

**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS**

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Chelonia mydas* (TESTUDINES:  
CHELONIIDAE): QUAL A RELAÇÃO COM A ALTA INCIDÊNCIA DE  
FIBROPAPILOMATOSE?**

**ELAINE COSTA CAMPINHOS**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO / 2017**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS**

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Chelonia mydas* (TESTUDINES:  
CHELONIIDAE): QUAL A RELAÇÃO COM A ALTA INCIDÊNCIA DE  
FIBROPAPILOMATOSE?**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

**ELAINE COSTA CAMPINHOS**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO/2017**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C196v      Campinhos, Elaine Costa.  
Variabilidade genética em *Chelonia mydas* (testudines: cheloniidae): qual a relação com a alta incidência de fibropapilomatose? / Elaine Costa Campinhos – 2017.  
33 f.: il.

Orientadora: Rute Beatriz Garcia Clemente Carvalho.  
Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) -  
Universidade Vila Velha, 2017.  
Inclui bibliografias.

1. Ecologia. 2. Tartaruga. 3. Projeto Tamar.  
I. Carvalho, Rute Beatriz Garcia Clemente. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577

**ELAINE COSTA CAMPINHOS**

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Chelonia mydas* (TESTUDINES:  
CHELONIIDAE): QUAL A RELAÇÃO COM A ALTA INCIDÊNCIA DE  
FIBROPAPILOMATOSE?**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2017,

Banca Examinadora:



---

**Paulo Dias Ferreira Júnior – UFES**



---

**Ary Gomes da Silva – UVV**



---

**Rute Beatriz Garcia Clemente Carvalho – UVV**

**Orientadora**

“...Hoje eu sei que intersomos, interconectados com tudo que existe. Somos um só corpo e uma só vida. Estamos em rede. Na rede de Indra, feita com raios luminosos e em cada intersecção uma joia recebendo e emitindo raios em todas as direções. Hoje eu sei que somos co responsáveis pela realidade em que vivemos, pelo mundo em que estamos e que não adianta reclamar, é preciso agir para transformar...”

- Monja Coen

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu pai Oxalá e a todo povo de Aruanda por toda força e por estarem sempre ao meu lado, tanto nas horas de alegria quanto nas dificuldades.

À minha família, meus pais, Érico e Maria da Penha, e irmãos, Érica e Eduardo, que mesmo estando distante me dão todo o apoio, com muito amor e carinho; sei que estão trilhando essa jornada comigo. Pai e mãe, não posso deixar de destacar o “paitrocínio” sem o qual eu não conseguiria chegar tão longe.

Agradeço carinhosamente à minha orientadora, Dra. Rute Beatriz Garcia Clemente Carvalho, pela confiança, apoio, paciência e dedicação. Agradeço, também, pelos momentos de descontração que tivemos, os cafés, os almoços, as conversas no estacionamento; foram muito importantes para “abrir a mente”.

A todos os professores da Universidade Vila Velha especialmente a Dra. Ana Carolina Srbek de Araujo, que contribuiu pra minha formação acadêmica e profissional, e que também se tornou uma grande amiga.

Aos outros familiares, sobretudo Ângela Azevedo Campos e Luiz Augusto Mill, que me dão todo apoio aqui em Vila Velha.

Ao professor Dr. Marcelo Renan, ao veterinário Yhuri Nobrêga e ao biólogo Paulo “Marrom”, que me auxiliaram não só nas coletas de campo, mas também na minha realização pessoal/profissional de estudar esses seres tão magníficos que são as tartarugas marinhas. Gratidão aos alunos Carol, Dani, Ygor, Victor, Larissa, Alan, Pupu e ao próprio Instituto Marcos Daniel, pela companhia maravilhosa nos trabalhos de campo. Não posso deixar de mencionar o Instituto de Pesquisa e Conservação Marinha que também nos auxiliou com os campos, no município de Anchieta.

Ao meu amigo que hoje é um grande irmão, Alexander Tamanini Mônico, ou melhor, Ale, por todos os momentos de descontração que vivemos durante nosso período conturbado, toda paciência nos trabalhos do mestrado e principalmente por me proporcionar momentos maravilhosos nos seus campos (pode deixar que eu não vou falar o tanto que eu te xinguei quando me colocava pra subir aqueles morros de cóccix quebrado).

Aos amigos de laboratório que faziam os dias passar mais rápido e tornavam tudo mais divertido: hoje, já biólogos, Wesley Rangel, Suzana Carvalho e Eliane Giori, e os doutorandos Lillian Jardim, Aline Gomes, Raiza Salvador e Vinicius Davel.

Às minhas amigas que levo sempre comigo no coração, que estão sempre dispostas a me ouvir e me dão conselhos maravilhosos: Laura, Ana Luiza, lully, Magda e Carol Bellumat.

