feeding in Brazilian Islands

Publicado na revista Marine Turtle Newsletter 135, outubro de 2012.

Maíra Carneiro Proietti¹, Julia Reisser² and Eduardo Resende Secchi¹

¹ *Laboratório de Tartarugas e Mamíferos Marinhos, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brazil, mairaproietti@gmail.com*

² *School of Environmental Systems Engineering and The UWA Oceans Institute, University of Western Australia, Perth, Australia*

Among sea turtle species, hawksbills (*Eretmochelys imbricata*) have suffered one of the longest and most intense exploitation processes (Mortimer & Donnelly 2008). This species is mainly tropical and forages preferably at coral reefs. However, it can also inhabit other hard-bottomed benthic habitats such as seagrass beds, rocky reefs, mangrove bays, and mud flats (Mortimer & Donnelly 2008). Although there are only a few studies concerning the ecology and behavior of immature hawksbills in Brazilian feeding areas, they are essential for understanding these hawksbill populations and their ecological roles within their habitats. Here we studied immature hawksbills foraging around three high-biodiversity areas in Brazil (Fig. 1): (1) the São Pedro e São Paulo Archipelago (SPSP), which is over 1,000 km from the coast of Rio Grande do Norte state and has deep rocky shores with high occurrences of hawksbills and green sea turtles (*Chelonia mydas*); (2) the Abrolhos Marine National Park, which is approximately 70 km from Bahia state and has calm shallow reefs commonly visited by hawksbills and greens, and occasionally loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) and; (3) Arvoredo Island, which is the largest island of the Arvoredo Biological Reserve and has high occurrences of green and some hawksbill turtles.

Snorkel and scuba dives were conducted for in-water observations and turtle captures. For each sighting we recorded date, time, dive location, depth, substrate type, carapace length, behavior (swimming, feeding, resting on the bottom, assisted resting – turtle resting under any structure – and associations with fish) and other relevant characteristics (methods adapted from Houghton et al. 2003). We also attempted to photograph behavior and facial profiles of each sea turtle. When possible, sea turtles were

manually captured after recording its sighting. Captured turtles were tagged (inconel tags provided by Project Tamar-ICMBio), weighed, measured (curved carapace length – CCL) and photo-identified (Reisser et al. 2008). Epidermis and scute samples were also taken for future genetic and isotope analysis. After these procedures sea turtles were immediately released close to their capture locations.

From a total of 80.1 dive hours performed at Abrolhos there were 162 underwater sightings and 65 individual hawksbills captured. At SPSP we dived for 29.2 hours and this resulted in 73 underwater sightings and 12 individuals captured. At Arvoredo Island we performed 235 dive hours with 22 underwater sightings and 6 individuals captured, one of these being recaptured twice.

The size of captured turtles ranged from 24.5 – 63.0 cm CCL at Abrolhos (mean = 37.9 cm), 30 – 75 cm at SPSP (mean = 53.7 cm), and 30 – 59.5 cm (mean = 41.3 cm) at Arvoredo (Fig. 2). Mean sizes were significantly larger at SPSP when compared to the other two areas ($p < 0.05$), but mean sizes between Abrolhos and Arvoredo did not differ significantly ($p > 0.05$), as demonstrated by a Student's *t*-test. Due to the high abundance of small turtles at Abrolhos Park, we believe that this is an important recruitment area for hawksbill turtles. On the other hand, we observed relatively large size classes at SPSP and this indicates that this area is an important feeding ground for older hawksbills, perhaps due to its proximity to the Caribbean, where the majority of the Atlantic hawksbill rookeries are located (Mortimer 2007).

Hawksbill feeding activity was recorded in 28.9% ($n = 71$) of the observations and consistently occurred at shallow portions of the reefs (depths lower than 4 m) at Abrolhos and Arvoredo, and at greater depths (more than 8 m) at SPSP. Feeding occurred throughout the day (observed from 0600 to 1900 hours) and hawksbills seemed to select their prey by searching for them slowly while swimming close to the reef or rocks. In all of the feeding observations hawksbills selected sessile benthic organisms, mainly zoanthids (green sea mat, *Zoanthus sociatus*, and white encrusting zoanthid, *Palythoa caribaeorum*) and occasionally sponges. Although most studies on hawksbill diets report a preference for sponges (León & Bjørndal 2002; Meylan 1988), feeding on zoanthids has also been observed (Stampar et al. 2007).

Resting behavior (20.3% of sightings, $n = 50$) was also observed throughout the day, and hawksbills apparently chose deeper sites for this activity, resting mostly in spots deeper than 4 m at Abrolhos and Arvoredo, and greater than 10 m at SPSP. In 70% ($n = 35$) of resting observations turtles chose spots under rocks, demonstrating a preference of

assisted over unassisted resting.

The frequency of other observed behaviors was found to be 48% ($n = 118$) swimming and 2.8% ($n = 7$) activity associated with reef fish. Cleaning activity on sea turtles by three reef fish species was recorded. There were four sightings at Abrolhos of cleaner fish (yellow line goby, *Elacatinus figaro*) nipping at the turtle's carapace, with up to three fish cleaning simultaneously. There were two sightings at SPSP of the endemic Saint Paul's gregory (*Stegastes sanctipauli*) cleaning the neck and carapace of a turtle and one observation at Arvoredo of a juvenile French angelfish (*Pomacantus paru*) feeding off a carapace. Associations between sea turtles and fish in Brazil have been recorded for many fish species including *P. paru* (Sazima et al. 2010), but to our knowledge this is the first record of *E. figaro* and *S. sanctipauli* cleaning hawksbill sea turtles.

By photographing the facial profiles of hawksbills upon initial capture, we were able to recognize some of them (31 individuals on 52 occasions) through underwater photo-ID (see Fig. 3d and f). This evidences the great potential of photo-ID for conducting non-intrusive population studies. Intervals between initial capture and posterior "recaptures" (through underwater photo-ID or manual capture) varied from 1 to 242 days at SPSP, 1 to 297 at Abrolhos, and 367 to 671 for Arvoredo Island. We believe that additional field surveys would reveal even longer periods of permanency, further highlighting hawksbill residency at these feeding grounds. The permanency of this tropical species at Arvoredo Island is remarkable considering that this area can reach temperatures as low as 13°C in the winter (pers. obs. in July 2007).

Acknowledgements M.C.P. is a graduate student of the Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (FURG) and a scholarship recipient of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Brazil). J.R. is sponsored by the International Postgraduate Research Scholarship (IPRS) and the CSIRO Flagship Collaboration Fund (Wealth from Oceans Flagship). E.R.S. is sponsored by CNPq (307843/2011-4). This project was made possible thanks to financial support from the Rufford Small Grants (RSG – UK) and field support from Abrolhos Park coordination and CECIRM PRO-Arquipélago. We would like to acknowledge Projeto Tamar and ICMBio for their research partnership and permits. A special thank you to Berna Barbosa, Felipe Buloto and all the field assistants. This was a contribution from the Research Group 'Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha – EcoMega'.

HOUGHTON, J., M. CALLOW & G. HAYS. 2003. Habitat utilization by juvenile hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) around a shallow water coral reef. *Journal of Natural History* 37(10):1269-1280.

LEÓN, Y. M. & K.A. BJORN DAL. 2002. Selective feeding in the hawksbill turtle, an important predator in coral reef ecosystems. *Marine Ecology Progress Series* 245:249-258.

MEYLAN, A. B. 1988. Spongivory in hawksbill turtles: a diet of glass. *Science* 239:393-395.

MORTIMER, J.A. 2007. The state of the world's hawksbills. SWOT report – The State of the World's Sea Turtles Vol. III.

MORTIMER, J.A. & M. DONNELLY. 2008. Hawksbill Turtle (*Eretmochelys imbricata*) Marine Turtle Specialist Group 2008 IUCN Red List status assessment. In: IUCN 2008. IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org.

REISSER, J., M. PROIETTI, P. KINAS & I. SAZIMA. 2008. Photographic identification of sea turtles: method description and validation, with an estimation of tag loss. *Endangered Species Research* 5:73-82.

SAZIMA, C., A. GROSSMAN & I. SAZIMA. 2010. Turtle cleaners: reef fishes foraging on epibionts of sea turtles in the tropical Southwestern Atlantic, with a summary of this association type. *Neotropical Ichthyology* 8(1):187-192.

STAMPAR, S.N., P.F. DA SILVA & O.J. LUIZ JR. 2007. Predation on the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Anthozoa, Cnidaria) by a hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in southeastern Brazil. *Marine Turtle Newsletter* 117:3-5.

Figures

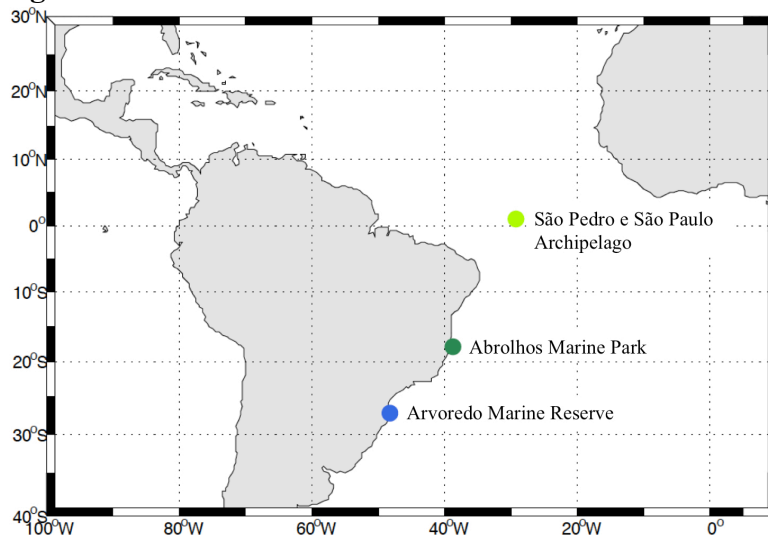


Figure 1. Location of studied hawksbill feeding grounds: Arvoredo Marine Reserve, Abrolhos Marine Park and São Pedro e São Paulo (SPSP).

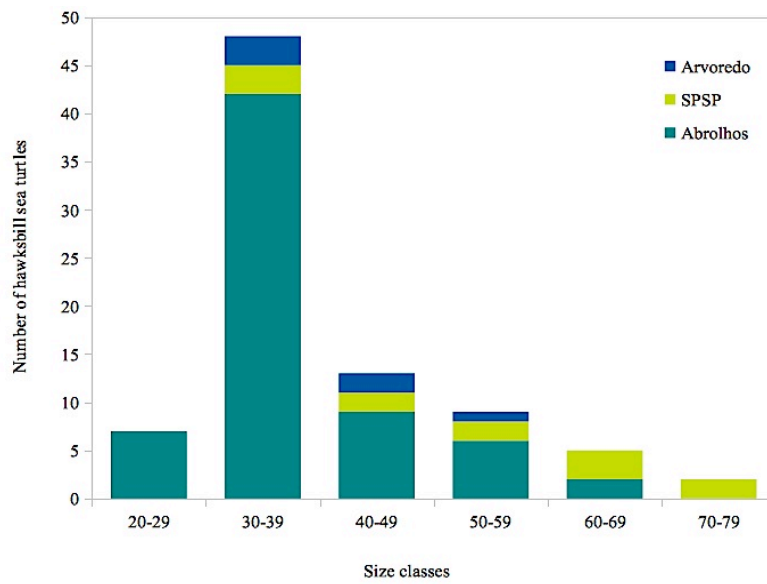


Figure 2. Number of hawksbill sea turtles captured at study areas Arvoredo Marine Reserve, Abrolhos Marine Park and São Pedro e São Paulo (SPSP), according to size classes.

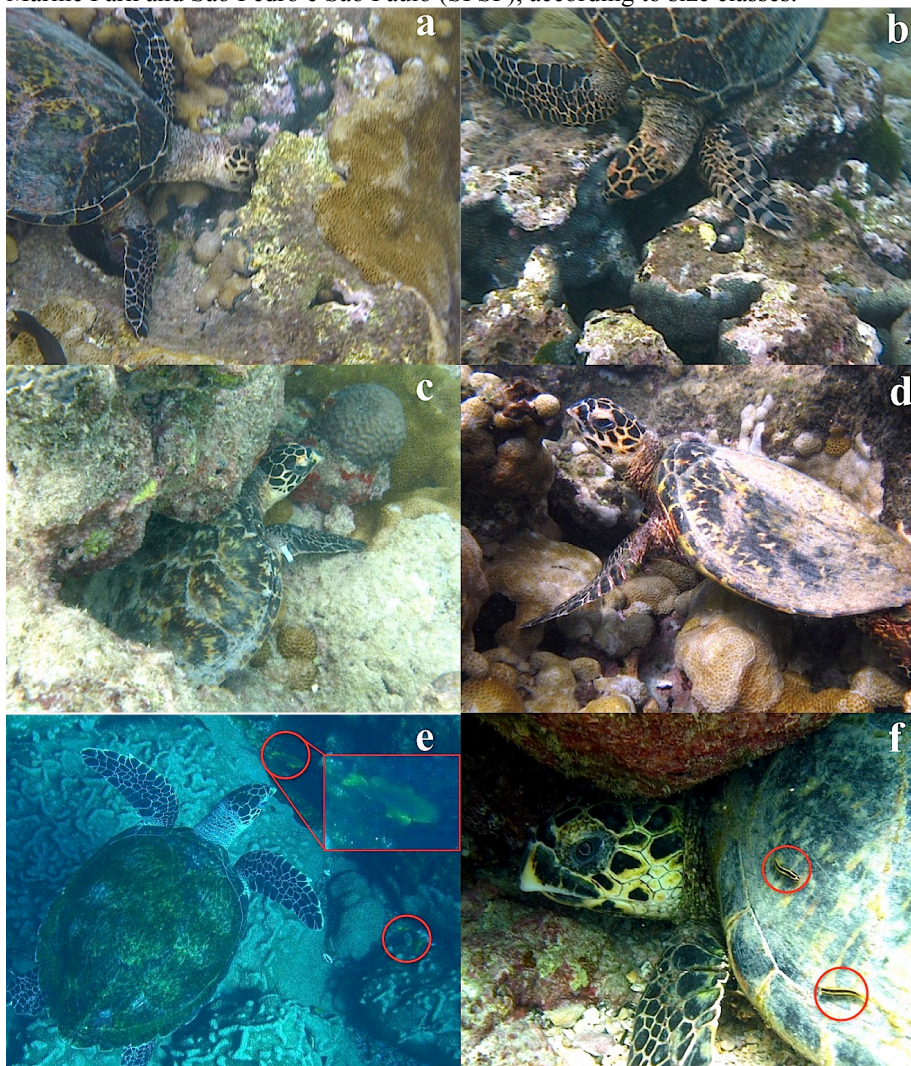


Figure 3. Examples of hawksbill behaviors at the study sites: a/b) feeding on zoanthids; c) assisted resting; d) unassisted resting; e) Saint Paul's gregory cleaning at SPSP; f) yellow line goby cleaning at Abrolhos. Red circles in *e* and *f* indicate fish locations. Images *d* and *f* are examples of typical underwater photo-id. Photographs by M.C.P.

Artigo 2: Hawksbill x loggerhead sea turtle hybrids at Bahia, Brazil: where do their offspring go?

Preprint publicado no servidor PeerJ Preprints (doi 10.7287/peerj.preprints.159v1); em revisão na *PeerJ*.

Maira C. Proietti¹, Julia Reisser^{2,3}, Luis F. Marins⁴, Maria A. Marcovaldi⁵, Luciano S. Soares⁶, Danielle S. Monteiro⁷, Sarath Wijeratne², Charitha Pattiaratchi² and Eduardo R. Secchi¹

¹Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brazil

²School of Environmental Systems Engineering & Oceans Institute, University of Western Australia, Perth, Australia

³CSIRO Wealth from Oceans Flagship, Perth, Australia

⁴Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brazil

⁵Fundação Pró-Tamar, Praia do Forte, Brazil

⁶Archie Carr Center for Sea Turtle Research & Department of Biology, University of Florida, Gainesville, USA

⁷Núcleo de Educação e Monitoramento Ambiental, Rio Grande, Brazil

Abstract

Hybridization between hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) and loggerhead (*Caretta caretta*) breeding groups is unusually common in Bahia state, Brazil. Such hybridization is possible because hawksbill and loggerhead nesting activities overlap temporally and spatially along the coast of this state. Nevertheless, the destinations of their offspring are not yet known. This study is the first to identify immature hawksbill x loggerhead hybrids (n = 4) from this rookery by analyzing the mitochondrial DNA (mtDNA) of 157 immature turtles morphologically identified as hawksbills. We also compare for the first time modeled dispersal patterns of hawksbill, loggerhead, and hybrid offspring considering hatching season and oceanic phase duration of turtles. Particle movements varied according to season, with a higher proportion of particles dispersing southwards throughout loggerhead and hybrid hatching seasons, and northwards during hawksbill season. Hybrids from Bahia were not present in important hawksbill feeding grounds of Brazil, being detected only at areas more common for loggerheads. The genetic and oceanographic findings of this work indicate that these immature hybrids, which are morphologically similar to hawksbills, could be adopting behavioral traits typical of loggerheads, such as feeding in temperate waters of the western South Atlantic. Understanding the distribution, ecology, and migrations of these hybrids is essential for the development of adequate conservation and management plans.

Introduction

Interspecific hybridization occurs naturally or as a result of anthropogenic actions such as habitat modification and fragmentation, species introduction, and population declines (Rhymer and Simberloff, 1996; Allendorf et al., 2001). It is estimated that 25% of plant and 10% of animal species undergo hybridization (Mallet, 2005). This process can contribute to the evolution of many taxa (Barton, 2001), but may also lead to lower fitness and fertility, and even genetic extinction of species (Rhymer and Simberloff, 1996). In the marine environment hybridization has been described for a range of organisms including corals (Willis et al., 2006), fish (Hubbs, 2013), dolphins (Yazdi, 2002), seals (Kovacs, 1997), whales (Glover et al., 2013) and sea turtles (Karl et al., 1995). Natural hybridization between Cheloniid sea turtle species has been reported for green *Chelonia mydas* x hawksbill *Eretmochelys imbricata*, loggerhead *Caretta caretta* x hawksbill, green x loggerhead, loggerhead x olive ridley *Lepidochelys olivacea*, and olive ridley x hawksbill turtles (Wood et al., 1983; Conceição et al., 1990; Karl et al., 1995; Seminoff et al., 2003; James et al., 2004; Lara-Ruiz et al., 2006; Reis et al., 2010; Vilaça et al., 2012). Possible sterility and lower fitness of these hybrids is concerning since all sea turtle species are currently threatened (IUCN, 2012); however, the exact causes and consequences of these hybridizations are not yet understood.

In Brazil, hawksbill and loggerhead breeding groups present exceptionally high hybridization rates (Lara-Ruiz et al., 2006). The largest rookeries of both species overlap along the coast of Bahia state, where approximately 420 hawksbills and 1240 loggerheads lay their eggs each season (Marcovaldi and Chaloupka, 2007; Marcovaldi et al., 2007). They also overlap temporally, with hawksbills nesting from November to March, and loggerheads from September to February (Marcovaldi and Chaloupka, 2007; Marcovaldi et al., 2007). Studies have shown that 42% of nesting females with hawksbill morphology were actually hybridized with loggerheads, presenting the typical loggerhead mitochondrial DNA (mtDNA) haplotypes BR3 and BR4 (Lara-Ruiz et al., 2006). Since mtDNA is maternally inherited, the first generation (F1) of these hybrids is a cross between female loggerheads and male hawksbills; this could indicate a gender bias since to date no hybrids have presented hawksbill mtDNA (Vilaça and Santos, 2013). This bias has been attributed to the larger loggerhead population and the temporal overlap in nesting at the area. Since the hawksbill season begins around the loggerhead nesting peak (November – December), hawksbill males encounter an abundance of both hawksbill and loggerhead females for mating; meanwhile, by the time a large number of hawksbill females arrive,

loggerhead males have already mated and left the area (Vilaça et al., 2012). Interestingly, the hawksbill x loggerhead hybrids are reproductively viable and produce hatchlings, possibly due to an ongoing introgression process (Lara-Ruiz et al., 2006; Vilaça et al., 2012).

After hatching, hawksbill turtles undergo an epipelagic dispersal stage followed by recruitment to tropical coastal areas (Bolten, 2003), usually coral or rocky reefs, where they feed preferably upon incrusting benthic organisms such as sponges and zoanthids (León and Bjørndal, 2002; Proietti, Reisser, and Secchi, 2012). Loggerheads also undergo an initial dispersal phase but are adapted to a broader latitudinal distribution range, recruiting to coastal or oceanic areas from tropical to temperate zones, where they feed mainly upon crustaceans, mollusks and fish (Davenport, 1997; Witzell, 2002). Immature loggerhead distribution in Brazil is not well known, but recognized high-use areas include the temperate waters along the southern continental shelf and the Rio Grande rise, a seamount located ca. 800 km off of the coast (Bugoni et al., 2003; Monteiro et al., 2006; Sales et al., 2008). High-occurrence hawksbill feeding areas include the oceanic islands of Rocas Atoll, Fernando de Noronha and São Pedro and São Paulo, and the coastal islands of the Abrolhos National Marine Park (Marcovaldi et al., 1998; Proietti, Reisser, and Secchi, 2012). The genetic characterization of hawksbills at these feeding grounds has until now been limited to Rocas Atoll and Fernando de Noronha, and one hybrid individual, representing a hawksbill x loggerhead hybrid backcrossed with a hawksbill (>F1 generation), was found. However it most likely originated from West Africa since it presented an mtDNA haplotype typical of hawksbills from São Tomé and Príncipe (Monzón-Argüello et al., 2011). Therefore, despite the elevated hybridization between these species in Bahia, how hybrid offspring disperse and where they recruit to is still a mystery. This is likely due to the relatively short timespan of this phenomenon (~40 years, Lara-Ruiz et al., 2006) and limited surveys at hawksbill and loggerhead feeding grounds.

Understanding how hybridization affects the distribution and ecology of these animals is a complex task that is nevertheless fundamental when defining conservation strategies. In this work, we analyzed mtDNA of 157 immature turtles morphologically identified as hawksbills at high and occasional occurrence areas along the coast of Brazil, and modeled the dispersal patterns of turtles hatched at the Bahia rookery. We report for the first time immature hawksbill x loggerhead hybrids in Brazilian waters and show how temporal variability in hatching period leads to differences between the dispersal patterns of loggerhead, hawksbill, and hybrid offspring from Bahia. Finally, we consider the

ecological and conservation implications of this exceptionally frequent phenomenon in Brazil.

Methods

Ethics statement: this work was approved by the evaluation committee of the Biological Oceanography Doctorate Program of the Universidade Federal do Rio Grande. According to Normative Instruction 154/March 2007, all capture, tagging, sampling and transport of biological samples of wild animals for scientific purposes must have approval from Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) SISBIO committees. This study was approved by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, and conducted under SISBIO licenses #225043, #14122, and #159622. All animal handling was performed by trained personnel, following widely accepted and ethical protocols. When capturing live turtles, the following measures were taken to alleviate stress: 1) turtles were kept out of the water for a maximum of ten minutes; 2) work was performed in a shaded area; and 3) animals were released at the same location of capture.

We analyzed the mtDNA control region of 157 immature turtles morphologically identified as hawksbills from three important Brazilian hawksbill feeding grounds: (1) São Pedro and São Paulo Archipelago (SPSP; $n = 12$, Curved Carapace Length – CCL = 30 – 75 cm, mean 53.7 cm); (2) Bahia coast ($n = 32$, CCL = 21 – 72 cm, mean 39.7 cm), (3) Abrolhos National Marine Park ($n = 65$, CCL = 24.5 – 63.0 cm, mean 37.9 cm); as well as from three areas with sporadic occurrence of this species: (1) Arvoredo Biological Marine Biological Reserve ($n = 6$, CCL = 30 – 59.5 cm, mean 41.3 cm); (2) Ceará coast ($n = 23$, CCL = 22.4 – 57.5 cm, mean 37.8 cm); and (3) Cassino Beach ($n = 25$, CCL = 30 – 60 cm, mean 41 cm; Fig. 1). Loggerheads are not commonly observed at most of these areas (Reisser et al., 2008; Proietti, Reisser, & Secchi, 2012), but occur at Ceará (Marcovaldi et al., 2012) and are frequently found at Cassino Beach (Bugoni et al., 2001; Monteiro et al., 2006). Samples were collected from turtles hand-captured in dives at SPSP, Abrolhos, and Arvoredo, and from individuals incidentally caught in fishing nets or stranded on beaches (alive or dead) at Ceará, Bahia, and Cassino.

Tissue samples were macerated and kept at 37°C in a lysis buffer containing Proteinase K until complete digestion (from 8 to 24 hours). DNA was extracted using Genomic DNA Extraction Kits (Norgen Biotek) or the phenol:chloroform method adapted

from Hillis et al. (1996). mtDNA control region fragments of approximately 850 bp were amplified via Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers LCM15382/H950 (Abreu-Grobois et al., 2006), under the following conditions: denaturation of 5' at 94°C; 36 cycles of 30'' at 94°C, 30'' at 50°C, 1' at 72°C; final extension of 10' at 72°C. Illustra GFX purification kits (GE Healthcare) were used for purification, and samples were sequenced in both directions through capillary electrophoresis using an Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer. Sequences were aligned and cropped to 740 bp using Clustal X 2.0 (Larkin et al., 2007), and classified according to GenBank® and the Atlantic Ocean hawksbill haplotype database (A. Abreu-Gobrois, pers. comm., 2013).

Biophysical modeling was performed using the particle-tracking tool ICHTHYOP-3.2 (<http://www.previmer.org/en/ichthyop>), see model description in Lett et al. (2008) for details. Surface velocity fields were extracted from the global HYbrid Coordinate Ocean Model (HyCOM) with 1/12° reanalysis outputs at daily intervals (<http://hycom.org>). We chose the fourth-order Runge-Kutta numerical scheme in ICHTHYOP-3.2 to simulate Lagrangian advection of individual particles. The numerical time step was set to 180 seconds and particle trajectory position outputs were set to daily intervals. Particles were released every 5 days from the Bahia rookery (12-13° S, 37-38° W) proportionally to the monthly amount of hatched loggerheads, hawksbills, and hybrids. Particles were tracked for three years (between May 2009 to June 2013) to encompass the oceanic phase of these sea turtles, following Putman and He (2013).

The monthly proportion of nesting loggerheads and “hawksbills” (including pure and hybrids) were obtained from Marcovaldi and Chaloupka (2007) and Marcovaldi et al. (1999). We then multiplied the monthly number of nesting animals identified as hawksbills (Marcovaldi et al., 1999) by the monthly percentage of genetically-confirmed hybrid and pure hawksbills (Lara-Ruiz et al., 2006; L. Soares, unpublished data). The hatching periods of loggerheads, hawksbills, and hybrids were calculated by adding 60 days (approximate incubation period; Godfrey et al., 1999; Marcovaldi et al., 1997) to their estimated nesting periods. Finally, the proportion of particles dispersing southwards and northwards was analyzed.

Results

Of the 157 individuals sampled along the coast, four were hawksbill x loggerhead hybrids. Most of these hybrids presented the morphology of pure hawksbill turtles (Fig. 2) and were identified as such, but their mtDNA haplotype was characteristic of nesting

loggerheads of the Bahia rookery (BR3). This haplotype was present in one of 23 samples from Ceará (northeast Brazil), and in three of 19 samples from Cassino in the far South (Fig. 1). At Ceará, the hybrid was sampled after being incidentally caught in fisheries, and at Cassino all three hybrids were found dead on the beach. At Cassino one hybrid displayed carapace with overlapping scutes and serrated edges like hawksbills, but a short and thick neck typical of loggerheads (Fig. 2a). This mixed morphology brings additional evidence of this crossbreeding.

Trajectories of simulated virtual particles are shown in Fig. 3. A large proportion of particles moved to the South when released during loggerhead hatching peak (72%; December – March), reaching temperate waters of the western South Atlantic via the Brazil current. Particles released during hybrid hatching peak (January – April) showed a higher southwards displacement (44%) when compared to the hawksbill peak (37%; February – May). Northwards dispersal was higher for particles released during hawksbill (63%), followed by hybrid (56%) and loggerhead (26%) peak hatching seasons.

Discussion

In this work we begin to answer a fundamental question that arises when facing the considerable portion of hybrids that nest in Brazil: where do their hatchlings go? Although immature hybrids from the Bahia rookery remain highly undetected relative to the considerable number that is generated, reporting their occurrence at loggerhead feeding grounds (Cassino Beach and Ceará) and their absence at important hawksbill feeding grounds (e.g. Abrolhos, SPSP) is an important step towards better understanding this phenomenon (see Fig. 1). Our modeling approach also highlights the importance of sea turtle nesting season on shaping the spatial distribution of post-hatchlings, with differences observed between hawksbill, loggerhead and hybrid dispersal (see Fig. 3).

While immature hybrids were observed at areas uncommon for hawksbills, they were absent at recognized high-occurrence feeding grounds such as Fernando de Noronha and Abrolhos (this study; Vilaça et al., 2013). Despite the relatively large sample ($n = 65$) from the tropical reefs of Abrolhos, located very close to the Bahia rookery (ca. 80 km), no hybrids were detected. This could indicate that while these hybrids are morphologically similar to hawksbills, they are not recruiting to the same feeding grounds of pure hawksbills. Three hybrids were found at Cassino Beach, a temperate sandy coast that lacks the optimal characteristics for hawksbill survival (e.g. abundance of preferred food items,

relatively high temperatures; Davenport, 1997) and possess few records of this species (Monteiro et al., 2006). Loggerheads on the other hand are commonly found foraging at this region, suggesting that immature hybrids could be adopting the feeding and migration ecology of loggerheads. Similarly, Witzell and Schmid (2003) reported the occurrence of an immature hawksbill x loggerhead hybrid that established its home range in a loggerhead feeding ground.

Adult hawksbill x loggerhead hybrids from Bahia have also been shown to present a distinct ecology when compared to their pure hawksbill counterparts. Marcovaldi et al. (2012) tracked pure hawksbills and hawksbill x loggerhead hybrids after nesting in Bahia and showed different post-nesting migration patterns. Most tracked animals moved along the continental shelf, with all pure hawksbills occupying feeding areas along the eastern coast (Bahia and Alagoas states) while most hybrid females travelled to the northern coast, including Ceará where we detected an immature hybrid. Ceará is an important feeding ground for loggerheads that nest along the coast of Bahia as demonstrated by satellite tracking (Marcovaldi et al., 2010), indicating that the mature female hybrids adopt the behavior of loggerheads. This could also be a possibility for the immature hybrid we detected at the area.

Our biophysical simulations showed that post-hatchling dispersal from Bahia varied according to species: southwards dispersal was proportionally larger throughout loggerhead, followed by hybrid, and lowest during hawksbill peak hatching season. The factors influencing how hybrid sea turtles adopt different feeding and migration behaviors are unknown. Ocean currents influence the dispersal of sea turtle post-hatchlings and are believed to shape the posterior spatial distribution of juveniles and adults (Luschi et al., 2003; Amorochio et al., 2012; Proietti et al., 2012b; Putman et al., 2012, 2014; Putman and He, 2013). The model presented here shows that hybrids could have a higher chance of reaching the temperate waters of South Brazil when compared to pure hawksbills. This indicates that these hybrids could already be adopting loggerhead features once they reach the water after hatching. Although pure hawksbills also produce southwards-dispersing hatchlings, they could be limited to lower latitudes by food availability and water temperature, while hybrids could present a behavioral pattern more similar to loggerheads and possibly occupy a wider niche.

The causes behind the extensive hybridization between hawksbills and loggerheads at the Bahia rookery are still unclear, but could be a result of anthropogenic population declines and uneven population sizes of different species (Lara-Ruiz et al., 2006; Vilaça et

al., 2012). It is unknown if this hybridization is threatening the fitness and survival of animals, and the phenomenon should be further investigated for defining whether special measures should be taken when managing these populations. International collaboration might be necessary for determining such management approaches since our particle model shows that ocean currents could transport hybrid turtles from Bahia to distant areas such as Uruguay, Argentina, West African coast, and Western Indian region. Extensive genetic studies in areas of recognized and potential hybrid occurrence, such as loggerhead habitats, are of upmost importance. These studies should combine mtDNA with biparentally-inherited marker analyses for obtaining a better understanding of hawksbill x loggerhead hybrid distribution, parental species and generations. Studies on reproductive and survivorship parameters are also essential for verifying potential negative impacts of this process on long-term viability of local sea turtle populations. Satellite tracking, stable isotopes and diet analyses can also be used to confirm if their movements and feeding habits follow a distinctive pattern. Such studies would provide valuable insight on how the ecology and behavior of sea turtles are affected by hybridization, and consequently guide management practices and strategies to conserve their populations.

Acknowledgements

M.C.P. is a graduate student of the Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (FURG), and is sponsored by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior in Brazil (CAPES). J.R. is sponsored by the International Postgraduate Research Scholarship (IPRS) and CSIRO's Flagship Postgraduate Scholarship, and E.R.S. is sponsored by CNPq (307843/2011-4). We thank ICMBio, Pata da Cobra Diving, Brazilian Navy, CECIRM PRO-Arquipélago, Abrolhos Park coordination, and all field assistants (a special thanks to B. Barbosa) for logistic/field support. We acknowledge Núcleo de Educação e Monitoramento Ambiental (NEMA), Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM) and Projeto Tamar for providing samples. This is a contribution of the Research Group 'Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha – EcoMega'.

References

Abreu-Grobois F, Horrocks J, Formia A, Dutton P, LeRoux R, Vélez-Zuazo X, Soares L, Meylan P. 2006. New mtDNA Dloop primers which work for a variety of marine

- turtle species may increase the resolution of mixed stock analyses. In: Frick M, Panagopoulou A, Rees A, Williams K (eds) Book of Abstracts, Twenty-sixth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. International Sea Turtle Society, Athens, Greece, p 179
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16:613–622
- Amoroch DF, Abreu-Grobois FA, Dutton PH, Reina RD. 2012. Multiple distant origins for green sea turtles aggregating off Gorgona Island in the Colombian eastern Pacific. *PLoS One* 7:e31486
- Barton NH. 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* 10:551–68
- Bérubé M, Aguilar A. 1998. A new hybrid between a blue whale, *Balaenoptera musculus*, and a fin whale, *B. physalus*: frequency and implications of hybridization. *Marine Mammal Science* 14:82–98
- Bolten A. 2003. Variation in sea turtle life history patterns: neritic vs. oceanic developmental stages. In: Lutz P, Musick J, Wyneken J (eds) The Biology of Sea Turtles, Vol 2. CRC Press, Boca Raton, FL, p 243–257
- Bugoni L, Krause L, Petry MV. 2001. Marine debris and human impacts on sea turtles in southern Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 42:1330–4
- Bugoni L, Krause L, Petry MV. 2003. Diet of sea turtles in southern Brazil. *Chelonian Conservation Biology* 4:685–687
- Conceição M, Levy J, Marins L, Marcovaldi M. 1990. Electrophoretic characterization of a hybrid between *Eretmochelys imbricata* and *Caretta caretta* (Cheloniidae). *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology* 97B:275–278
- Davenport J. 1997. Temperature and the life-history strategies of sea turtles. *Journal of Thermal Biology* 22:479–488
- Glover KA, Kanda N, Haug T, Pastene LA, Øien N, Seliussen BB, Sørvik AGE, Skaug HJ. 2013. Hybrids between common and Antarctic minke whales are fertile and can back-cross. *BMC Genetics* 14:25
- Godfrey MH, Amato AFD, Marcovaldi MÂ, Mrosovsky N. 1999. Pivotal temperature and predicted sex ratios for hatchling hawksbill turtles from Brazil. *Canadian Journal of Zoology* 77:1465–1473
- Hillis D, Mable B, Larson A, Davis S, Zimmer E. 1996. Nucleic acids IV: sequencing and cloning. In: Hillis D, Moritz C, Mable B (eds) Molecular systematics, 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, p 321–381
- Hubbs CL. 2013. Hybridization between fish species in nature. *Systematic Zoology* 4:1–20

- IUCN. 2012. The IUCN Red List of Threatened Species, version 2012.2 Available at iucnredlist.org (Accessed on July 21, 2013)
- James M, Martin K, Dutton P. 2004. Hybridization between a green turtle, *Chelonia mydas*, and a loggerhead turtle, *Caretta caretta*, and the first record of a green turtle in Atlantic Canada. *Canadian Field Naturalist* 118:579–582
- Karl S, Bowen B, Avise J. 1995. Hybridization among the ancient mariners: characterization of marine turtle hybrids with molecular genetic assays. *Journal of Heredity* 86:262–8
- Kovacs K. 1997. A harp seal x hooded seal hybrid. *Marine Mammal Science* 13:460–468
- Lara-Ruiz P, Lopez GG, Santos FR, Soares LS. 2006. Extensive hybridization in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. *Conservation Genetics* 7:773–781
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–8
- León YM, Bjørndal KA. 2002. Selective feeding in the hawksbill turtle, an important predator in coral reef ecosystems. *Marine Ecology Progress Series* 245:249–258
- Lett C, Verley P, Mullon C, Parada C, Brochier T, Penven P, Blanke B. 2008. A Lagrangian tool for modelling ichthyoplankton dynamics. *Environmental Modelling and Software* 23:1210–1214
- Luschi P, Hays GC, Papi F. 2003. A review of long-distance movements by marine turtles, and the possible role of ocean currents. *Oikos* 103:293–302
- Mallet J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution* 20:229–237
- Marcovaldi MÂ, Baptistotte C, Castilhos JC, Gallo BMG, Lima EHSM, Sanches TM, Vieitas CF. 1998. Activities by Project TAMAR in Brazilian Sea Turtle Feeding Grounds. *Marine Turtle Newsletter* 80:5–7
- Marcovaldi M, Chaloupka M. 2007. Conservation status of the loggerhead sea turtle in Brazil: an encouraging outlook. *Endangered Species Research* 3:133–143
- Marcovaldi MA, Godfrey MH, Mrosovsky N. 1997. Estimating sex ratios of loggerhead turtles in Brazil from pivotal incubation durations. *Canadian Journal of Zoology* 75:755–770
- Marcovaldi M, Lopez G, Soares L, Lima E, Thomé J, Almeida A. 2010. Satellite-tracking of female loggerhead turtles highlights fidelity behavior in northeastern Brazil. *Endangered Species Research* 12:263–272

- Marcovaldi M, Lopez G, Soares L, López-Mendilaharsu M. 2012. Satellite tracking of hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata* nesting in northern Bahia, Brazil: turtle movements and foraging destinations. *Endangered Species Research* 17:123–132
- Marcovaldi MA, Lopez GG, Soares LS, Santos AJB, Bellini C, Barata PCR. 2007. Fifteen years of hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Northern Brazil. *Chelonian Conservation and Biology* 6:223–228
- Marcovaldi M, Vieitas CF, Godfrey MH. 1999. Nesting and conservation management of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in northern Bahia, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology* 3:301–307
- Monteiro D, Bugoni L, Estima S. 2006. Strandings and sea turtle fisheries interactions along the coast of Rio Grande do Sul state, Brazil. In: Frick M, Panagopoulou A, Rees A, Williams K (eds) Book of Abstracts, Twenty-sixth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. International Sea Turtle Society, Athens, Greece, p 257
- Monzón-Argüello C, Loureiro NS, Delgado C, Marco A, Lopes JM, Gomes MG, Abreu-Grobois FA. 2011. Príncipe island hawksbills: genetic isolation of an eastern Atlantic stock. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 407:345–354
- Proietti M, Reisser J, Kinas P, Kerr R, Monteiro D, Marins L, Secchi E. 2012. Green turtle *Chelonia mydas* mixed stocks in the western South Atlantic, as revealed by mtDNA haplotypes and drifter trajectories. *Marine Ecology Progress Series* 447:195–209
- Proietti MC, Reisser J, Secchi ER. 2012. Foraging by immature hawksbill sea turtles at Brazilian islands. *Marine Turtle Newsletter* 135:4–6
- Putman NF, Abreu-grobois FA, Broderick AC, Cio C, Formia A, Godley BJ, Stroud S, Pelembe T, Verley P, Williams N. 2014. Numerical dispersal simulations and genetics help explain the origin of hawksbill sea turtles in Ascension Island. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 450:98–108
- Putman N, He R. 2013. Tracking the long-distance dispersal of marine organisms: sensitivity to ocean model resolution. *Journal of the Royal Society Interface* 10: 20120979
- Putman NF, Verley P, Shay TJ, Lohmann KJ. 2012. Simulating transoceanic migrations of young loggerhead sea turtles: merging magnetic navigation behavior with an ocean circulation model. *Journal of Experimental Biology* 215:1863–1870
- Reis EC, Soares LS, Lôbo-Hajdu G. 2010. Evidence of olive ridley mitochondrial genome introgression into loggerhead turtle rookeries of Sergipe, Brazil. *Conservation Genetics* 11:1587–1591
- Reis EC, Soares LS, Vargas SM, Santos FR, Young RJ, Bjorndal K a., Bolten AB, Lôbo-Hajdu G. 2009. Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. *Conservation Genetics* 11:1467–1477

- Reisser J, Proietti M, Kinas P, Sazima I. 2008. Photographic identification of sea turtles: method description and validation, with an estimation of tag loss. *Endangered Species Research* 5:73–82
- Rhymer M, Simberloff D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 27:83–109
- Sales G, Giffoni B, Barata P. 2008. Incidental catch of sea turtles by the Brazilian pelagic longline fishery. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 88:853–864
- Seminoff JA, Karl SA, Schwartz T, Resendiz A. 2003. Hybridization of the green turtle (*Chelonia mydas*) and hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in the Pacific Ocean: indication of absence of gender bias in the directionality of crosses. *Bulletin of Marine Science* 73:643–652
- Vilaça ST, Lara-Ruiz P, Marcovaldi MA, Soares LS, Santos FR. 2013. Population origin and historical demography in hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) feeding and nesting aggregates from Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 446:334–344
- Vilaça ST, Santos FR. 2013. Molecular data for the sea turtle population in Brazil. *Dataset Papers in Science* 2013:1–7
- Vilaça ST, Vargas SM, Lara-Ruiz P, Molfetti É, Reis EC, Lôbo-Hajdu G, Soares LS, Santos FR. 2012. Nuclear markers reveal a complex introgression pattern among marine turtle species on the Brazilian coast. *Molecular Ecology* 21:4300–4312
- Willis BL, Oppen MJH van, Miller DJ, Vollmer SV, Ayre DJ. 2006. The role of hybridization in the evolution of reef corals. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 37:489–517
- Witzell W. 2002. Immature Atlantic loggerhead turtles (*Caretta caretta*): suggested changes to the life history model. *Herpetological Review* 33:266–269
- Witzell WN, Schmid JR. 2003. Multiple recaptures of a hybrid hawksbill-loggerhead turtle in the Ten Thousand Islands, Southwest Florida. *Herpetological Review* 34:323–325
- Wood J, Wood F, Critchley K. 1983. Hybridization of *Chelonia mydas* and *Eretmochelys imbricata*. *Copeia* 1983:839–842
- Yazdi P. 2002. A possible hybrid between the dusky dolphin (*Lagenorhynchus obscurus*) and the southern right whale dolphin (*Lissodelphis peronii*). *Aquatic Mammals* 28:211–217