Às fubiqueiras (Flávia, Renata e Nathália) que depois de 3 anos distantes ainda me fazem sentir amada e nunca sozinha, lembrando sempre dos bons momentos.

Ao meu namorado, Hugo, por estar sempre ao meu lado, me auxiliando em tudo que pode, por me ouvir, por me respeitar, me amar e acima de tudo, fazer com que eu me sinta uma Super Bióloga, achando interessante tudo o que eu conto sobre essa profissão difícil, mas gratificante e que me entrego com garra e amor.

Aos Dr. Rodrigo Ferreira, doutorando Marcio Mageski e novamente a Dra. Ana Carolina, pelo auxílio nos trabalhos paralelos ao projeto de mestrado.

À minha turma de mestrado: Flora, Fellipe, Júlia, Tati, Giuliano, Rayara e Dandara, força galera, tá acabando, vocês também serão vencedores!

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo – FAPES, pela bolsa de mestrado concedida a mim para a realização deste trabalho.

À UVV e a todos os funcionários, não só do Laboratório, mas de todo complexo. Afinal, sem eles, nenhum trabalho nosso seria possível.

Aos componentes da banca que aceitaram participar desta importante etapa da minha vida e que, com certeza, muito contribuíram na minha formação acadêmica e meu futuro profissional.

Axé e gratidão!



# SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1.INTRODUÇÃO	1
2.MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1. Área de estudo	5
2.2. Coleta do tecido	6
2.3. Extração de DNA	7
2.4. PCR	7
2.5. Sequenciamento do gene mitocondrial ND2, e do gene nuclear MHC	8
2.6. Presença de fibropapilomatose	8
2.7. Análise de dados	8
3. Resultados	10
4. Discussão	13
5. Conclusão	16
6. Referências	17

## RESUMO

CAMPINHOS, E.C., M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2017  
**VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Chelonia mydas* (TESTUDINES: CHELONIIDAE): QUAL A RELACÃO COM A ALTA INCIDÊNCIA DE FIBROPAPILOMATOSE?** Orientadora: Dra. Rute Beatriz Garcia Clemente Carvalho.

A Baía de Vitória é uma área de intensa urbanização, porém, apesar de todo impacto causado pela urbanização, possui uma grande variedade de fauna, dentre os quais, a tartaruga verde, *Chelonia mydas*, que tem sua área de nidificação a quilômetros da costa brasileira, comprovando a alta filopatria da espécie. A tartaruga verde utiliza a área da baía de Vitória apenas para alimentação e crescimento dos juvenis. Entretanto, elas vêm apresentando alto índice de fibropapilomatose. Desta forma, para identificar a estrutura genética da população e a variação genética adaptativa foram utilizados dois marcadores moleculares, mitocondrial (ND2) e nuclear (MHC classe I). Para o gene mitocondrial ND2 foi estimada a diversidade de haplótipos e para o gene MHC classe I a diversidade genética foi caracterizada com base no número de alelos, número de sítios segregantes e diversidade de nucleotídeos. A fibropapilomatose foi evidenciada em três populações amostradas, apresentando variação gradual no índice de incidência com relação a proximidade geográfica com a baía de Vitória. O alinhamento dos fragmentos amplificados de ND2 indicou a presença de 3 haplótipos. Um alto nível de polimorfismo foi observado para o gene MHC classe I com pelo menos 40 alelos detectados no total de 160bp amplificados. O padrão de variação no gene mitocondrial ND2 encontrado foi semelhante ao identificado para outros genes mitocondriais estudados, indicando que nesses genes pouca ou nenhuma variação acontece. Entretanto, a variabilidade do gene MHC foi alta. A diversidade do MHC tem sido relacionada à resistência a doenças e aptidão (*fitness*) para diferentes grupos animais. Potencialmente em longo prazo, a combinação de alelos MHC que conferir melhor resposta imune ao vírus da fibropapilomatose será selecionada.

**Palavras chaves:** Baía de Vitória; Filopatria; Fluxo Gênico; Tartaruga verde.

## ABSTRACT

CAMPINHOS, E.C., M.Sc, University of Vila Velha – ES, february de 2017  
**GENETIC VARIATION IN *Chelonia mydas* (TESTUDINES: CHELONIIDAE):  
WHAT IS THE RELATIONSHIP WITH THE HIGH LEVEL OF  
FIBROPAPILLOMATOSIS?** Advisor: Dra. Rute Beatriz Garcia Clemente  
Carvalho.