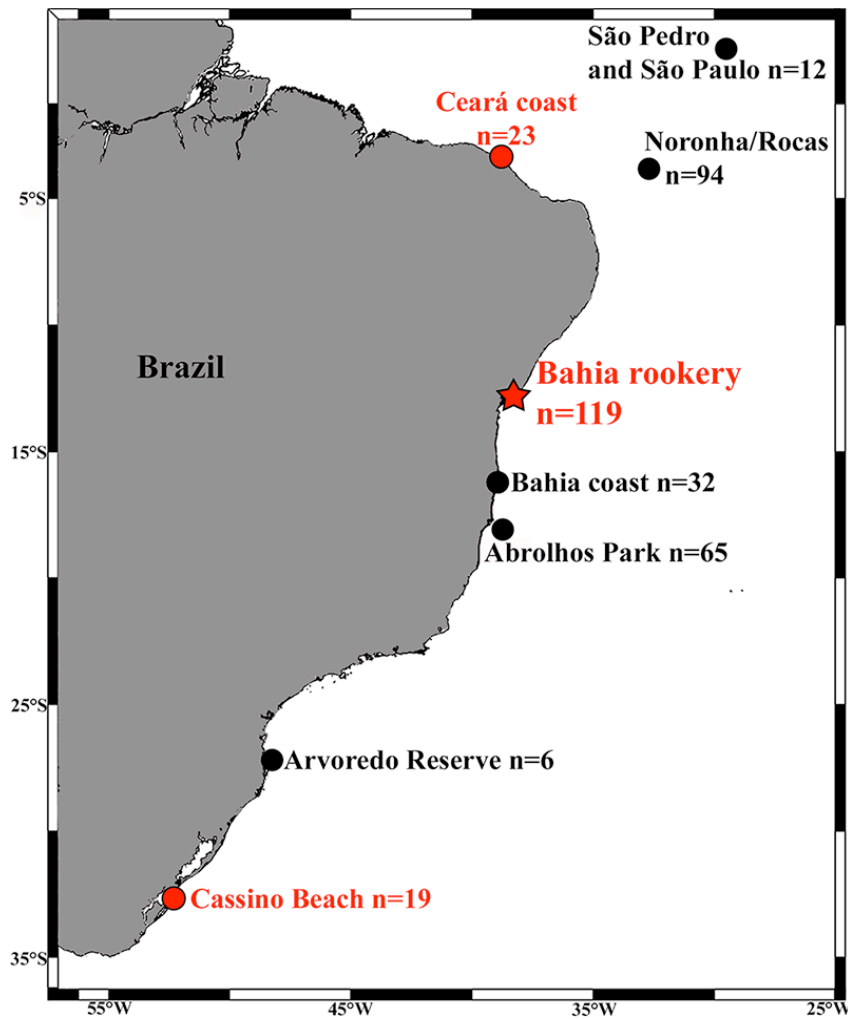


Figure 1. Locations and sample sizes of genetically-described immature hawksbill areas (dots) and the Bahia rookery (red star), in Brazil. Red dots indicate detection of hawksbill x loggerhead sea turtle hybrids from the Bahia rookery.

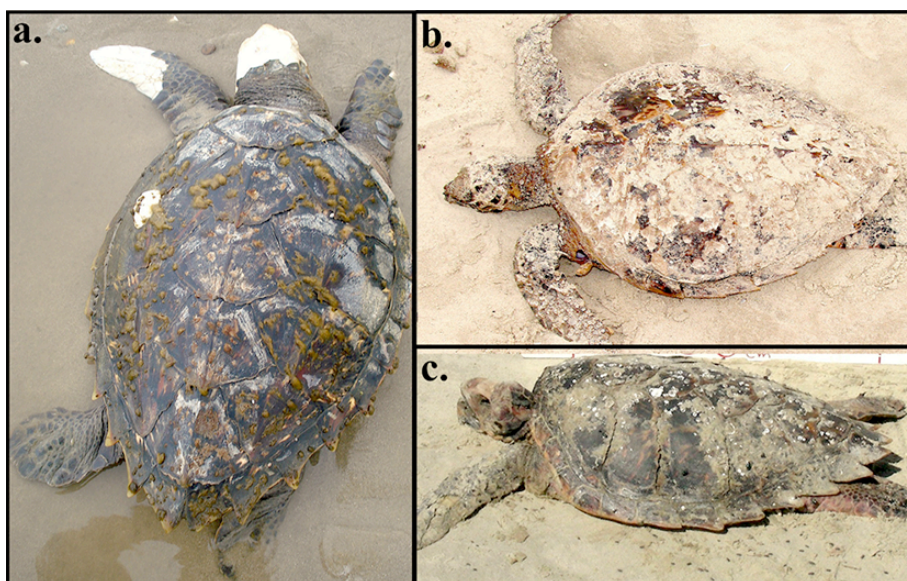


Figure 2. Sampled hawksbill x loggerhead sea turtles at Cassino Beach, South Brazil. Note the relatively large head and thick neck of the individual in a. Photo credits: Nema archive (a,b) and Jonatas H. Prado (c).

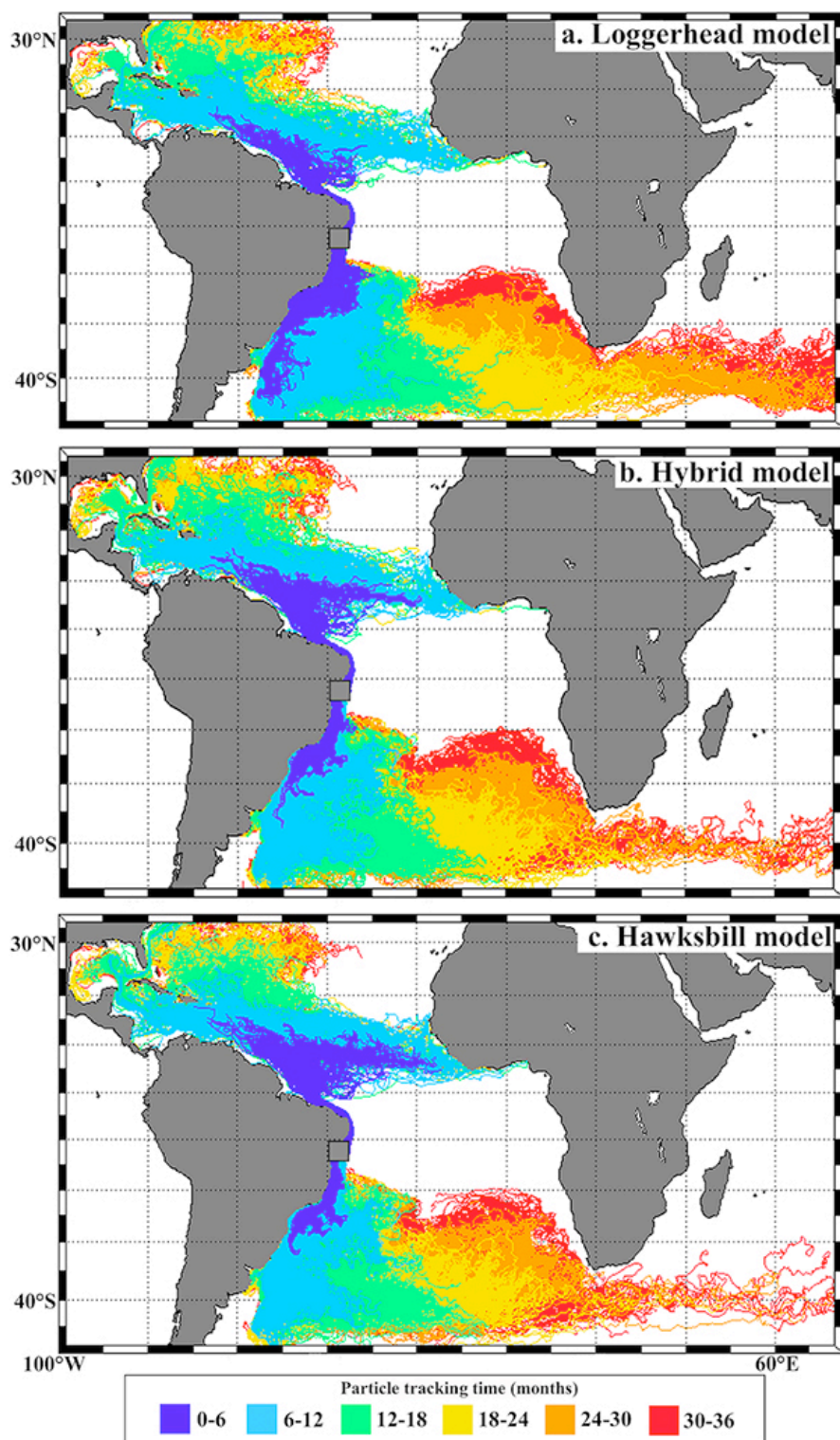


Figure 3. Virtual particles leaving the Bahia rookery during loggerhead (a), hybrid (b) and hawksbill (c) hatching seasons.

Artigo 3: Genetic structure and natal origins of immature hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in Brazilian waters

Aceito para publicação na revista *PlosOne*

Maira C. Proietti¹, Julia Reisser^{2,3}, Luis Fernando Marins⁴, Clara Rodriguez-Zarate⁵, Maria A. Marcovaldi⁶, Danielle S. Monteiro^{1,7}, Charitha Pattiaratchi² & Eduardo R. Secchi¹

¹Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

²Oceans Institute and School of Civil, Environmental and Mining Engineering, The University of Western Australia, Perth, Western Australia, Australia

³Wealth from Oceans Flagship, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Floreat, Western Australia, Australia

⁴Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

⁵School of Biological Sciences, Flinders University, Adelaide, South Australia, Australia

⁶Fundação Pró-Tamar, Praia do Forte, Bahia, Brazil

⁷Núcleo de Educação e Monitoramento Ambiental, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

*Corresponding author: mairaproietti@gmail.com

Abstract

Understanding the connections between sea turtle populations is fundamental for their effective conservation. Brazil hosts important hawksbill feeding areas, but few studies have focused on how they connect with nesting populations in the Atlantic. Here, we (1) characterized mitochondrial DNA control region haplotypes of immature hawksbills feeding along the coast of Brazil (five areas ranging from equatorial to temperate latitudes, 157 tissue samples), (2) analyzed genetic structure among Atlantic hawksbill feeding populations, and (3) inferred natal origins of hawksbills in Brazilian waters using genetic, oceanographic, and population size information. We report ten haplotypes for the sampled Brazilian sites, most of which were previously observed at other Atlantic feeding grounds and rookeries. Genetic profiles of Brazilian feeding areas were significantly different from those in other regions (Caribbean and Africa), and a significant structure was observed between Brazilian feeding grounds grouped into areas influenced by the South Equatorial/North Brazil Current and those influenced by the Brazil Current. Our genetic analysis estimates that the studied Brazilian feeding aggregations are mostly composed of animals originating from the domestic rookeries Bahia and Pipa, but some contributions from African and Caribbean rookeries were also observed. Oceanographic data corroborated the local origins, but showed higher connection with West Africa and none

with the Caribbean. High correlation was observed between origins estimated through genetics/rookery size and oceanographic/rookery size data, demonstrating that ocean currents and population sizes influence haplotype distribution of Brazil's hawksbill populations. The information presented here highlights the importance of national conservation strategies and international cooperation for the recovery of endangered hawksbill turtle populations.

Keywords: sea turtles, mtDNA, population structure, mixed stock analysis, surface drifters, hatchling dispersal

Introduction

After hatching, sea turtles often present an epipelagic stage characterized by wide dispersal, many times over national boundaries and even oceans [1]. This stage is generally followed by recruitment to coastal areas with adequate conditions for feeding, resting and development [2]. Understanding how populations connect and how animals disperse from rookeries to feeding areas is a challenging task, but is essential for setting priorities and defining management strategies for conservation [3]. In this context, molecular genetic data have been fundamental in obtaining relevant information on interpopulational connectivity, migrations and natal origins of marine turtle feeding populations [4–7].

Feeding grounds are generally composed of individuals originating from a mixture of sources, being therefore known as “mixed stocks”. Mitochondrial DNA (mtDNA) haplotype frequencies can be used to determine connections between sea turtles at a feeding ground to their areas of origin (rookeries) by Mixed Stock Analysis (MSA), which uses Markov Chain Monte Carlo (MCMC) sampling to estimate the rookery origins of individuals [8]. “Many-to-many” MSA simultaneously estimates origins and destinations of a meta-population of multiple feeding grounds and rookeries [9], providing a more comprehensive understanding of how areas are linked, and the possible movements that animals undertake. It is usually accepted that these movements are influenced by ocean currents: dispersal at the initial epipelagic phase is thought to be mainly shaped by currents due to the low swimming capability of hatchlings [1,10]; as animals grow and attain more autonomous movement, it is believed that the influence of currents on migrations weakens, but still occurs [11]. The dispersal of post-breeding sea turtles could in fact reflect their previous drift scenarios as hatchlings, with prevailing ocean currents around nesting areas possibly determining how adult turtles select their foraging sites [12]. Multidisciplinary

approaches using oceanographic and genetic information are being increasingly applied to studies of the dispersal and migration patterns of sea turtles (e.g. [7,13–15]).

Understanding migratory pathways and origins of animals at their non-reproductive stages is important for determining how impacts such as direct harvest, habitat degradation, and bycatch in fisheries can be shared by seemingly separate populations that are in fact connected [3]. This is of special significance for the critically endangered [16] hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*), since the tortoiseshell commerce is still debated by the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES) [17]. Due to the uncertainty of how a harvest/other impacts in one area will affect other rookeries and feeding areas, effective conservation and/or sustainable use strategies must be based on the extent of connectivity between hawksbill populations; this type of research is therefore a priority for this highly migratory and endangered species [18].

Important hawksbill nesting and feeding areas exist along the Brazilian coast [19–23], but the connections between them are still largely unknown [24]. Here, we decrease this gap by describing 740bp mtDNA haplotypes of hawksbills from five Brazilian feeding aggregates, assessing genetic structure, and estimating natal origins through many-to-many MSA analysis. In addition, we verify the influence of ocean currents on connectivity, inferring origins by analyzing surface drifter data for the Atlantic.

Material and Methods

Ethics statement

According to Normative Instruction 154/March 2007, all capture, tagging, sampling and transport of biological samples of wild animals for scientific purposes must have approval from Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) SISBIO committees. This study was approved by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, and conducted under SISBIO licenses #225043, #14122, and #159622. All animal handling was performed by trained personnel, following widely accepted and ethical protocols described in [25]. When capturing live turtles, the following measures were taken to alleviate stress: 1) turtles were kept out of the water for a maximum of ten minutes; 2) work was performed in a shaded area; and 3) animals were released at the same location of capture.

Sampling and laboratory analyses

Skin samples were obtained from 157 immature hawksbills at five areas in Brazilian waters ranging from equatorial to temperate latitudes: (1) São Pedro and São Paulo Archipelago (SPSP, $n = 12$); (2) Abrolhos National Marine Park (Abrolhos, $n = 65$), (3) Ceará state coast (Ceará, $n = 23$); (4) Bahia state coast (Bahia, $n = 32$); and (5) South Brazil region, which combines the Arvoredo Marine Biological Reserve ($n = 6$) and Cassino Beach ($n = 19$). The Arvoredo and Cassino areas were grouped due to small sample size and geographical isolation regarding the other feeding grounds. Two skin samples with approximately 4-5 mm were collected from the fore flippers of each turtle using disposable biopsy punches, and preserved in absolute alcohol. Samples were taken from turtles hand-captured by divers at SPSP, Abrolhos, and Arvoredo, as well as from individuals incidentally caught in fishing nets or stranded on beaches (alive or dead) at Ceará, Bahia, and Cassino Beach. All animals were measured (Curved Carapace Length – CCL), and live turtles were tagged with Inconel Tags (National Tag and Band Co.) using standard techniques [26,27] prior to release. Sampling locations are shown in Figure 1.

Samples were macerated and kept at 37°C in a lysis buffer until complete digestion. DNA was extracted using Genomic DNA Extraction Kits (Norgen Biotek) or a standard phenol:chloroform method [28]. mtDNA control region fragments of approximately 850 bp were amplified via Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers LCM15382/H950 [29], as follows: 5' at 94°C; 36 cycles of 30'' at 94°C, 30'' at 50°C, 1' at 72°C; 10' at 72°C. Samples were purified with Illustra GFX purification kits (GE Healthcare) and sequenced in both directions through capillary electrophoresis using the Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer (Valid Biotechnology, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil).

Haplotypes and diversities

Sequences were aligned and cropped to 740 bp using Clustal X 2.0 [30], and classified according to GenBank® and the Atlantic Ocean hawksbill haplotype database (under construction, Abreu-Gobrois pers. comm.). We used 740 bp haplotypes for genetic structure analyses between Brazilian populations, but for comparison with all other Atlantic Ocean feeding grounds and rookeries described in literature, a second cropping to 382 bp (original classification, [31]) was necessary. Arlequin 3.5 [32] was used to assess haplotype (h) and nucleotide (π) diversities of the study areas.

Genetic structure

Genetic divergence between feeding populations was verified in Arlequin 3.5 through pairwise fixation indices F_{st} and ϕ_{st} , respectively using haplotype frequencies only and a Tamura-Nei model of nucleotide substitution (as determined through jModelTest 0.1.1, [33]). Besides our study areas, the following feeding aggregations were included in genetic structure analyses: (1) Fernando de Noronha/Rocas Atoll, Brazil (referred to as Noronha, $n = 94$ samples); (2) São Tomé Island, São Tomé and Príncipe ($n = 80$); (3) Boavista Island, Cape Verde ($n = 28$); (4) Buck Island, U.S. Virgin Islands ($n = 69$); (5) Mona Island, Puerto Rico ($n = 256$); (6) Dominican Republic ($n = 90$); (7) Turks and Caicos ($n = 38$); (8) Bahamas ($n = 78$); (9) Cuba ($n = 210$); (10) Cayman Islands ($n = 92$); (11) Yucatán, Mexico ($n = 21$); (12) Texas coast, U.S.A. ($n = 42$); and (13) Florida, U.S.A. ($n = 106$) ([4–7,24,34–38], for locations see Figure 1). Analysis of Molecular Variance (AMOVA) was implemented to verify ocean basin structure by grouping Atlantic feeding grounds into Brazilian, African, Caribbean and Gulf of Mexico regions. To identify regional structure within Brazilian waters, we divided feeding grounds into two groups: areas influenced mainly by the South Equatorial/North Brazil Current (SPSP, Noronha and Ceará) and those influenced by the Brazil Current (Bahia, Abrolhos and South Brazil).

Natal origins

A many-to-many MSA using the “mixstock” package in R [9,39] was performed to estimate source contributions to the study areas in Brazil (feeding ground-centric), as well as the destinations of animals hatched at Brazilian rookeries (rookery-centric). We included all above-cited Atlantic foraging grounds (18 areas, $n = 1361$ individuals) and thirteen rookeries ($n = 875$) in this metapopulational analysis: (1) Bahia/Sergipe coasts (referred to as Bahia, $n = 92$); (2) Pipa Beach (referred to as Pipa, $n = 27$); (3) Príncipe Island ($n = 20$); (4) Barbados ($n = 84$); (5) Trois Island, Guadeloupe ($n = 74$); (6) Jumby Bay, Antigua and Barbuda ($n = 70$); (7) Buck Island, U.S. Virgin Islands ($n = 67$); (8) Mona Island, Puerto Rico ($n = 93$); (9) Jaragua and Saona, Dominican Republic ($n = 48$); (10) Doce Leguas, Cuba ($n = 70$); (11) Tortuguero, Costa Rica ($n = 60$); (12) Pearl Cays, Nicaragua ($n = 95$); (13) Yucatán and Quintana Roo, Mexico ($n = 73$) ([4,5,35,38,40–44], locations shown in Figure 1). Nesting population size (estimated number of females per nesting season) of each area was included in this analysis as an ecological covariate, following [9]. One MCMC was implemented for each rookery, with chain lengths of 20000, and one half chain discarded as “burn-in”. Gelman-Rubin convergence factors

varied from 1.0 to 1.04 (average 1.02), indicating convergence. Hybrid haplotype EixCcBR3, from the Bahia rookery, was maintained in the MSA since it was also observed at feeding areas; orphan haplotypes were excluded.

Lagrangian drifter data was also used to infer on the possible role of ocean currents on the dispersal of hatchlings, following [15]. For such, we downloaded surface drifter data freely available from NOAA's Global Drifter Program (www.aoml.noaa.gov/envids/gld). Areas with size 4° x 4° (latitude and longitude) were delineated around all rookeries considered in MSA (n = 13), and the number of drifters that passed through them and reached the Brazilian foraging grounds was counted (drifters with less than three months of transmission were excluded). Feeding areas with similar drifter patterns were grouped into target regions for simplification: 1) SPSP; 2) Noronha and Ceará; and 3) Bahia, Abrolhos and South Brazil. Based on these drifter counts and rookery population size information (females/nesting season), the probability that a turtle arriving at the target region originated from a previously characterized rookery was calculated under a Bayesian framework (for method details refer to [15]).

Finally, natal origin estimates inferred by genetic/rookery size and drifters/rookery size data were compared to better assess the influence of ocean currents on feeding grounds aggregations in Brazil. We evaluated this correlation through a Mantel test implemented with the package “vegan” in R [39,45], and performed linear regression by regressing log-transformed proportions between genetic and drifter profiles.

Results

Haplotypes and diversities

Haplotype diversities (h) of Atlantic feeding areas ranged from 0.143 ± 0.052 at Principe to 0.761 ± 0.035 at Turks and Caicos, with average h of 0.538 ± 0.050 . Brazilian feeding ground diversity ranged from 0.215 ± 0.052 at Abrolhos to 0.644 ± 0.124 at SPSP; average h was 0.418 ± 0.088 . We found ten 740 bp haplotypes, with high occurrence (almost 80%) of haplotype A01, followed by a frequency of approximately 8% of A62, and less than 4% for all other haplotypes (Table 1). We found one new haplotype (A92) and four hawksbill x loggerhead (*Caretta caretta*) hybrid sequences (EixCcBR3). When considering only the 382 bp fragment, the number of haplotypes dropped to eight. Short haplotype frequencies (382 bp) of all Atlantic Ocean populations considered in our study can be visualized in Figure 2 and Table S1. Table 2 shows haplotype diversities for all genetically described hawksbill populations in the Atlantic, along with biological

information of areas: Curved Carapace Length (CCL) of immature animals at feeding grounds (Loureiro N, Shaver D pers comm, [6,19,34,36,46–52]) and population size of rookeries [17,22,23,44,53–57].

Genetic structure

We detected overall significant genetic difference between and within nesting and feeding populations in the Atlantic Ocean ($p < 0.001$). F -st and ϕ -st values show that feeding aggregations are not homogenous throughout the Atlantic (Table 3), with significant regional differences: AMOVA confirmed a pronounced structure between Brazilian, African and Caribbean feeding populations (F -st = 0.618, $p < 0.001$). Structure was also high when dividing feeding areas into Brazil, Africa, Caribbean and Gulf of Mexico groups (F -st = 0.553, $p < 0.001$). Within Brazilian feeding aggregations, some differences were observed (see Table 3), with two areas being more differentiated from the remainder: the oceanic islands of Fernando de Noronha/Rocas Atoll, off the northeastern coast of Brazil, and the southernmost hawksbill occurrence area, South Brazil. Structure was significant (F -st = 0.581, $p < 0.001$) between areas under influence of the South Equatorial/North Brazil Current (SPSP, Noronha and Ceará) and those influenced by the Brazil Current (Bahia, Abrolhos and South Brazil).

Natal origins

Many-to-many MSA estimates suggest that the feeding aggregations in Brazil are mostly composed of animals originating from domestic rookeries, but also present some distant origins (Figure 3a). The Brazilian rookeries Bahia and Pipa were the predominant sources, with respective contributions of approximately 12% and 28% for SPSP, 30% and 22% for Noronha, 22% and 18% for Ceará, 36% and 17% for Bahia, 21% and 28% for Abrolhos, 34% and 30% for South Brazil. Rookeries from Africa and the Caribbean showed generally lower but noteworthy contributions: Príncipe, Barbados and Cuba contributed respectively 8%, 10% and 14% to Noronha; Barbados, Puerto Rico and Cuba 12%, 9% and 13% to SPSP; Barbados and Cuba 12% and 15% to Ceará, 9% and 10% to Bahia, 8% and 13% to Abrolhos.

Rookery-centric MSA results for the Brazilian rookeries of Bahia and Pipa shows that these nesting areas contribute mainly to the domestic feeding populations: respectively 6% and 16% to SPSP; 12% and 9% to Ceará; 20% and 10% to Bahia; 11% and 17% to Abrolhos; 18% and 18% to South Brazil; and 10% and 12% to Noronha (Figure 3b). All

other contributions were lower than 5%. MSA outputs for overseas feeding grounds and rookeries (not discussed in this study) are presented in Figures S1 and S2.

Of the available drifter data, a total of 469 drifters passed through the Atlantic rookeries, of which 388 transmitted for over three months. Of these, 37 drifters arrived at our three target areas in Brazil, originating from the Bahia, Pipa and Principe rookeries (trajectories shown in Figure 4). Displacements from rookeries to Brazilian feeding areas were most likely by means of the North Brazil Current for drifters leaving the Pipa rookery, North Brazil/Brazil Current for those leaving Bahia, and South Equatorial Current for drifters from Principe. No drifters from the Caribbean arrived at the Brazilian coastline (see Figure S3). When estimating natal origins of hawksbills at our target areas through drifter/population size data, significant contributions were: Pipa (58%), Bahia (9%) and Cuba (11%) for SPSP; Pipa (62%), Bahia (14%) and Cuba (10%) for Noronha/Ceará; and Bahia (72%) for Abrolhos/Bahia/South Brazil (Table 4). Correlation between natal origins as calculated by MSA (which included genetic/rookery size data) and drifters/rookery size information was significant (Mantel test, $r = 0.791$, $p < 0.05$; linear regression $r = 0.560$, $p < 0.01$; Figure 5).

Discussion

Haplotypes and diversities

As illustrated in Figure 2, several haplotypes observed at Brazilian feeding areas are common at rookeries located in the Caribbean (A01/A, A09/F, A11/F, A24/Q), Brazil (A32, A62, EixCcBR3) and Africa (EATL). We also detected two orphan haplotypes (i.e. not seen at rookeries): A76 and A92 (the latter previously undescribed); as noted in [35,58], the presence of orphan haplotypes indicates the need for further sampling of rookeries. Mean haplotype diversity of feeding areas in Brazil was 0.413, which is higher than the mean diversity of the two described feeding grounds off West Africa ($h = 0.335$), but lower than the diversity of ten populations in the Caribbean ($h = 0.647$). These low diversities could be a result of natal origins from fewer, less diverse sources when compared to the Caribbean, where a large number of rookeries with relatively high diversities are present. SPSP and Noronha, located respectively around 350 and 1000 km off northeast Brazil, presented the highest haplotype diversities between the sampled Brazilian feeding grounds. Bass et al. (2006) suggest that feeding areas located at the confluence of several current systems present higher haplotype diversities [59]; Vilaça et al. (2013) propose that Noronha's location, influenced by both the North Brazilian and

South Equatorial Currents, is a possible explanation for its elevated diversity [24]. Our results support the hypothesis that ocean currents influence diversity since SPSP, located near Noronha, showed highest diversity values among all Brazilian feeding grounds.

Genetic structure

Our study suggests regional genetic structuring within the Atlantic, between (i) foraging areas off Brazil, Africa and the Caribbean, a pattern that has been previously noted [24], and (ii) feeding areas in the Gulf of Mexico and the remainder within the Caribbean. Although turtles disperse widely, they can be constrained to certain regions due to factors such as geographical distance, rookery population size, animal behavior and surface ocean currents. For instance, the Gulf of Mexico presents a distinct current pattern (as shown in Figure S3) that could retain animals within the region. In a general manner differentiation between Brazilian feeding grounds was not pronounced, but significant structuring was observed when grouping Brazilian populations into groups influenced by different ocean currents. This suggests that migration patterns are somewhat limited, and that genetic composition could be affected by the different factors noted above. We highlight here the importance of analyzing longer haplotype sequences, which present higher resolution and better detect population structure [40,60]. Although longer haplotypes are being increasingly analyzed, past hawksbill turtle studies mostly characterize 382 bp fragments; it is important that future studies focus on larger fragments to improve our understanding on structure and connectivity of hawksbill populations.

Natal origins

Many-to-many MSA showed that feeding aggregations in Brazil are generally composed of animals from limited sources, being mostly linked to the proximal Brazilian rookeries. Results also indicated that in some cases connectivity extends to rookeries located in the Caribbean and West Africa. Origins calculated from drifter data support main contributions from Bahia and Pipa, with almost all drifters arriving from national rookeries to the Brazilian feeding grounds, via the North Brazil and Brazil currents. The only other work to describe origins of hawksbills at a Brazilian feeding ground (Noronha/Rocas) also shows that main origins are from national sources, with lower contributions from other regions [24].

Our rookery-centric MSA, including the five populations investigated in this study plus the Noronha/Rocas feeding ground, decreased contributions of the Bahia rookery to

“unknown” feeding grounds from almost 60% (reported in [24]) to less than 10%, and showed strong connections to feeding grounds in national waters. This is likely due to the detection at our feeding areas of a hybrid hawksbill x loggerhead haplotype (EixCc3 BR3), present in 18% of samples from the Bahia rookery [41]. This haplotype had not been registered at feeding grounds sampled by [24], but here we report its occurrence at Ceará (4% frequency) and in the temperate waters of South Brazil (16% frequency) [61]. This demonstrates the importance of thorough genetic analyses of populations and the use of metapopulational approaches (ocean basin scale) in animal populations that are demographically connected between distant geographic localities.

Natal origin estimates also showed connection between West Africa and Brazil, with 8% contribution from Principe to Noronha. This is expected since the EATL haplotype, present with 100% frequency at the Principe rookery [35], was encountered at this feeding area. However, drifter tracks actually show a higher connection with West Africa by means of the South Equatorial Current; for example, 37% of drifters at SPSP originated from Principe, but MSA showed no contribution from this rookery to this region as haplotype EATL was not detected. The displacement to the opposite direction via the Equatorial Counter Current is also likely as shown through drifter tracks. Furthermore, hawksbill tag returns have repeatedly evidenced transatlantic movements between these regions [62,63]. Increasing the number of analyzed samples from SPSP and other feeding grounds along the coast would possibly lead to the detection of the EATL haplotype and further evidence the connection between African and Brazilian hawksbill turtle populations.

MSA showed that Caribbean rookeries contributed to all Brazilian feeding grounds except South Brazil. Highest contributions were observed for SPSP, Noronha, and Ceará, which aggregated animals from up to three Caribbean rookeries. It is hypothesized that as sea turtles grow their feeding habitats become preferentially established near their natal beach [4]. Immature hawksbills sampled at SPSP and Noronha presented larger size classes (Table 2) than those at the other feeding areas in Brazil, possibly indicating that some animals are moving closer to the Caribbean for the onset reproduction.

The connection between Caribbean and Western South Atlantic green and hawksbill turtle populations has been extensively shown through MSA [13,15,24,64] and tag returns [65]. However, oceanographic data have yet to bring additional evidence to these links. In this study no drifters from Caribbean sources arrived in Brazilian waters, although the opposite displacement occurred. Drifter data are not abundant for every region and the life span of drifters could be too short (~291-450 d; [66]) to detect this connection. Particle

modeling could solve the temporal limitation of drifters, but a study using particle tracking models (dispersal time = one year) also did not reveal any virtual drifter from Caribbean hawksbill rookeries arriving around Brazil [7]; a 5-year particle tracking study from the green turtle rookery Costa Rica also did not show this connection [13]. Contribution from the Caribbean to Brazil could be overestimated by MSA due to shared haplotypes between rookeries of these regions; on the other hand, MSA estimates might be correct but animals are undergoing movements undetected by drifters/particle models (e.g. transport by coastal currents in shallow areas or active swimming). Additional genetic characterization of rookeries and feeding areas, as well as further description of animal behavior and oceanographic features on the routes between them, is necessary for resolving this ambiguity.

Although surface drifter patterns did not corroborate MSA origins in all cases, origins calculated by combining drifter data with population size of rookeries (see Table 4) were strongly correlated with MSA estimates. This indicates that ocean currents influence how patterns of hawksbill population genetic structure are shaped in Brazil. Ocean currents apparently play a substantial role in shaping populations in other regions as well; for example, a particle tracking study found significant correlation between particle distribution patterns and natal origin estimates for foraging aggregations in the Caribbean [7]. Restricting MSA to only small turtles, more likely to have recently recruited than larger juveniles that may have already conducted developmental migrations [67], could increase the correlation between natal origins and ocean currents. For allowing this type of meta-analysis, researchers should publish their datasets containing size/haplotype of individual turtles. In light of this suggestion, data from the present work was published in Figshare [68].

The integration of genetic analysis and oceanographic data is a valuable approach to understanding origin and distribution of immature animals; however, there are some caveats inherent to the analyses applied here. Mixed stock analysis may not adequately detect connections between some areas since not all source rookeries are thoroughly characterized, while those that are do not always present highly differentiated haplotype frequencies, leading to high uncertainty [58]. Furthermore, drifter trajectories might not represent the precise pathways of sea turtles, as analyses cannot be limited to hatching seasons due to large reduction of data, and drifters generally have short life spans and do not consider surface wind drag and turtle behavior/swimming [66]. Despite these caveats, the type of information described above has proven to be quite useful for indicating

possible movements and migrations between areas (e.g. [10,15,69,70]). Ocean circulation models are also being increasingly used, and allow choosing the number and lifespan of particles, release periods, and incorporating additional factors such as wind drag and swimming power of hatchlings [71,72]. However, they are also limited due to uncertainties associated with simulation of turtle behavior and spatio-temporal resolution unable to capture fine-scale features [73]. An ideal scenario would integrate several connectivity indicators; for achieving this, other means of linking populations should continue to be investigated. Stable isotope analysis, for example, is currently being used to distinguish populations and unveil migratory origins by comparing isotopic signatures of animals to predominant regional isoscapes [74–76].

Implications for hawksbill conservation

How populations connect, and how impacts on any particular population will affect others, are fundamental questions for the conservation of endangered, highly migratory animals. Hawksbill turtles are currently listed as critically endangered in the IUCN red list [16], and listed on Appendix I of the Convention on the International Trade in Endangered Species. Nevertheless, hawksbill products continue to be commercially valuable and in demand in some regions, and debate has arisen as to whether or not harvesting should be permitted, and at what levels such harvest would be sustainable [4,77–79]. Some studies have tackled these issues and concluded, for example, that exploiting turtles in Caribbean feeding areas would affect rookeries throughout the entire region [4,79].

Although Brazilian populations have also been historically depleted due to harvest for consumption and fisheries bycatch, nesting populations are currently showing encouraging increases [22,23]. Our analyses indicate that mixed stocks are composed mostly of animals that originate from Brazilian rookeries, which is a fortunate scenario since a large sea turtle conservation project (Project Tamar-ICMBio) has been underway in Brazil since 1980 [80] and the need for transnational conservation policies is somewhat reduced. Despite this encouraging outlook, it is not yet known if immature feeding population numbers are also rising, and impacts such as bycatch [81] and ingestion of/entanglement in plastic debris [82] are increasingly causing sea turtle mortality. Furthermore, we demonstrate that some areas are demographically and genetically connected to rookeries in the Caribbean and West Africa. For instance, the SPSP and Noronha feeding grounds aggregate large animals from various national and international origins, and impacts at these developmental areas could affect several nesting populations

throughout the Atlantic. Although Fernando de Noronha, Rocas Atoll and Arvoredo Reserve are protected areas where fishing is not allowed, other areas, including the waters around the São Pedro and São Paulo Archipelago, are important fishing grounds [83]. The Ceará, Bahia and Cassino Beach areas are also not integrally protected, and impacts at these areas will most likely influence the Brazilian nesting populations, and possibly some Caribbean rookeries.

In this study we reduce the gap in genetic information of hawksbill turtle feeding populations in Brazil, and illustrate how these populations are connected with proximal and distant rookeries in the Atlantic Ocean. The results presented here should be considered in future national and multinational strategies for mitigating bycatch/other impacts to increase protection and recovery of endangered populations of hawksbill turtles.

Acknowledgements

MCP is a graduate student of the Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (FURG). We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), the Rufford Foundation, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Pata da Cobra Diving, Brazilian Navy, CECIRM PRO-Arquipélago, Abrolhos Park and Arvoredo Reserve coordination, and all field assistants (a special thanks to B Barbosa) for support. We acknowledge Núcleo de Educação e Monitoramento Ambiental (NEMA), Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM) and Projeto Tamar for providing samples. We also thank G Hays and one anonymous reviewer for valuable suggestions on the manuscript. This is a contribution of the Research Group ‘Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha – EcoMega’.

References

1. Bolten A (2003) Variation in sea turtle life history patterns: neritic vs. oceanic developmental stages. In: Lutz P, Musick J, Wyneken J, editors. *The Biology of Sea Turtles*, Vol 2. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 243–257.
2. Musick J, Limpus C (1996) Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In: Lutz P, Musick J, editors. *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 137–164.
3. Avise JC (2007) *Conservation Genetics of Marine Turtles — 10 Years Later*. *Wildlife Science: Linking Ecological Theory and Management Applications*. pp. 295–314.

4. Bowen BW, Grant WS, Hillis-Starr Z, Shaver DJ, Bjorndal KA, et al. (2007) Mixed-stock analysis reveals the migrations of juvenile hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean Sea. *Mol Ecol* 16: 49–60. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03096.x.
5. Velez-Zuazo X, Ramos WD, van Dam RP, Diez CE, Abreu-Grobois A, et al. (2008) Dispersal, recruitment and migratory behaviour in a hawksbill sea turtle aggregation. *Mol Ecol* 17: 839–853. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03635.x.
6. Richardson PB, Bruford MW, Calosso MC, Campbell LM, Clerveaux W, et al. (2009) Marine turtles in the Turks and Caicos Islands: remnant rookeries, regionally significant foraging stocks, and a major turtle fishery. *Chelonian Conserv Biol* 8: 192–207. doi:10.2744/CCB-0871.1.
7. Blumenthal JM, Abreu-Grobois FA, Austin TJ, Broderick AC, Bruford MW, et al. (2009) Turtle groups or turtle soup: dispersal patterns of hawksbill turtles in the Caribbean. *Mol Ecol* 18: 4841–4853. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04403.x.
8. Pella J, Masuda M (2001) Bayesian methods for analysis of stock mixtures from genetic characters. *Fish Bull* 99: 151–167.
9. Bolker BM, Okuyama T, Bjorndal KA, Bolten AB (2007) Incorporating multiple mixed stocks in mixed stock analysis: “many-to-many” analyses. *Mol Ecol* 16: 685–695. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03161.x.
10. Godley BJ, Barbosa C, Bruford M, Broderick AC, Catry P, et al. (2010) Unravelling migratory connectivity in marine turtles using multiple methods. *J Appl Ecol* 47: 769–778. doi:10.1111/j.1365-2664.2010.01817.x.
11. Luschi P, Hays GC, Papi F (2003) A review of long-distance movements by marine turtles, and the possible role of ocean currents. *Oikos* 103: 293–302. doi:10.1034/j.1600-0706.2003.12123.x.
12. Hays GC, Fossette S, Katselidis K a, Mariani P, Schofield G (2010) Ontogenetic development of migration: Lagrangian drift trajectories suggest a new paradigm for sea turtles. *J R Soc Interface* 7: 1319–1327. doi:10.1098/rsif.2010.0009.
13. Putman NF, Naro-Maciel E (2013) Finding the “lost years” in green turtles: insights from ocean circulation models and genetic analysis. *Proc Biol Sci* 280: 20131468. doi:10.1098/rspb.2013.1468.
14. Monzón-Argüello C, López-Jurado LF, Rico C, Marco A, López P, et al. (2010) Evidence from genetic and Lagrangian drifter data for transatlantic transport of small juvenile green turtles. *J Biogeogr* 37: 1752–1766. doi:10.1111/j.1365-2699.2010.02326.x.
15. Proietti M, Reisser J, Kinas P, Kerr R, Monteiro D, et al. (2012) Green turtle *Chelonia mydas* mixed stocks in the western South Atlantic, as revealed by mtDNA haplotypes and drifter trajectories. *Mar Ecol Prog Ser* 447: 195–209. doi:10.3354/meps09477.

16. IUCN (2012) The IUCN Red List of Threatened Species, version 2012.2 <iucnredlist.org> Accessed on July 21, 2013.
17. Mortimer JA, Donnelly M (2008) Hawksbill Turtle (*Eretmochelys imbricata*) - Marine Turtle Specialist Group 2008 IUCN Red List status assessment. doi:10.2307/1564433.
18. Hamann M, Godfrey M, Seminoff J, Arthur K, Barata P, et al. (2010) Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endanger Species Res* 11: 245–269. doi:10.3354/esr00279.
19. Bellini C (1996) Reproduction and feeding of marine turtles in the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. *Mar Turt Newsl* 74: 12–13.
20. Marcovaldi M, da Silva A, Gallo B, Baptistotte C, Vieitas C, et al. (2000) Sea turtle feeding grounds of Brazil. In: Abreu-Gobrois F, Briseno-Dueñas R, Márquez R, Sarti L, editors. *Proceedings of the Eighteenth International Sea Turtle Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC-436. pp. 150–152.
21. Proietti MC, Reisser J, Secchi ER (2012) Foraging by immature hawksbill sea turtles at Brazilian islands. *Mar Turt Newsl* 135: 4–6.
22. Marcovaldi MA, Lopez GG, Soares LS, Santos AJB, Bellini C, et al. (2007) Fifteen years of hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Northern Brazil. *Chelonian Conserv Biol* 6: 223–228. doi:10.2744/1071-8443(2007)6[223:FYOHST]2.0.CO;2.
23. Santos A, Bellini C, Vieira D, Neto L, Corso G (2013) Northeast Brazil shows highest hawksbill turtle nesting density in the South Atlantic. *Endanger Species Res* 21: 25–32. doi:10.3354/esr00505.
24. Vilaça ST, Lara-Ruiz P, Marcovaldi MA, Soares LS, Santos FR (2013) Population origin and historical demography in hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) feeding and nesting aggregates from Brazil. *J Exp Mar Bio Ecol* 446: 334–344. doi:10.1016/j.jembe.2013.06.004.
25. Ehrhart LM, Ogren LH (1999) Studies in foraging habitats: capturing and handling turtles. In: Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Grobois FA, Donnelly M, editors. *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4. pp. 61–64.
26. Balazs G (1999) Factors to consider in the of tagging sea turtles. In: Eckert K, Bjorndal K, Abreu G F, Donnelly M, editors. *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. Marine Turtle Specailist Group IUCN/MTSG Publication No. 4. pp. 101–109.
27. Bolten AB (1999) Techniques for measuring sea turtles. In: Eckert K, Bjorndal K, Abreu-Grobois F, Donnelly M, editors. *Research and Management Techniques for*

the Conservation of Sea Turtles. Marine Turtle Specialist Group IUCN/MTSG Publication No. 4. pp. 110–114.

28. Hillis D, Mable B, Larson A, Davis S, Zimmer E (1996) Nucleic acids IV: sequencing and cloning. In: Hillis D, Moritz C, Mable B, editors. Molecular systematics, 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA. pp. 321–381.
29. Abreu-Grobois F, Horrocks J, Formia A, Dutton P, LeRoux R, et al. (2006) New mtDNA Dloop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution of mixed stock analyses. In: Frick M, Panagopoulou A, Rees A, Williams K, editors. Book of Abstracts, Twenty-sixth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. International Sea Turtle Society, Athens, Greece. p. 179.
30. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23: 2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404.
31. Bass AL, Good DA, Bjørndal KA, Richardson JI, Hillis ZM, et al. (1996) Testing models of female reproductive migratory behaviour and population structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with mtDNA sequences. Mol Ecol 5: 321–328.
32. Excoffier L, Lischer H (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour 10: 564–567.
33. Darriba D, Taboada G, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat Methods 9(8): 772.
34. Monzón-Argüello C, Rico C, Marco A, López P, López-Jurado LF (2010) Genetic characterization of eastern Atlantic hawksbill turtles at a foraging group indicates major undiscovered nesting populations in the region. J Exp Mar Bio Ecol 387: 9–14. doi:10.1016/j.jembe.2010.03.004.
35. Monzón-Argüello C, Loureiro NS, Delgado C, Marco A, Lopes JM, et al. (2011) Príncipe island hawksbills: genetic isolation of an eastern Atlantic stock. J Exp Mar Bio Ecol 407: 345–354. doi:10.1016/j.jembe.2011.07.017.
36. Wood L, Hardy R, Meylan P, Meylan A (2013) Hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) foraging aggregation in a high-latitude reef community in Southeastern Florida. Herpetol Conserv Biol 8: 258–275.
37. Bowen B, Bass A, Garcia-Rodriguez A, Diez C, Van Dam R, et al. (1996) Origin of hawksbill turtles in a Caribbean feeding area as indicated by genetic markers. Ecol Appl 6: 566–572.
38. Díaz-Fernández R, Okayama T, Uchiyama T, Carrillo E, Espinosa G, et al. (1999) Genetic sourcing for the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in the Northern Caribbean Region. Chelonian Conserv Biol 3: 296–300.

39. R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing.
40. Leroux RA, Dutton PH, Abreu-Grobois AF, Lagueux CJ, Campbell CL, et al. (2012) Re-examination of population structure and phylogeography of hawksbill turtles in the wider Caribbean using longer mtDNA sequences. *J Hered*: 1–15. doi:10.1093/jhered/ess055.
41. Lara-Ruiz P, Lopez GG, Santos FR, Soares LS (2006) Extensive hybridization in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. *Conserv Genet* 7: 773–781. doi:10.1007/s10592-005-9102-9.
42. Browne DC, Horrocks JA, Abreu-Grobois FA (2010) Population subdivision in hawksbill turtles nesting on Barbados, West Indies, determined from mitochondrial DNA control region sequences. *Conserv Genet* 11: 1541–1546. doi:10.1007/s10592-009-9883-3.
43. Carreras C, Godley BJ, León YM, Hawkes LA, Revuelta O, et al. (2013) Contextualising the last survivors: population structure of marine turtles in the Dominican Republic. *PLoS One* 8: e66037. doi:10.1371/journal.pone.0066037.
44. Tröeng S, Dutton PH, Evans D (2005) Migration of hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata* from Tortuguero, Costa Rica. *Ecography (Cop)* 28: 394–402.
45. Oksanen AJ, Kindt R, Legendre P, Hara BO, Simpson GL, et al. (2013) *vegan*: Community Ecology Package.
46. Boulon RH (1994) Growth rates of wild juvenile hawksbill turtles, *Eretmochelys imbricata*, in St . Thomas, United States Virgin Islands. *Copeia* 1994: 811–814.
47. Van Dam RP, Diez CE (1998) Home range of immature hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata* (Linnaeus)) at two Caribbean islands. *J Exp Mar Bio Ecol* 220: 15–24. doi:10.1016/S0022-0981(97)00080-4.
48. León YM, Diez CE (1999) Population structure of hawksbill turtles on a foraging ground in the Dominican Republic. *Chelonian Conserv Biol* 3: 230–236.
49. Bjorndal KA, Bolten AB (2010) Hawksbill sea turtles in seagrass pastures: success in a peripheral habitat. *Mar Biol* 157: 135–145. doi:10.1007/s00227-009-1304-0.
50. Moncada FG, Hawkes LA, Fish MR, Godley BJ, Manolis SC, et al. (2012) Patterns of dispersal of hawksbill turtles from the Cuban shelf inform scale of conservation and management. *Biol Conserv* 148: 191–199. doi:10.1016/j.biocon.2012.01.011.
51. Blumenthal JM, Austin TJ, Bell CDL, Bothwell JB, Broderick AC, et al. (2009) Ecology of hawksbill turtles, *Eretmochelys imbricata*, on a Western Caribbean foraging ground. *Chelonian Conserv Biol* 8: 1–10. doi:10.2744/CCB-0758.1.
52. Garduño-Andrade M (2000) Dinámica poblacional de la tortuga de carey (*Eretmochelys imbricata*) en su área de forraje. Río Lagartos, Yucatán. *Pronatura*

53. Beggs JA, Horrocks JA, Krueger BH (2007) Increase in hawksbill sea turtle *Eretmochelys imbricata* nesting in Barbados, West Indies. *Endanger Species Res* 3: 159–168. doi:10.3354/esr003159.
54. Kamel SJ, Delcroix E (2009) Nesting ecology of the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in Guadeloupe, French West Indies from 2000 – 07. *J Herpetol* 43: 367–376.
55. Richardson JI, Hall DB, Mason PA, Andrews KM, Bjorkland R, et al. (2006) Eighteen years of saturation tagging data reveal a significant increase in nesting hawksbill sea turtles (*Eretmochelys imbricata*) on Long Island, Antigua. *Anim Conserv* 9: 302–307. doi:10.1111/j.1469-1795.2006.00036.x.
56. Diez CE, van Dam RP (2011) Mona and Monito Island, Puerto Rico marine turtle research report for 2011.
57. Revuelta O, León YM, Feliz P, Godley BJ, Raga JA, et al. (2012) Protected areas host important remnants of marine turtle nesting stocks in the Dominican Republic. *Oryx* 46: 348–358. doi:10.1017/S0030605311001529.
58. Bowen BW, Karl SA (2007) Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Mol Ecol* 16: 4886–4907. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03542.x.
59. Bass AL, Epperly SP, Braun-McNeill J (2006) Green turtle (*Chelonia mydas*) foraging and nesting aggregations in the Caribbean and Atlantic: impact of currents and behavior on dispersal. *J Hered* 97: 346–354. doi:10.1093/jhered/esl004.
60. Shamblin B, Bolten A, Bjorndal K, Dutton P, Nielsen J, et al. (2012) Expanded mitochondrial control region sequences increase resolution of stock structure among North Atlantic loggerhead turtle rookeries. *Mar Ecol Prog Ser* 469: 145–160. doi:10.3354/meps09980.
61. Proietti M, Reisser J, Marins L, Marcovaldi M, Soares L, et al. (2013) Hawksbill x loggerhead sea turtle hybrids at Bahia, Brazil: where do their offspring go? *PeerJ Prepr* 1e159v1 <http://dx.doi.org/107287/peerj.preprints159v1>.
62. Grossman A, Bellini C, Fallabrino A, Formia A, Mba JM, et al. (2007) Second TAMAR-tagged hawksbill recaptured in Corisco Bay, West Africa. *Mar Turt Newsl* 116: 2–3.
63. Bellini C, Sanches TM, Formia A (2000) Hawksbill turtle tagged in Brazil Captured in Gabon , Africa. *Mar Turt Newsl* 87: 11–12.
64. Naro-Maciel E, Becker JH, Lima EHSM, Marcovaldi MÂ, DeSalle R (2007) Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. *J Hered* 98: 29. doi:10.1093/jhered/esl050.

65. Lima EHSM, Melo MTD, Severo MM, Barata PC (2008) Green turtle tag recovery further links Northern Brazil to the Caribbean region. *Mar Turt Newsl* 119: 14–15.
66. Lumpkin R, Pazos M (2007) Measuring surface currents with Surface Velocity Program drifters: the instrument, its data, and some recent results. *Lagrangian Anal Predict Coast Ocean Dyn*: 39–67.
67. Meylan PA, Meylan AB, Gray JA (2011) The ecology and migrations of sea turtles 8. Tests of the developmental habitat hypothesis. *Bull Am Museum Nat Hist* 357: 70pp.
68. Proietti M, Reisser J, Marins L, Zarate C, Marcovaldi M, et al. (2013) Biometric and mitochondrial DNA haplotype data of immature hawksbill turtles in Brazilian waters. *Figshare* <http://dx.doi.org/106084/m9.figshare884616>.
69. Amoroch DF, Abreu-Grobois FA, Dutton PH, Reina RD (2012) Multiple distant origins for green sea turtles aggregating off Gorgona Island in the Colombian eastern Pacific. *PLoS One* 7: e31486. doi:10.1371/journal.pone.0031486.
70. Gaspar P, Benson SR, Dutton PH, Réveillère A, Jacob G, et al. (2012) Oceanic dispersal of juvenile leatherback turtles: going beyond passive drift modeling. *Mar Ecol Prog Ser* 457: 265–284. doi:10.3354/meps09689.
71. Hamann M, Grech A, Wolanski E, Lambrechts J (2011) Modelling the fate of marine turtle hatchlings. *Ecol Modell* 222: 1515–1521. doi:10.1016/j.ecolmodel.2011.02.003.
72. Scott R, Marsh R, Hays GC (2012) A little movement orientated to the geomagnetic field makes a big difference in strong flows. *Mar Biol* 159: 481–488. doi:10.1007/s00227-011-1825-1.
73. Fossette S, Putman N, Lohmann K, Marsh R, Hays G (2012) A biologist's guide to assessing ocean currents: a review. *Mar Ecol Prog Ser* 457: 285–301. doi:10.3354/meps09581.
74. Allen C, Lemons G, Eguchi T, LeRoux R, Fahy C, et al. (2013) Stable isotope analysis reveals migratory origin of loggerhead turtles in the Southern California Bight. *Mar Ecol Prog Ser* 472: 275–285. doi:10.3354/meps10023.
75. Zbinden J, Bearhop S, Bradshaw P, Gill B, Margaritoulis D, et al. (2011) Migratory dichotomy and associated phenotypic variation in marine turtles revealed by satellite tracking and stable isotope analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 421: 291–302. doi:10.3354/meps08871.
76. López-Castro M, Bjørndal K, Kamenov G, Zenil-Ferguson R, Bolten A (2013) Sea turtle population structure and connections between oceanic and neritic foraging areas in the Atlantic revealed through trace elements. *Mar Ecol Prog Ser* 490: 233–246. doi:10.3354/meps10433.

77. Mortimer JA, Meylan PA, Donnelly M (2007) Whose turtles are they, anyway? *Mol Ecol* 16: 17–18. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03252.x.
78. Godfrey MH, Webb GJW, Manolis SC, Mrosovsky N (2007) Hawksbill sea turtles: can phylogenetics inform harvesting? *Mol Ecol* 16: 3511–3; discussion 3514–7. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03356.x.
79. Bowen BW, Grant WS, Hillis-Starr Z, Shaver DJ, Bjorndal KA, et al. (2007) The advocate and the scientist: debating the commercial exploitation of endangered hawksbill turtles. *Mol Ecol* 16: 3514–3515. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03431.x.
80. Marcovaldi MÂ, Marcovaldi GG (1999) Marine turtles of Brazil: the history and structure of Projeto TAMAR-IBAMA. *Biol Conserv* 91: 35–41. doi:10.1016/S0006-3207(99)00043-9.
81. Marcovaldi MA, Sales G, Thomé JC, da Silva A, Gallo BMG, et al. (2006) Sea turtles and fishery interactions in Brazil: identifying and mitigating potential conflicts. *Mar Turt Newsl* 112: 4–8.
82. Schuyler Q, Hardesty BD, Wilcox C, Townsend K (2013) Global analysis of anthropogenic debris ingestion by sea turtles. *Conserv Biol* 00: 1–11. doi:10.1111/cobi.12126.
83. Vaske Jr. T, Nobrega M, Lessa R, Hazin F, Santana F, et al. (2006) Pesca. Arquipélago de São Pedro e São Paulo: histórico e recursos naturais. Editora Livro Rápido-Elógica, Olinda, PE. pp. 152–159.

Figures

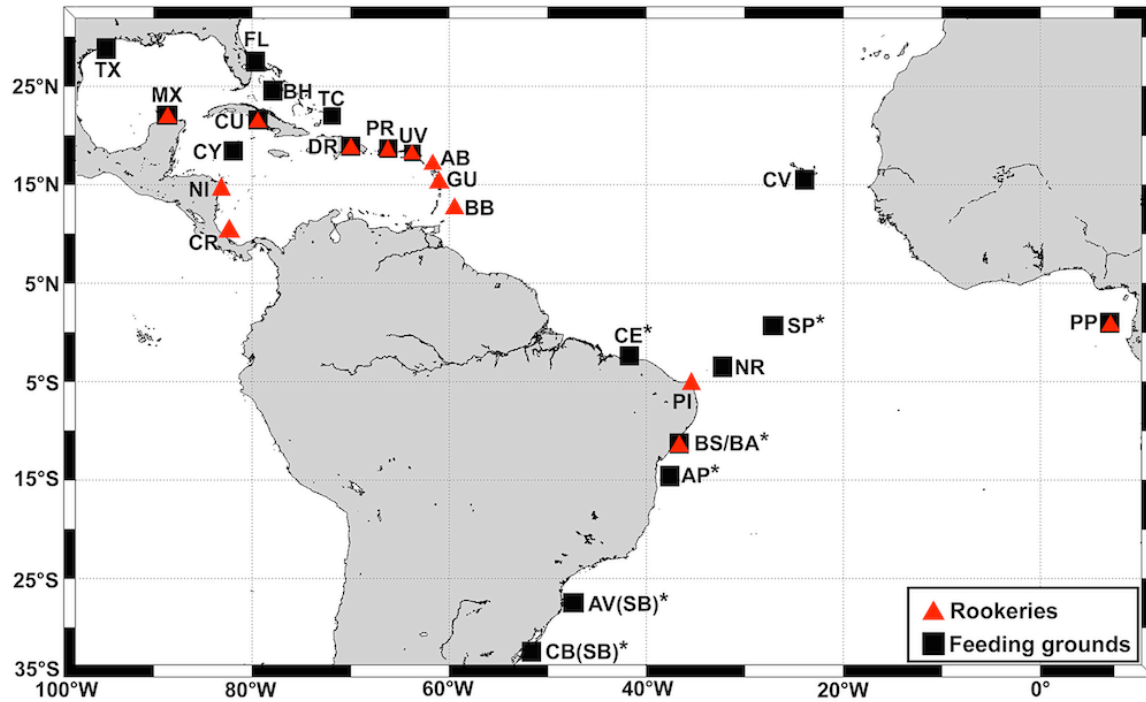


Figure 1. Locations of genetically described hawksbill populations in the Atlantic. Red triangles = rookeries, black squares = feeding grounds, *study areas described in this work. Rookeries: BS = Bahia/Sergipe, PI = Pipa, PP = Principe, BB = Barbados, GU = Guadeloupe, AB = Antigua & Barbuda, UV = U.S. Virgin Islands, PR = Puerto Rico, DR = Dominican Republic, CR = Costa Rica, NI = Nicaragua, CU = Cuba, MX = Mexico. Feeding grounds: SP = São Pedro and São Paulo, NR = Noronha/Rocas, CE = Ceará coast, BA = Bahia coast, AP = Abrolhos Park, SB = South Brazil, PP = Principe, CV = Cape Verde, UV = U.S. Virgin Islands, PR = Puerto Rico, DR = Dominican Republic, TC = Turks & Caicos, BH = Bahamas, FL = Florida, CU = Cuba, CY = Cayman Islands, MX = Mexico, TX = Texas.

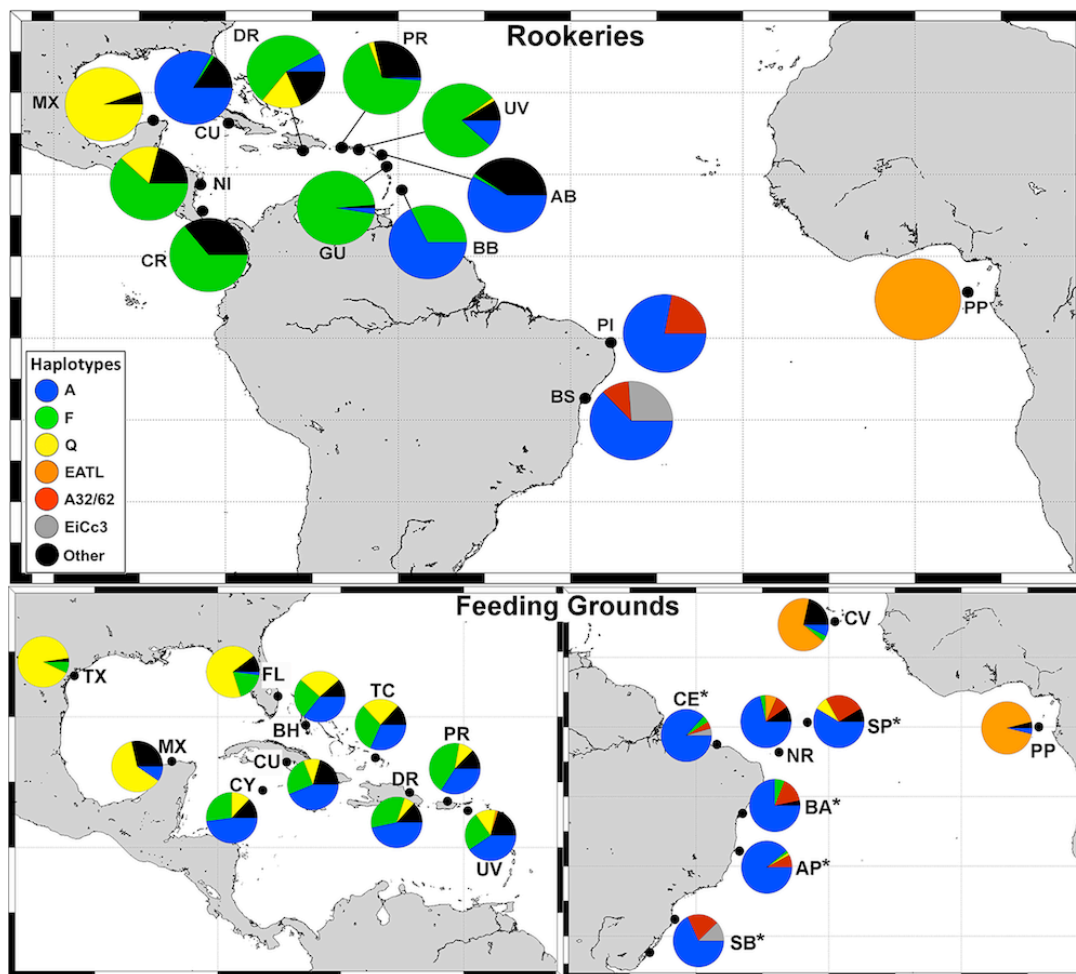
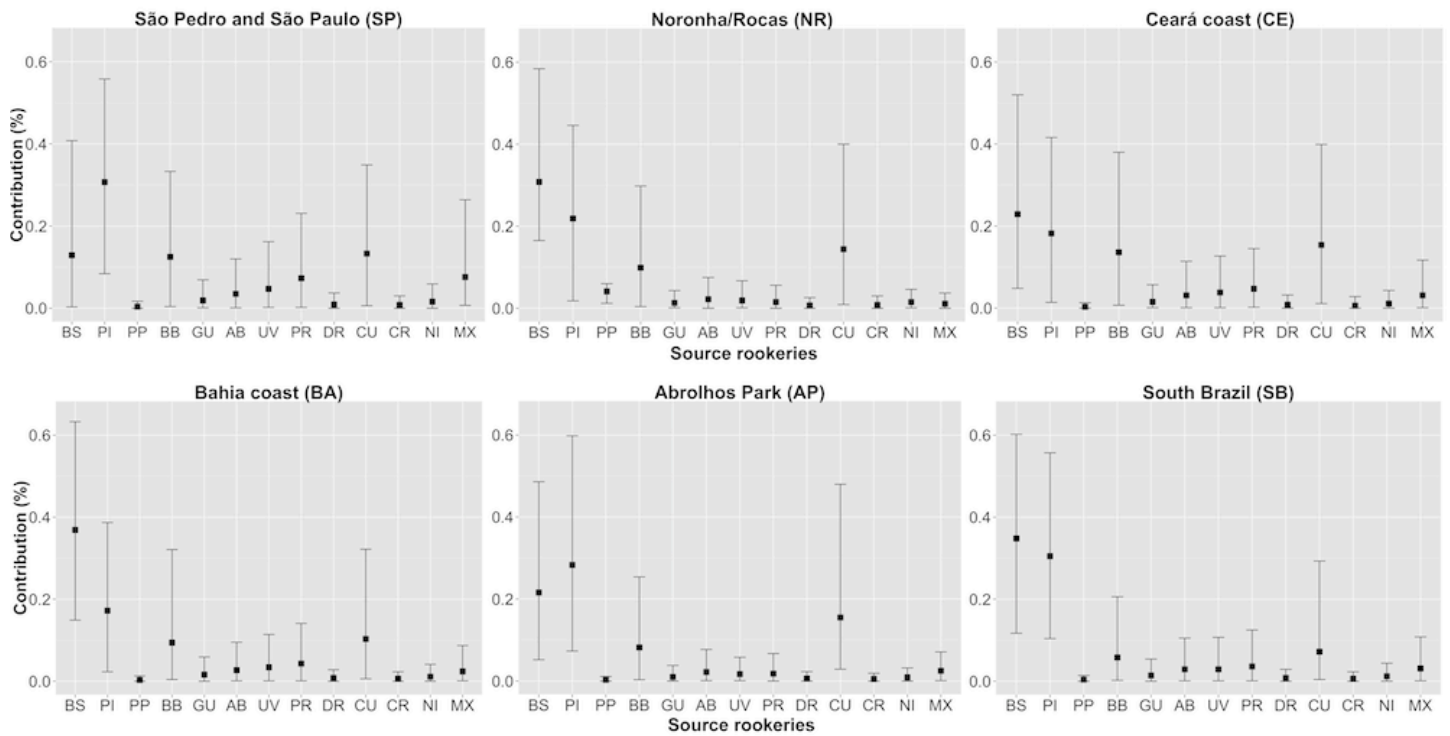


Figure 2. Main haplotype frequencies of genetically described populations in the Atlantic. *study areas described in this work. Rookeries: BS = Bahia/Sergipe, PI = Pipa, PP = Principe, BB = Barbados, GU = Guadeloupe, AB = Antigua & Barbuda, UV = U.S. Virgin Islands, PR = Puerto Rico, DR = Dominican Republic, CR = Costa Rica, NI = Nicaragua, CU = Cuba, MX = Mexico. Feeding grounds: SP = São Pedro and São Paulo, NR = Noronha/Rocas, CE = Ceará coast, BA = Bahia coast, AP = Abrolhos Park, SB = South Brazil, PP = Principe, CV = Cape Verde, UV = U.S. Virgin Islands, PR = Puerto Rico, DR = Dominican Republic, TC = Turks & Caicos, BH = Bahamas, FL = Florida, CY = Cayman Islands, MX = Mexico, TX = Texas.

a) Feeding ground-centric MSA



b) Rookery-centric MSA

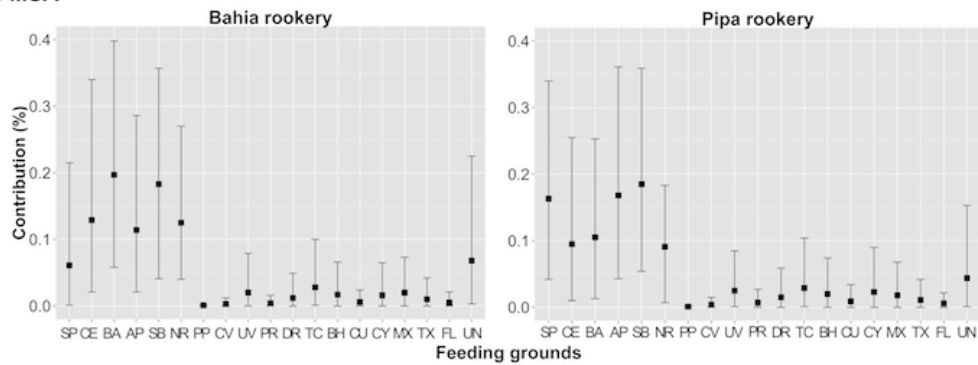


Figure 3. Many-to-many mixed stock analysis estimates for Brazilian populations. (a) shows feeding ground-centric estimates, and (b) rookery-centric estimates. MSA outputs for all other areas are shown in Figures S1 and S2. BS = Bahia/Sergipe, PI = Pipa, PP = Principe, BB = Barbados, GU = Guadeloupe, AB = Antigua & Barbuda, UV = U.S. Virgin Islands, PR = Puerto Rico, DR = Dominican Republic, CR = Costa Rica, NI = Nicaragua, CU = Cuba, MX = Mexico, SP = São Pedro and São Paulo, CE = Ceará coast, BA = Bahia coast, AP = Abrolhos Park, SB = South Brazil, NR = Noronha/Rocas, PP = Principe, CV = Cape Verde, TC = Turks & Caicos, BH = Bahamas, FL = Florida, CY = Cayman Islands, TX = Texas, FL = Florida, UN = Unknown.

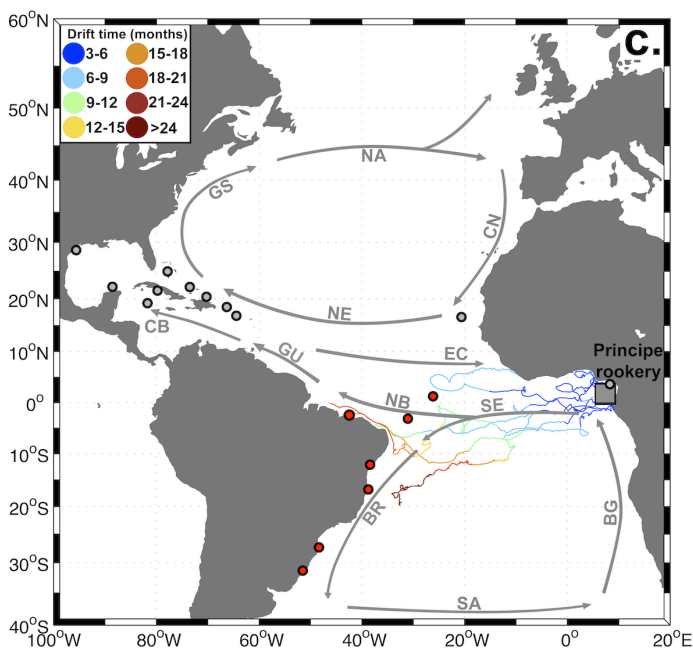
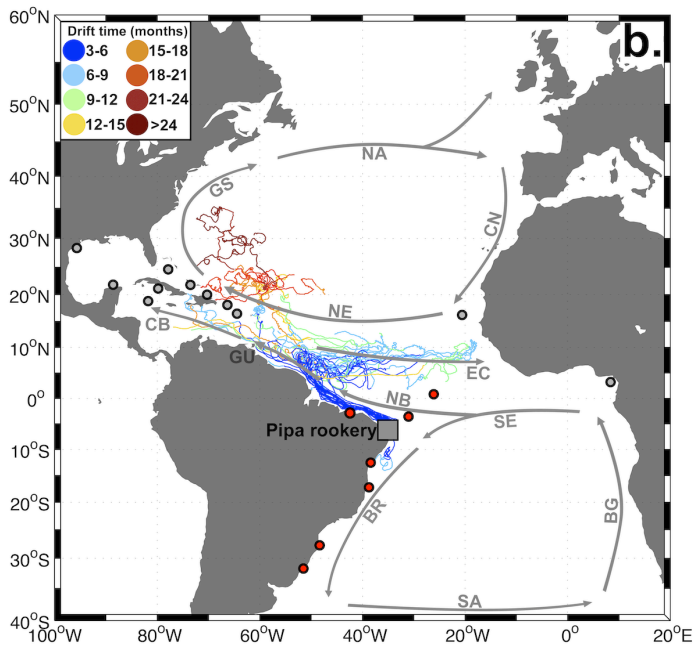
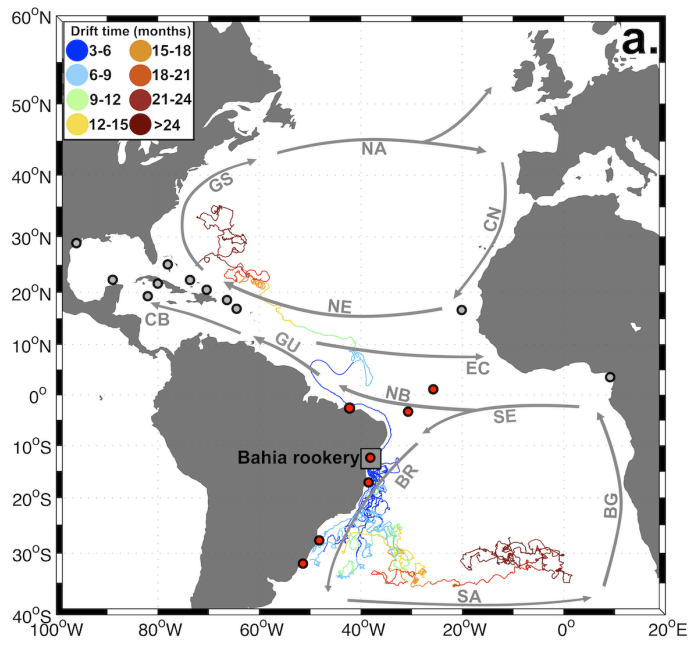


Figure 4. Pathways of drifters passing by Atlantic Ocean rookeries Bahia (a.), Pipa (b.) and Principe (c.). Drifter pathways for the other Atlantic rookeries are shown in Figure S3. Colors indicate drift time (in months). Grey squares = drifter release areas around the rookeries, red circles = Brazilian feeding grounds, grey circles = other Atlantic Ocean feeding grounds. Grey arrows indicate the flow of the major Atlantic Ocean currents: SE = South Equatorial Current, BR = Brazil Current, SA = South Atlantic Current (displaced to the North for illustrative purposes), BG = Benguela Current, NB = North Brazil Current, GU = Guiana Current, CB = Caribbean Current, EC = Equatorial Counter Current, NE = North Equatorial Current, GS = Gulf Stream, NA = North Atlantic Current, CN = Canary Current.

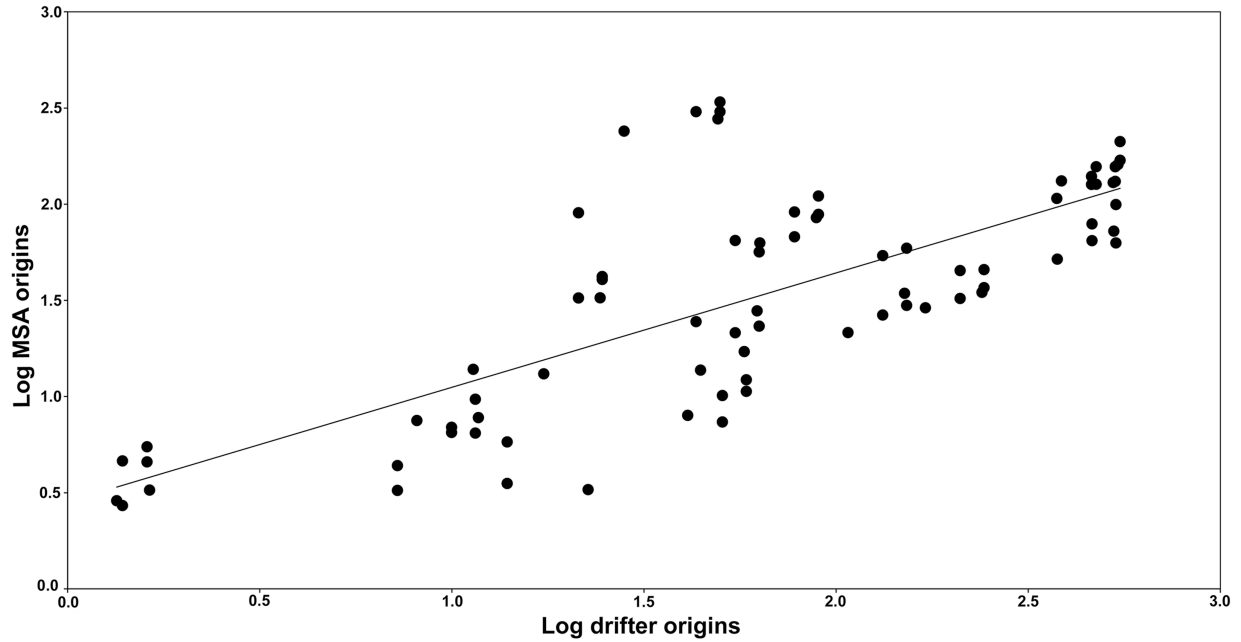


Figure 5. Correlation between genetic and drifter profiles for Brazilian feeding grounds. Genetic profiles are based on log-transformed data of origins from genetic/population size (MSA – x axis) and drifter/population size (y axis) information profiles.

Tables

Table 1. Haplotype frequencies (740 bp) for Brazilian feeding grounds. Shorter (360bp) haplotype equivalent is given when available.

Haplotypes	Brazilian feeding areas				
	SPSP	Ceará coast	Bahia coast	Abrolhos Park	South Brazil
A01/A	7	20	24	58	17
A09/F	0	0	2	1	0
A11/F	0	1	0	0	0
A23/Q	1	0	0	0	0
A24/Q	0	0	0	1	0
A32/f	0	0	3	2	0
A62	3	1	2	3	5
A76	0	0	1	0	0
A92	1	0	0	0	0
EixCcBR3	0	1	0	0	3
n	12	23	32	65	25

SPSP = São Pedro and São Paulo, South Brazil = Arvoredo Reserve/Cassino Beach.

Table 2. Haplotype diversities and biological information of Atlantic *E. imbricata* populations. CCL range is presented for feeding areas; mean number of females per nesting season is given for rookeries.

Feeding areas	N	<i>h</i> diversity	CCL range (mean)
Brazil			
SPSP	12	0.644±0.128	30–75 (53.7) ^a
Noronha/Rocas (NR)	94	0.516±0.063	26.5–75.5 (52.3) ^b
Ceará coast (CE)	23	0.249±0.116	29–73.2 (37.9) ^a
Bahia coast (BA)	32	0.432±0.113	21–63 (37.7) ^a
Abrolhos Park (AP)	65	0.213±0.056	24.5–58.5 (36.1) ^a
South Brazil (SB)	25	0.434±0.103	30–60 (41) ^a
West Africa			
Príncipe Island (PP)	80	0.143±0.052	18–87 (41.5) ^c
Boavista Island (CV)	28	0.529±0.105	27–62.8 (42.3) ^d
Caribbean			
Buck Island (UV)	69	0.757±0.035	27.1–70.5 (43.2) ^e
Mona Island (PR)	256	0.689±0.018	21.5–97* (21.5–32*) ^f
Dominican Republic (DR)	90	0.668±0.033	21–74.4* (26.8–37.4*) ^g
Turks and Caicos (TC)	38	0.761±0.035	19.4–93.0 (41.6) ^h
Bahamas (BH)	78	0.739±0.023	24.3–71.3 (48.8) ⁱ
Cuba pooled (CU)	210	0.728±0.022	22–66 (35.6) ^j
Grand/Little Cayman (CY)	92	0.687±0.035	20.5–62.6 (32.6) ^k
Rio Lagartos/Yucatán (MX)	21	0.604±0.111	21.5–68.5* (27–48*) ^l
Texas (TX)	42	0.180±0.076	7.0–35 (–) ^m
Florida (FL)	94	0.590±0.049	35.7–83.9(56.6) ⁿ
Rookeries			
	N	<i>h</i> diversity	N females/season
Brazil			
Bahia/Sergipe (BS)	121	0.530±0.043	419* ^o
Pipa (PI)	27	0.359±0.090	376 ^p
West Africa			
Príncipe Island (PP)	20	0.000±0.000	20* ^q

Caribbean

Barbados (BB)	84	0.441±0.037	504 ^r
Trois Island (GU)	74	0.080±0.063	55 ^s
Jumby Bay (AB)	52	0.504±0.026	113 ^t
Buck Island (UV)	67	0.434±0.070	183 ^q
Mona Island (PR)	93	0.600±0.042	340 ^{*u}
Jaragua/Saona (DR)	48	0.642±0.064	29 ^{*v}
Doce Leguas (CU)	70	0.213±0.063	563 ^q
Tortuguero (CR)	60	0.627±0.059	10 ^w
Pearl Cays (NI)	95	0.612±0.044	61 ^q
Yucatan (MX)	73	0.363±0.131	668 ^q

^aThis study, ^bBellini 1996, ^cLoureiro N (pers comm), ^dMonzón-Argüello 2010, ^eBoulon 1994, ^fvan Dam & Diez 1998, ^gLeón & Diez 1999, ^hRichardson et al. 2009, ⁱBjorndal & Bolten 2010, ^jMoncada et al. 2012, ^kBlumenthal et al. 2009, ^lGarduño-Andrade 2000, ^mShaver D (pers comm), ⁿWood et al. 2013, ^oMarcovaldi et al. 2007, ^pSantos et al. 2013, ^qMortimer & Donnelly 2008, ^rBeggs et al. 2007, ^sKamel & Decroix 2009, ^tRichardson et al. 2006, ^uDiez & van Dam 2012, ^vRevuelta et al. 2012, ^wTröeng et al. 2005. *for feeding grounds: CCL calculated from SCL (SCL = 0.939 * CCL - 0.154, Wabnitz & Pauly 2008); for rookeries: number of females calculated from number of nests (Nfemales = Nnests/4)

Table 3. Pairwise *F*-st (above diagonal) and ϕ -st (below diagonal) values between feeding populations in the Atlantic.

	SP	CE	BA	AP	SB	NR	PP	CV	UV	PR	DR	TC	BH	CU	CY	MX	TX	FL
SP	*	0.024	0.017	0.055	0.025	0.013	0.920	0.753	0.212	0.342	0.167	0.349	0.340	0.233	0.165	0.813	0.900	0.306
CE	0.023	*	0.001	0.026	0.003	0.029	0.894	0.735	0.233	0.367	0.191	0.337	0.348	0.266	0.190	0.663	0.762	0.339
BA	0.017	0.002	*	0.000	0.087	0.047	0.928	0.815	0.277	0.380	0.218	0.435	0.404	0.279	0.217	0.834	0.891	0.366
AP	0.054	0.026	0.001	*	0.152	0.074	0.944	0.877	0.378	0.437	0.304	0.569	0.503	0.340	0.303	0.902	0.930	0.440
SB	0.026	0.004	0.089	0.152	*	0.074	0.835	0.642	0.253	0.407	0.238	0.305	0.348	0.318	0.237	0.510	0.621	0.349
NR	0.013	0.030	0.048	0.074	0.075	*	0.802	0.673	0.230	0.360	0.197	0.307	0.321	0.270	0.196	0.536	0.587	0.383
PP	0.920	0.894	0.929	0.945	0.836	0.803	*	0.068	0.863	0.863	0.874	0.896	0.886	0.856	0.876	0.936	0.950	0.760
CV	0.754	0.736	0.817	0.877	0.643	0.673	0.068	*	0.746	0.802	0.778	0.766	0.788	0.787	0.781	0.817	0.873	0.637
UV	0.211	0.233	0.276	0.376	0.254	0.229	0.867	0.752	*	0.012	0.003	0.002	0.005	0.008	0.003	0.266	0.331	0.127
PR	0.343	0.368	0.380	0.438	0.411	0.362	0.868	0.809	0.013	*	0.057	0.012	0.003	0.058	0.060	0.212	0.244	0.129
DR	0.167	0.192	0.218	0.304	0.241	0.198	0.878	0.784	0.003	0.057	*	0.042	0.047	0.010	0.009	0.370	0.428	0.188
TC	0.350	0.336	0.436	0.570	0.305	0.305	0.899	0.771	0.002	0.012	0.042	*	0.016	0.003	0.044	0.236	0.329	0.070
BH	0.341	0.349	0.405	0.504	0.349	0.320	0.889	0.794	0.005	0.003	0.048	0.016	*	0.007	0.047	0.217	0.274	0.087
CU	0.234	0.268	0.279	0.341	0.323	0.271	0.862	0.794	0.008	0.048	0.010	0.003	0.007	*	0.009	0.266	0.298	0.164
CY	0.166	0.191	0.218	0.303	0.240	0.196	0.880	0.787	0.003	0.060	0.009	0.044	0.048	0.009	*	0.374	0.431	0.190
MX	0.815	0.658	0.835	0.903	0.505	0.530	0.937	0.819	0.265	0.211	0.371	0.236	0.218	0.266	0.375	*	0.053	0.017
TX	0.914	0.764	0.899	0.936	0.619	0.583	0.952	0.876	0.331	0.243	0.430	0.334	0.277	0.298	0.434	0.065	*	0.001
FL	0.153	0.194	0.206	0.264	0.221	0.255	0.610	0.466	0.066	0.081	0.106	0.028	0.045	0.105	0.107	0.016	0.000	*

Bold indicates lack of significant difference ($p > 0.05$). SP = São Pedro and São Paulo, CE = Ceará coast, BA = Bahia coast, AP = Abrolhos Park, SB = South Brazil, NR = Noronha/Rocas, PP = Principe, CV = Cape Verde, UV = U.S. Virgin Islands, PR = Puerto Rico, DR = Dominican Republic, TC = Turks & Caicos, BH = Bahamas, FL = Florida, CY = Cayman Islands, MX = Mexico, TX = Texas, FL = Florida

Table 4. Natal origins for *E. imbricata* in Brazilian waters as estimated by drifters.

	Target areas		
Rookeries	SPSP	NR/CE	BA/AP/SB
Bahia/Sergipe	0.085	0.139	0.720
Pipa	0.612	0.622	0.072

Principe	0.036	0.023	0.020
Barbados	0.024	0.020	0.017
Guadeloupe	0.003	0.002	0.002
Antigua	0.006	0.005	0.004
USVI	0.009	0.008	0.007
Puerto Rico	0.023	0.018	0.016
Dom Republic	0.003	0.002	0.002
Cuba	0.123	0.100	0.087
Costa Rica	0.003	0.002	0.002
Nicaragua	0.016	0.013	0.011
Mexico	0.058	0.047	0.041

SPSP = São Pedro and São Paulo Archipelago; NR/CE = Noronha/Ceará; BA/AP/SB = Bahia, Abrolhos, South Brazil.

Supporting information

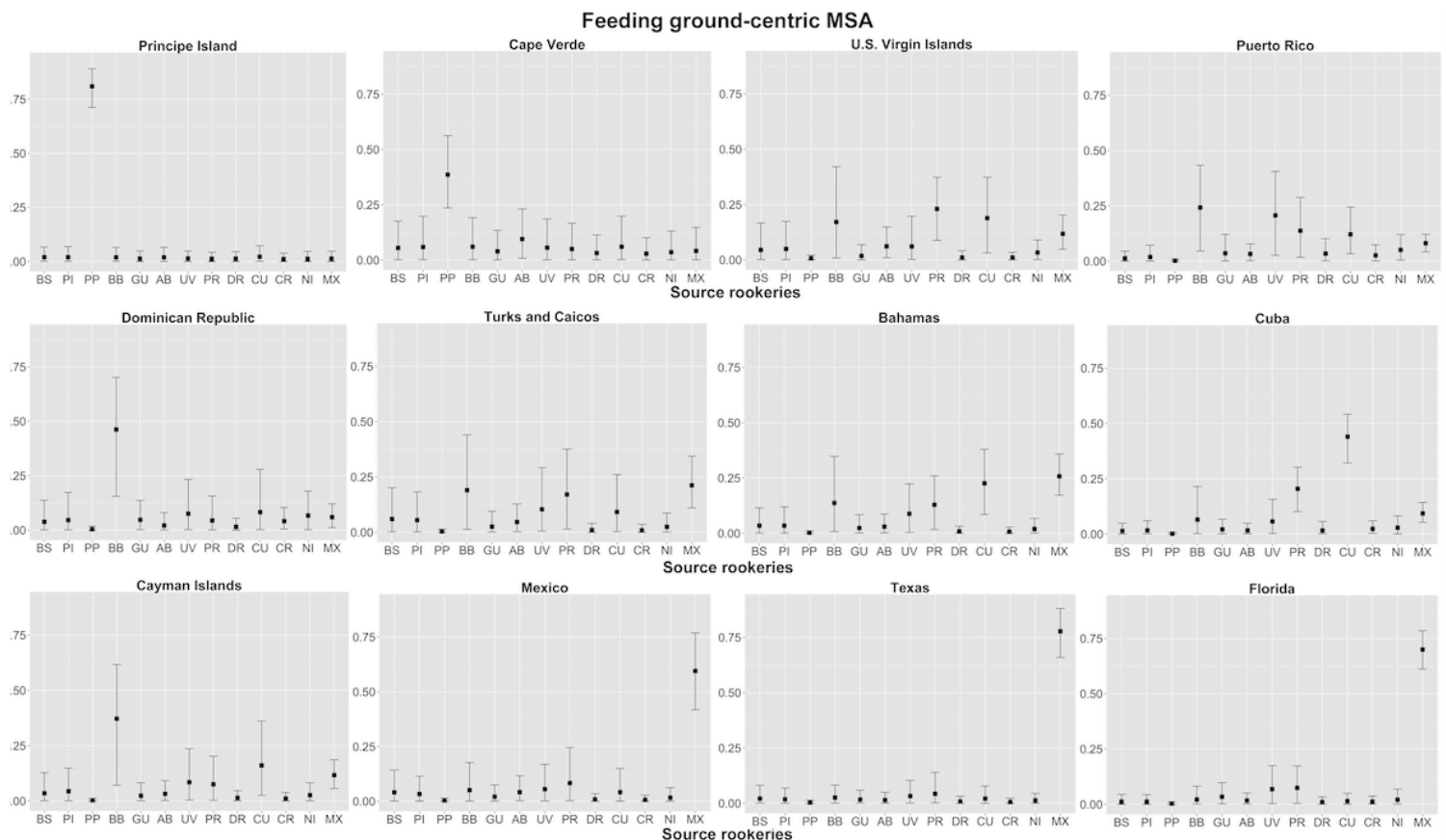


Figure S1. Feeding ground-centric many-to-many MSA estimates for Atlantic feeding populations. BS = Bahia/Sergipe, PI = Pipa, PP = Principe, BB = Barbados, GU = Guadeloupe, AB = Antigua & Barbuda, UV = U.S. Virgin Islands, PR = Puerto Rico, DR = Dominican Republic, CU = Cuba, CR = Costa Rica, NI = Nicaragua, MX = Mexico.

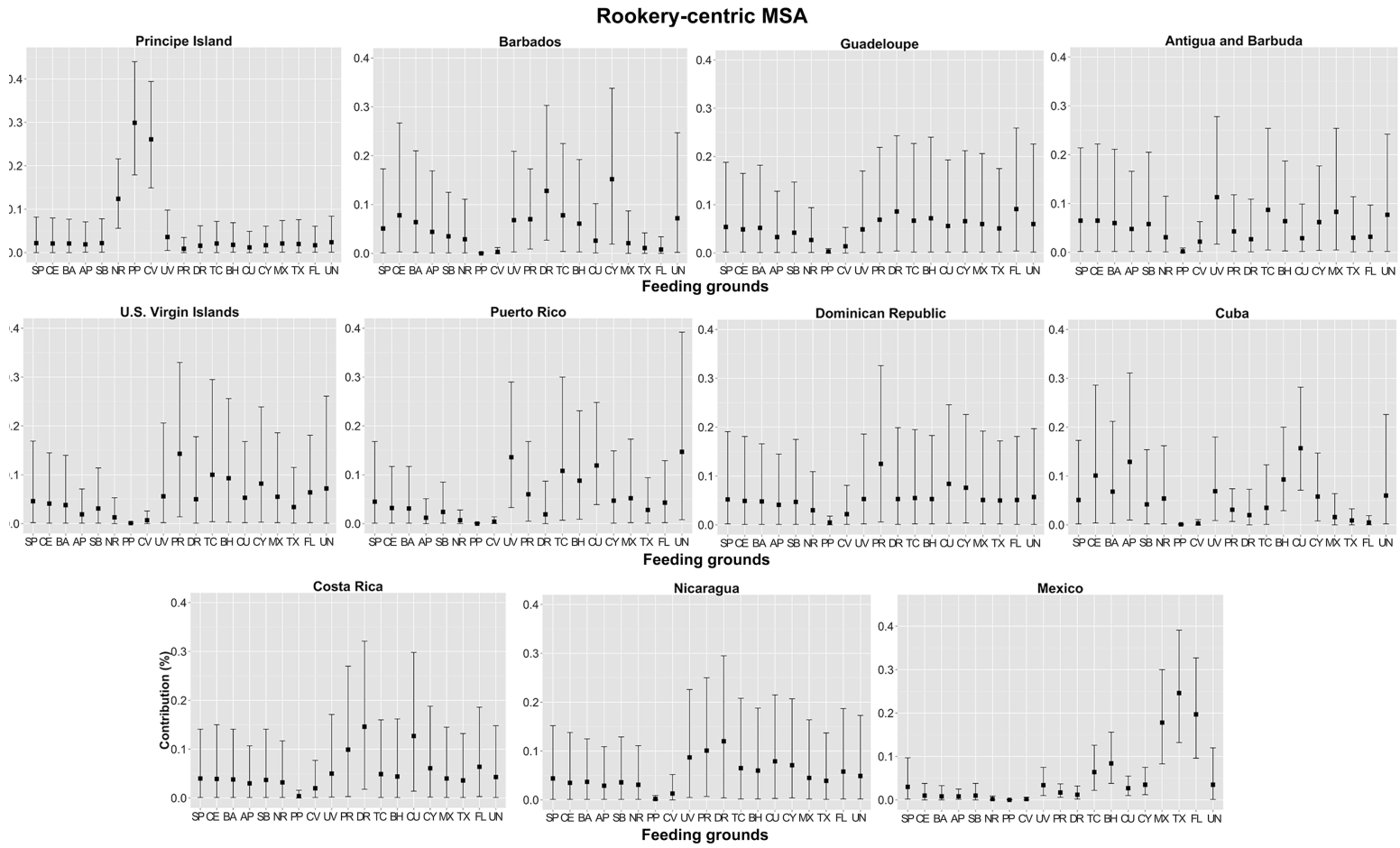


Figure S2. Rookery-centric many-to-many MSA estimates for Atlantic nesting populations. SP = São Pedro and São Paulo, CE = Ceará coast, BA = Bahia coast, AP = Abrolhos Park, SB = South Brazil, NR = Noronha/Rocas, PP = Principe, CV = Cape Verde, UV = U.S. Virgin Islands, PR = Puerto Rico, DR = Dominican Republic, TC = Turks & Caicos, BH = Bahamas, CU = Cuba, CY = Cayman Islands, MX = Mexico, TX = Texas, FL = Florida, UN = Unknown.

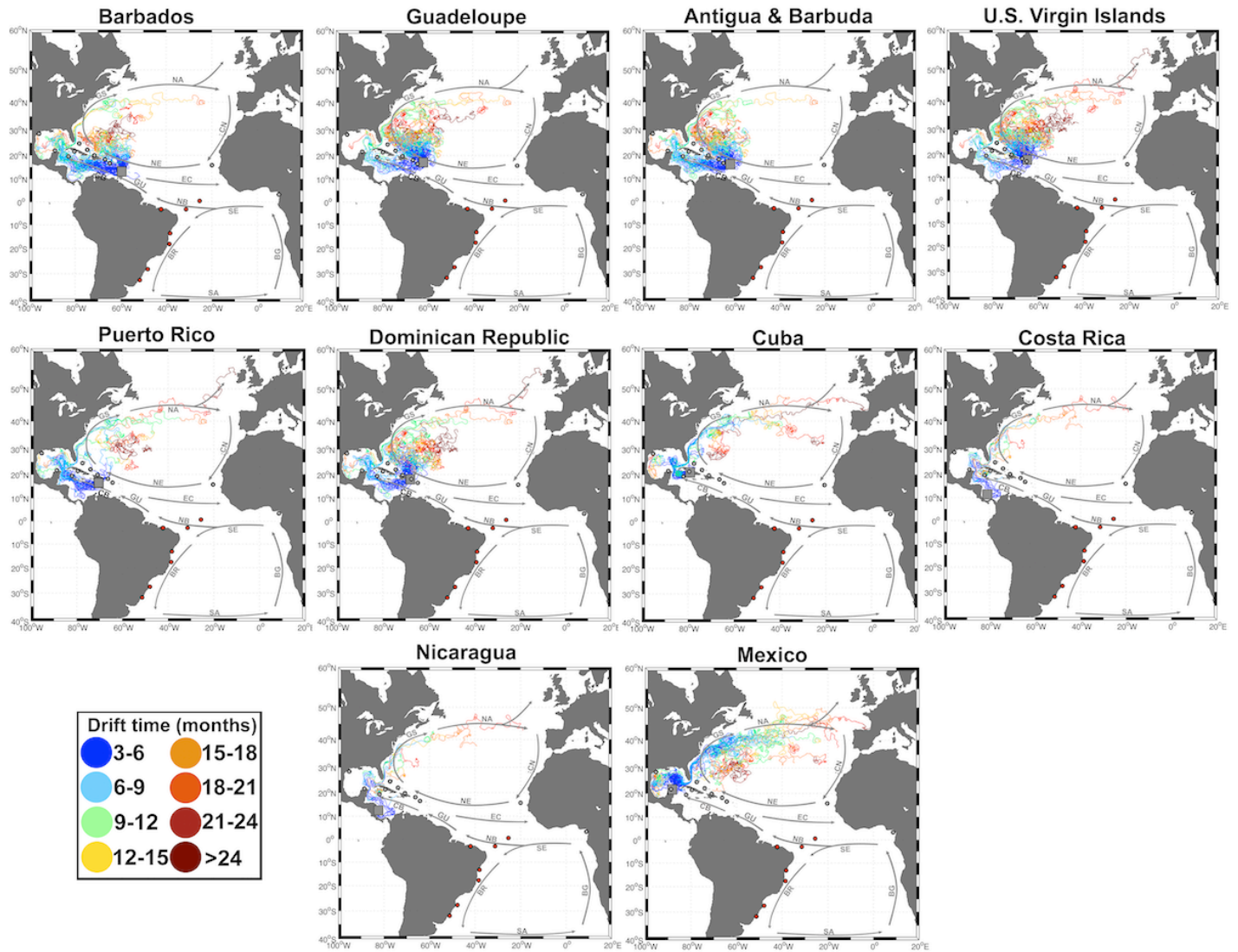


Figure S3. Pathways of drifters passing by Atlantic Ocean rookeries. Colors indicate drift time (in months). Grey squares = drifter release areas around the rookeries, red circles = Brazilian feeding grounds, grey circles = other Atlantic Ocean feeding grounds. Grey arrows indicate the flow of the major Atlantic Ocean currents: SE = South Equatorial Current, BR = Brazil Current, SA = South Atlantic Current (displaced to the North for illustrative purposes), BG = Benguela Current, NB = North Brazil Current, GU = Guiana Current, CB = Caribbean Current, EC = Equatorial Counter Current, NE = North Equatorial Current, GS = Gulf Stream, NA = North Atlantic Current, CN = Canary Current.

Artigo 4: Life history in a tortoiseshell: detecting ontogenetic ecological changes of hawksbill sea turtles through stable isotope analysis

Em preparação para submissão ao *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*

Maira C. Proietti^{1*}, Julia Reisser^{2,3}, John Cliff⁴, Danielle S. Monteiro⁵, Luciano S. Soares⁶, Charitha Pattiaratchi² and Eduardo R. Secchi¹

¹Laboratório de Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS 96203-900, Brazil

²School of Environmental Systems Engineering and The UWA Oceans Institute, University of Western Australia, Perth, WA 6009, Australia

³CSIRO Wealth from Oceans Flagship, Australia

⁴Centre for Microscopy, Characterization and Analysis, University of Western Australia, Perth, WA 6009, Australia

⁵Núcleo de Educação e Monitoramento Ambiental (NEMA), Rio Grande, RS 96207-480, Brazil

⁶Archie Carr Center for Sea Turtle Research and Department of Biology, University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA

Abstract

The life cycle of hawksbill sea turtles initiates with a cryptic oceanic phase characterized by wide dispersal, usually followed by recruitment to coral or sponge reefs for feeding and developing. The ecology of these animals during their initial stages is difficult to assess from direct observation in the field. Alternative indirect approaches such as stable isotope analysis, however, have been increasingly used. Here, we determined $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ($\delta^{15}\text{N}$) isotope ratios in carapace ($n = 21$) and skin ($n = 10$) of immature hawksbill turtles sampled at four locations along the extensive Brazilian coast, in order to investigate their habitat and foraging ecology. We tested a new analytical tool, Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS), for isotopic analysis of carapace transversal cross-sections, and also used conventional Continuous-Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry (CF-IRMS) for analysis of scute and skin samples. SIMS provided high spatial resolution of samples, allowing for the analysis of up to ten 20 μm transversal layers per carapace cross-section. Although absolute isotope values could not be acquired, relative ratios adequately described life history variations of hawksbills, and apparently detected their transition from a generalist and opportunistic feeding behavior (oceanic phase) to a more specialized carnivorous diet (coastal phase) in some samples. Stable isotope ratios obtained through IRMS revealed significantly higher mean $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in skin than scute samples. Since skin has higher turnover rates than scute, this supports that the recent history of these animals is characterized by feeding on higher

trophic level prey, likely benthic animals, and habitats closer to the coast. Mean $\delta^{13}\text{C}$ was significantly lower in scute samples collected at oceanic/higher latitude areas when compared to coastal/lower latitude locations, and mean $\delta^{15}\text{N}$ was significantly more enriched ($\sim 3\%$) in scutes of larger than smaller animals. SIMS analysis of stable isotopes in carapace samples is a potentially powerful tool for a better understanding of some life traits such as the habitat use pattern and foraging ecology of this critically endangered species.

Keywords: Stable isotopes, *Eretmochelys imbricata*, diet, habitat shifts, Western South Atlantic, IRMS, SIMS

Introduction

Highly migratory marine species often display cryptic or inaccessible life stages that can be quite difficult to investigate, but encompass key aspects of their ecology and habitats. These life stages are often difficult to investigate through direct observation in wild. Stable isotope analysis has emerged as a powerful tool in ecological research of marine animals, and is based on the fact that the ratio between heavy and light isotopes of elements in the tissues of consumers reflects the composition of their diets (Peterson and Fry 1987). Isotope ratios can therefore be very informative on the trophic ecology and diet of several species, including sea turtles (e.g. Godley et al. 1998, Arthur et al. 2009, Wallace et al. 2009, Bjorndal and Bolten 2010; Dodge et al. 2011, Vander Zanden et al. 2013). This analysis is also being increasingly used to infer on migrations and origins (Zbinden et al. 2011, Ceriani et al. 2012, Seminoff et al. 2012), as well as ontogenetic shifts in life history traits of these animals (Reich et al. 2007, Arthur et al. 2008).

The life history of most sea turtles is characterized by an initial epipelagic phase usually in the oceanic environment, in which post-hatchlings disperse widely with ocean currents, and feed opportunistically on plants and animals near or at the sea surface. This is followed by recruitment to coastal areas with adequate conditions for selective benthic feeding and resting (Bolten 2003). These changes in habitat and diet are reflected in the stable isotope ratios of sea turtle tissues, such as the skin and carapace. Reich et al. (2007) and Arthur et al. (2008) have encountered in green turtles (*Chelonia mydas*) a general pattern of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) increase associated with the transition from oceanic to neritic habitats, and a $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ($\delta^{15}\text{N}$) decrease due to shift from omnivorous (epipelagic phase) to predominantly herbivorous (benthic phase) diets of this species. The critically endangered

hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) follows the general epipelagic/oceanic-benthic/neritic pattern, often recruiting to coral and sponge reefs or other hard-bottom habitats with abundance of sponges and zoanthids, their preferred food (Meylan and Donnelly 1999, León and Bjorndal 2002, Proietti et al. 2012). For hawksbills, however, this habitat/diet shift has not yet been identified through stable isotope analysis.

Stable isotope ratios of biological samples are commonly determined through Continuous-Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry (CF-IRMS). In this technique, samples are combusted into a pure gas and isotope ratios measured through mass spectrometry; detected ratios are then precisely determined by comparison to the element's internationally recognized standard (Muccio and Jackson, 2009). Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS) is currently emerging as a valuable tool for stable isotope determination, being used to date mainly in geosciences (Ireland, 2004). This technique consists of bombarding a sample with a high-energy ion beam, sputtering atoms, molecules and ions from the sample surface; the resulting secondary ions are collected into a mass spectrometer and analyzed according to mass/charge ratios (Ireland, 2004). The secondary ion yields vary greatly according to the chemical environment and the sputtering conditions (ion, energy, angle), causing SIMS to be generally considered a qualitative technique with quantification possible only with the use of internal standards analyzed along with samples (Betti, 2005; Ireland, 2004). SIMS has been greatly underused in biological analysis because of the difficulty in obtaining internal standards for animal and plant tissues, but is nonetheless a promising approach due to its high isotopic sensitivity and spatial resolution (Betti, 2005). For example, Hanson et al. (2010) determined oxygen stable isotopes in fish otoliths through CF-IRMS and SIMS, reporting a higher number of samples obtained per unit area using SIMS when compared to CF-IRMS, and similar analytical precisions between the two methods.

In this work, we tested the applicability of SIMS for understanding life history changes in carapace layers of immature hawksbill turtles. We hypothesize that the hawksbill ontogenetic habitat change from pelagic to benthic environments will lead to an increase in $\delta^{13}\text{C}$ and that shifting from an omnivorous, opportunistic diet at the surface layer to a predominantly carnivorous intake of incrusting benthic organisms will result in an increased $\delta^{15}\text{N}$ through time. We also determined stable isotope ratios of hawksbill skin and carapace through standard IRMS, and compared mean values obtained with this method in terms of tissue type, habitat, and animal size.

Methods

Carapace samples were collected from immature hawksbill turtles at four locations in Brazilian waters (Figure 1): (1) São Pedro and São Paulo Archipelago (SPSP; $n = 3$, Curved Carapace Length – CCL = 38 – 75 cm, mean 50.1 cm), (2) Abrolhos National Marine Park ($n = 13$, CCL = 26.5 – 58.5 cm, mean 35.8 cm), (3) Arvoredo Biological Marine Biological Reserve ($n = 1$, CCL = 30 cm), and (4) Cassino Beach ($n = 4$, CCL = 36 – 39 cm, mean 33.8 cm). Samples (~ 1.5 cm) were taken with disposable scalpels from the posterior edge of the right-hand first lateral scute (Figure 1) of turtles manually captured during dives at SPSP, Abrolhos and Arvoredo, and from individuals incidentally caught in fishing nets or stranded on the beach at Cassino. Skin (~ 5 mm) was also sampled from the trailing edge of the fore flippers of some of the animals at SPSP ($n = 3$) and Abrolhos ($n = 7$) (Figure 1). Sampled tissues were stored frozen until analysis, upon which they were prepared by rinsing with distilled water, oven drying for 48 hours at 60°C, and extracting lipids by immersion and sonication in a chlorophorm/methanol (2:1) solution.

SIMS was performed on seven scute samples from SPSP ($n = 2$), Abrolhos ($n = 4$) and Arvoredo ($n = 1$). Transversal cross-sections were cut from each sample, mounted into resin, and polished with diamond polishing pads until smooth. Mounts were then coated with gold and inserted into a CAMECA IMS 1280 (Cameca SAS, France) for isotope analysis, at the University of Western Australia's Centre for Microscopic Characterization and Analysis. For determination of stable isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$), an ion beam with diameter of 20 μm was directed onto the samples in between apparent growth lines ("layers"), from oldest to newest tissue (top to bottom portion of scute). This is the first observation of growth lines in sea turtle scute, thus we do not know how much time of the animal's life that each layer represents. When possible, 2-3 replicates were analyzed per sampling layer (Figure 2). Stable isotope ratios are expressed relative to isotope standards in the conventional delta (δ) notation in parts per thousand (‰): $\delta = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000$; where R_{sample} and R_{standard} are the heavy to light isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C} - \delta^{13}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N} - \delta^{15}\text{N}$) in the samples and standards. PeeDee Belemnite (PDB) and atmospheric nitrogen were used respectively for carbon and nitrogen isotope standards. Despite some attempts, we were unable to determine an adequate internal standard for turtle scute; therefore, SIMS isotope ratios are not absolute.

Twenty-one scute and ten epidermis samples were analyzed through IRMS. Subsamples (two for each sample) of approximately 0.8 mg were placed into tin capsules and stable isotope ratios of carbon and nitrogen determined through a continuous flow

system consisting of a Delta V Plus mass spectrometer connected with a Thermo Flush 1112 via ConFlo IV (Thermo Finnigan, Germany), at the University of Western Australia's Biogeochemistry Centre. Stable isotope ratios determined through IRMS are expressed relative to isotope standards in the conventional notation described above. External error of IRMS analysis was 0.10‰ for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$.

Relative isotope ratios determined by SIMS were plotted according to position on carapace (means of the values obtained per position) in order to detect possible ontogenetic shifts in life history. When detected, mean values before and after the shift were compared through Student's t-test. Differences between average stable isotope compositions of hawksbill turtle scutes, as determined by IRMS, were also evaluated with t-tests. Isotope ratios of these samples were compared based on location, type of habitat (coastal/oceanic, low/high latitude) and carapace lengths (animals with CCL under and over 40 cm). We also compared the mean IRMS isotope ratios of skin and scute tissues, and skin samples according to carapace lengths (animals with CCL under and over 40 cm).

Results and Discussion

SIMS of carapace samples allowed for stable isotope ratio analysis of five to ten transversal layers, depending on sample width (). To our knowledge, the accretion rate of keratin on sea turtle carapace has never been evaluated. Therefore, we do not know how much time each transversal section of carapace actually represents, but believe that it could hold information from several years, as described by Reich et al. (2007) for loggerhead scutes. Some samples presented relatively homogenous ratios, indicating that these animals had been occupying similar habitat and trophic niche for some time (a,e). Three samples from Abrolhos (d,f,g) presented a gradual increase in both $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ from older to newer tissue, possibly indicating the transition to a coastal habitat with abundance of preferred benthic prey (as is the case of the Abrolhos area; Werner et al., 2000). In one of these samples an abrupt increase of $\sim 3\text{‰}$ in $\delta^{15}\text{N}$ was observed from older to newer scute (d). This shift was observed from the first to the second position on the carapace, therefore comparison of before/after mean values was not possible. An abrupt increase of approximately 4‰ in $\delta^{15}\text{N}$ between the fourth and fifth sampling position (c) was also observed in one sample from Arvoredo Island. The mean values before (4.51‰) and after (9.49‰) this position were significantly different ($p < 0.001$). This difference might be reflecting the transition from an omnivorous opportunistic feeding behavior in the epipelagic zone to a more specialized carnivorous diet based on the benthic organisms of

Arvoredo's rocky reefs (Reisser et al. 2013). The $\delta^{13}\text{C}$ pattern also showed some variation, with enrichment followed by depletion. We hypothesize that this could possibly be reflecting recruitment to the coast (increasing $\delta^{13}\text{C}$) followed by migration to higher latitudes (decreasing $\delta^{13}\text{C}$).

$\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of hawksbill turtle samples, as determined by IRMS, ranged from 4.79‰ to 9.15‰ and -19.85‰ to -10.16‰, respectively (Table 1). Overall, skin samples presented significantly higher mean $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values than scute samples ($p < 0.05$), indicating that the recent history of these animals is characterized by feeding on higher trophic level prey and occupying habitats closer to the coast. Mean $\delta^{15}\text{N}$ ratios did not vary significantly between sampling locations, but $\delta^{13}\text{C}$ was significantly depleted at the oceanic islands of SPSP and higher-latitude areas Cassino and Arvoredo, when compared to the coastal, low-latitude location of Abrolhos ($p < 0.05$). Additionally, when evaluating isotope ratios in scute samples of differently sized animals, mean $\delta^{15}\text{N}$ was significantly more enriched ($\sim 3\text{‰}$) in animals with carapace lengths over 40 cm. Since IRMS of scute samples reflects the whole period contained in this tissue, this indicates that larger animals have been feeding for a longer time on higher trophic level organisms. On the other hand, mean $\delta^{13}\text{C}$ of scute did not vary between size classes, possibly reflecting a high range of habitats and latitudes occupied throughout hawksbills' lives. $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ of skin samples, which reflect recent history, did not vary between size classes, indicating that the recent diet and habitat of animals is similar despite their size.

In this work, we describe for the first time possible ontogenetic shifts in diet and habitat of hawksbill turtle based on stable isotope analysis of its carapace. Both SIMS and IRMS supported to some extent the hypothesis that $\delta^{15}\text{N}$ becomes more enriched after the species recruits to coastal areas where they feed upon benthic sponges and zoanthids. However, we highlight the large variability of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values between animals throughout the unknown time period detected by SIMS (see Figure 3). This is likely due to individual variations in size and location, indicating that there is no general rule in how or when these animals undergo these ontogenetic changes. Using SIMS for isotopic analysis provided high spatial resolution, with analysis of up to ten transversal sections of each scute sample. Application of SIMS to carapace describes a greater chronological record of sea turtle life history as this tissue has slower turnover rates than skin (Reich et al. 2007) and contains several growth layers. Despite being limited to only relative values of isotope ratios, we demonstrate that SIMS has potential for providing relevant data on the foraging behavior and habitat use patterns of sea turtles over a wide spatial and temporal scale.

Future studies should focus on developing adequate internal standards for determining absolute isotope ratios of scutes, or even turtle bone cross-sections for obtaining information of the animals' entire lives. Based on the growth and isotopic incorporation of tissues, it could be possible to precisely calculate the duration of the hawksbill turtle epipelagic phase as done for green turtles (Reich et al. 2007), which is still a debated matter in sea turtle biology. Defining ecological aspects such as feeding ecology and habitat use pattern during cryptic life stages is fundamental for a better understanding of the life history of sea turtles.

References

- Arthur, K.E., Boyle, M.C., Limpus, C.J., 2008. Ontogenetic changes in diet and habitat use in green sea turtle (*Chelonia mydas*) life history. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 362, 303–311.
- Arthur, K.E., McMahon, K.M., Limpus, C.J., Dennison, W.C., 2009. Feeding ecology of green turtles (*Chelonia mydas*) from Shoalwater Bay, Australia. *Mar. Turt. Newsl.* 123, 6–12.
- Betti, M., 2005. Isotope ratio measurements by secondary ion mass spectrometry (SIMS) and glow discharge mass spectrometry (GDMS). *Int. J. Mass Spectrom.* 242, 169–182.
- Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., 2010. Hawksbill sea turtles in seagrass pastures: success in a peripheral habitat. *Mar. Biol.* 157, 135–145.
- Bolten, A., 2003. Variation in sea turtle life history patterns: neritic vs. oceanic developmental stages, in: Lutz, P., Musick, J., Wyneken, J. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles*, Vol 2. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 243–257.
- Ceriani, S. a, Roth, J.D., Evans, D.R., Weishampel, J.F., Ehrhart, L.M., 2012. Inferring foraging areas of nesting loggerhead turtles using satellite telemetry and stable isotopes. *PLoS One* 7, e45335.
- Dodge, K.L., Logan, J.M., Lutcavage, M.E., 2011. Foraging ecology of leatherback sea turtles in the Western North Atlantic determined through multi-tissue stable isotope analyses. *Mar. Biol.* 158, 2813–2824.
- Godley, B., Thompson, D., Waldron, S., Furness, R., 1998. The trophic status of marine turtles as determined by stable isotope analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 166, 277–284.
- Hanson, N.N., Wurster, C.M., Todd, C.D., 2010. Comparison of secondary ion mass spectrometry and micromilling/continuous flow isotope ratio mass spectrometry techniques used to acquire intra-otolith $\delta^{18}\text{O}$ values of wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 2491–2498.

- Ireland, T.R., 2004. SIMS Measurement of Stable Isotopes, in: de Groot, P. (Ed.), Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques, Volume 1. Elsevier Science, Burlington, pp. 652–691.
- León, Y.M., Bjorndal, K.A., 2002. Selective feeding in the hawksbill turtle, an important predator in coral reef ecosystems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 245, 249–258.
- Meylan, A.B., Donnelly, M., 1999. Status justification for listing the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) as Critically Endangered on the 1996 IUCN Red List of Threatened Animals. *Chelonian Conserv. Biol.* 3, 200–224.
- Muccio, Z., Jackson, G.P., 2009. Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Analyst* 134, 213–22.
- Peterson, B.J., Fry, B., 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 293–320.
- Proietti, M.C., Reisser, J., Secchi, E.R., 2012. Foraging by immature hawksbill sea turtles at Brazilian islands. *Mar. Turt. Newsl.* 135, 4–6.
- Reich, K.J., Bjorndal, K. a, Bolten, A.B., 2007. The “lost years” of green turtles: using stable isotopes to study cryptic lifestages. *Biol. Lett.* 3, 712–4.
- Reisser, J., Proietti, M., Sazima, I., Kinas, P., Horta, P., Secchi, E., 2013. Feeding ecology of the green turtle (*Chelonia mydas*) at rocky reefs in western South Atlantic. *Mar. Biol.* 160, 3169–3179.
- Seminoff, J. a., Benson, S.R., Arthur, K.E., Eguchi, T., Dutton, P.H., Tapilatu, R.F., Popp, B.N., 2012. Stable isotope tracking of endangered sea turtles: validation with satellite telemetry and $\delta^{15}\text{N}$ analysis of amino acids. *PLoS One* 7, e37403.
- Vander Zanden, H., Arthur, K., Bolten, A., Popp, B., Lagueux, C., Harrison, E., Campbell, C., Bjorndal, K., 2013. Trophic ecology of a green turtle breeding population. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 476, 237–249.
- Wallace, B.P., Avens, L., Braun-McNeill, J., McClellan, C.M., 2009. The diet composition of immature loggerheads: insights on trophic niche, growth rates, and fisheries interactions. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 373, 50–57.
- Werner, T.B., Pinto, L.P., Dutra, G.F., Pereira, P.G.D.P., 2000. Abrolhos 2000: conserving the Southern Atlantic’s richest coastal biodiversity into the next century. *Coast. Manag.* 28, 99–108.
- Zbinden, J., Bearhop, S., Bradshaw, P., Gill, B., Margaritoulis, D., Newton, J., Godley, B., 2011. Migratory dichotomy and associated phenotypic variation in marine turtles revealed by satellite tracking and stable isotope analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 421, 291–302.

Tables

Table 1. Range and mean (SE) $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ of scute and skin sampled from immature hawksbills in Brazil.

		$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	
Location	n	Range	Mean (SE)	Range	Mean (SE)
Abrolhos					
Scute	13	6.55 to 8.97	7.60 (0.23)	-19.08 to -14.15	-17.78 (0.38)
Skin	7	7.12 to 8.65	7.94 (0.19)	-17.10 to -10.16	-15.00 (0.92)
SPSP					
Scute	3	4.79 to 8.94	6.58 (0.93)	-19.37 to -17.14	-18.35 (0.65)
Skin	3	8.08 to 9.15	8.75 (0.23)	-16.99 to -16.40	-16.66 (0.38)
Arvoredo					
Scute	1	6.38	-	-19.38	-
Cassino					
Scute	4	5.29 to 7.10	6.25 (0.46)	-19.85 to -17.7	-18.68 (0.44)

Figures



Figure 1. Immature hawksbill sampling locations in Brazilian waters (black dots). Samples size per area and tissue is indicated. Below to the right, the red circles indicate the sampling position, scute (1) and skin (2), on the turtle's body.

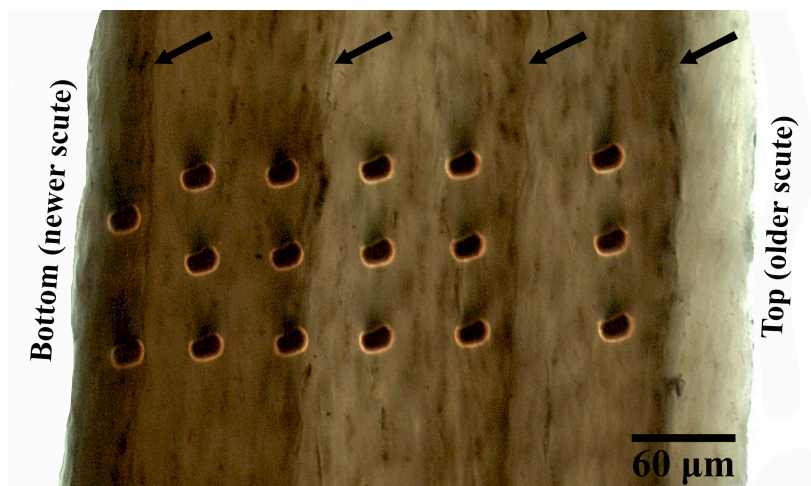


Figure 2. Image of a transversal cross-section of a carapace sample showing individual (20 μm) SIMS ion beam incidence spots. Arrows indicate possible growth lines.

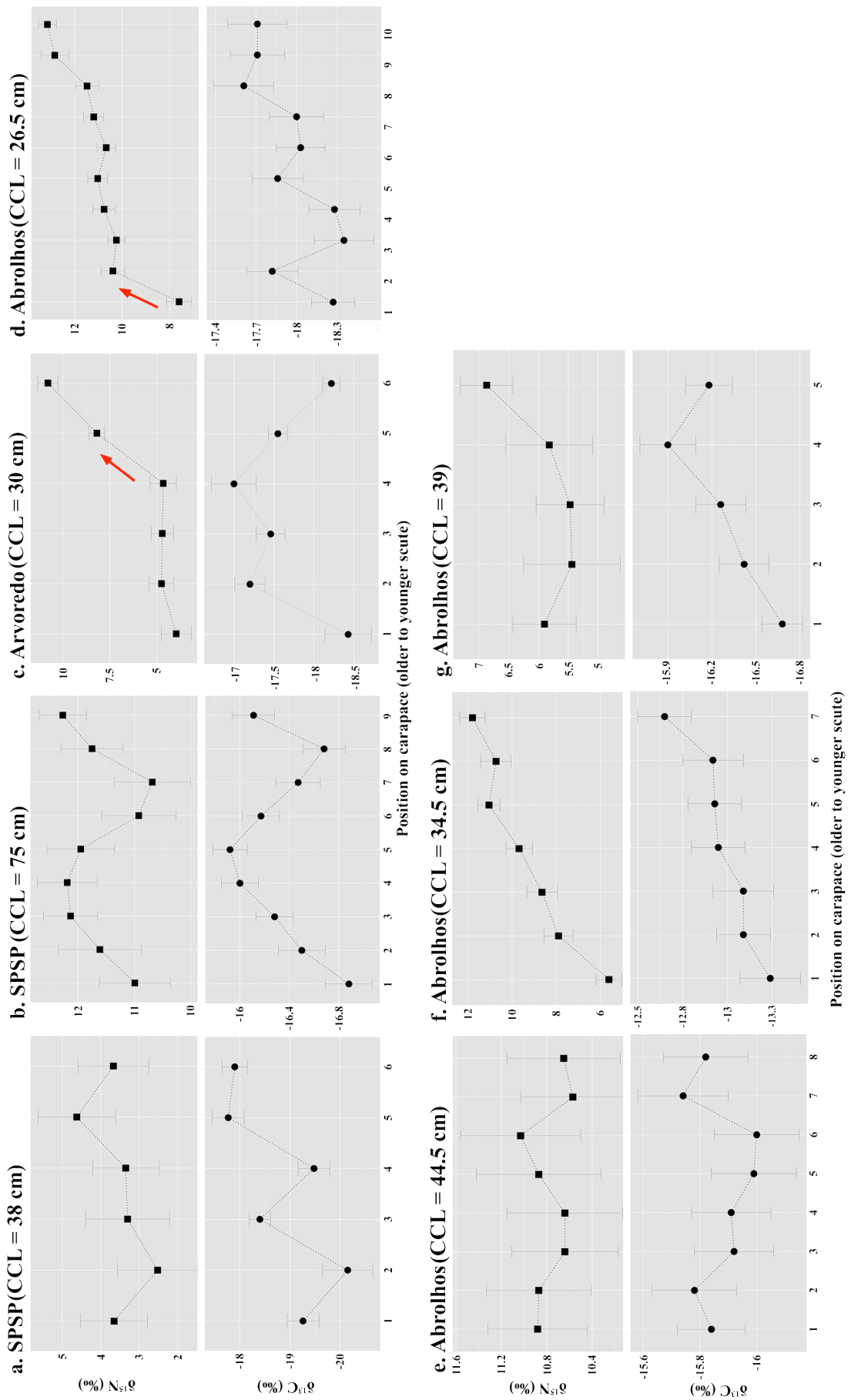


Figure 3. SIMS isotope ratios of scute cross-sections of immature hawksbill turtles from SPSP (a,b), Arvoredo (c), and Abrolhos (d,e,f,g), with $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ ratios plotted according to position on carapace (older to younger tissue). Squares represent nitrogen and dots carbon stable isotopes; bars are standard errors. Red arrows indicate possible ontogenetic shifts in life history.

Outras publicações no período do doutorado

Reisser J, **Proietti M**, Sazima I (2010). First record of the silver porgy (*Diplodus argenteus*) cleaning green turtles (*Chelonia mydas*) in the southwest Atlantic. Marine Biodiversity Records 3: 1-2.

Proietti M, Reisser J, Kinas P, Kerr R, Monteiro D, Marins L, Secchi E (2012). Green turtle *Chelonia mydas* mixed stocks in the western South Atlantic, as revealed by mtDNA haplotypes and drifter trajectories. Marine Ecology Progress Series 447(1): 195-209.

Reisser J, **Proietti M**, Sazima I, Kinas P, Horta P, Secchi E (2013). Feeding ecology of the green turtle (*Chelonia mydas*) at rocky reefs in western South Atlantic. Marine Biology 160(12): 3169-3179.

Reisser J, Shaw J, Wilcox C, Hardesty BD, **Proietti M**, Thums M, Pattiaratchi C (2013). Marine Plastic Pollution in Waters around Australia: Characteristics, Concentrations, and Pathways. PloS One 8(11), publicado em 27 de novembro de 2013.

Proietti M (2013). *E. imbricata* flipper profiles and underwater photographs (Abrolhos National Marine Park and São Pedro and São Paulo Archipelago, 2010 - 2011), DOI:<http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.826087>. *Dataset* publicado no servidor Figshare contendo fotos (.jpg) de perfis faciais e nadadeiras de tartarugas-de-pente capturadas, e subseqüentes observações subaquáticas, com o objetivo de auxiliar no desenvolvimento de programas computacionais para a foto-identificação de tartarugas marinhas.