Vitória Bay is an area of intense urbanization, but despite all the impact caused by urbanization, it has a great variety of fauna, among them, the green turtle, *Chelonia mydas*, which has its nesting area at kilometers of the Brazilian coast, proving the high philopatry of this specie. The Green Turtle uses the Vitória Bay area only for feeding and juvenile growth. However, they have a high index of fibropapillomatosis. Thus, two molecular markers, mitochondrial (ND2) and nuclear (MHC class I), were used to identify the genetic structure of the population and the adaptive genetic variation. For the mitochondrial ND2 gene the diversity of haplotypes was estimated and for the MHC class I gene diversity was characterized based on the number of alleles, number of segregating sites and nucleotide diversity. The fibropapillomatosis was evidenced in three sampled populations, showing a gradual variation in the incidence index in relation to the geographical proximity with the Bay of Vitória. Alignment of amplified ND2 fragments indicated the presence of 3 haplotypes. A high level of polymorphism was observed for the MHC class I gene with at least 40 alleles detected in the total of 160bp amplified. The pattern of variation in the mitochondrial ND2 gene found was similar to that identified for other mitochondrial genes studied, indicating that in these genes little or no variation occurs. However, the variability of the MHC gene was high. MHC diversity has been related to disease resistance and fitness for different animal groups. Potentially in the long run, the combination of MHC alleles that impart the best immune response to the fibropapillomatosis virus will be selected.

**Keywords: Gene Flow; Green Turtle; Philopatry; Vitória Bay.**

# 1.INTRODUÇÃO

A Baía de Vitória é uma área de intensa urbanização, apresentando tráfego portuário de grande importância comercial. A Baía recebe o despejo tanto de efluentes domésticos assim como industriais (Santos et al. 2010). Entretanto, apesar de todo impacto causado pela urbanização, a baía de Vitória possui grande variedade de invertebrados (Grohmann, 2006; Ripoli et al., 2007; Cruz, 2014), peixes (Haimovici & Klippel, 1999; Araújo et al., 2008) e mamíferos (Netto & Barbosa, 2003; Netto e Benedetto, 2008). Além desses, o réptil migratório *Chelonia mydas*, a tartaruga verde, é bastante abundante na Baía de Vitória (Lopes, 2016). Essa espécie é classificada pela IUCN como ameaçada, principalmente devido a destruição do habitat, poluição do ambiente marinho e pesca acidental (Lutcavage et al., 1997; Limpus, 2008). A tartaruga verde utiliza a área da baía de Vitória apenas para alimentação e crescimento dos juvenis. Já a área de nidificação dessa espécie ocorre a quilômetros de distância da costa, sendo que os juvenis passam vários anos à deriva deslocando-se através das principais correntes oceânicas (Boyle & Limpus 2008) antes de recrutar as áreas de forrageamento na zona costeira.

Os padrões migratórios de *C. mydas* foram estudados recentemente no Brasil e na Austrália (Naro-Maciel et al., 2014; Jensen et al., 2016) indicando que essa espécie apresenta alta filopatria, que é o comportamento do indivíduo retornar a sua área de nascimento para reprodução (Shields, 1982). Esse comportamento pode contribuir na formação da estrutura populacional, através da redução do fluxo gênico entre grupos de indivíduos que se reproduzem em locais geograficamente separados (Stiebens et al., 2013). A criação de grupos reprodutivos menores e independentes reduz o potencial adaptativo de uma população como um todo, devido a diversidade genética mais distribuída entre as populações do que dentro delas. Por outro lado, a filopatria pode acelerar o processo de perda de variabilidade genética nas populações pois propicia o endocruzamento, o que geralmente acarreta em efeito deletério quanto a reprodução, colocando as populações menores em risco (Keller & Waller, 2002).

As tartarugas verdes que forrageiam as proximidades da baía de

Vitória têm apresentado alto índice de fibropapilomatose (George, 1997; Santos et al., 2010). Cerca de 58% dos indivíduos capturados apresentaram tumores (Santos et al., 2010). A fibropapilomatose é uma doença caracterizada pelo desenvolvimento de tumores na região dos olhos, cavidade bucal, pele, carapaça e plastrão, e até mesmo órgãos internos (Santos et al. 2010). Sabe-se que as tartarugas afetadas com fibropapilomatose apresentam também mais parasitas (Work et al., 2005), são imunossuprimidas (Work et al., 2001) e bacteriêmicas (Work et al., 2003). Todos os organismos estão expostos a diferentes doenças porém, a incidência de uma doença quando se trata de uma espécie ameaçada pode ter consequências arrasadoras para a população como um todo (Sommer, 2005).

Diferentes tipos de marcadores moleculares podem ser utilizados para identificar a estrutura genética de uma população e conseqüentemente estimar a sua variabilidade genética. Para a identificação de polimorfismos são utilizados marcadores moleculares neutros, como é o caso do DNA mitocondrial (Awise, 1994). Quando se utiliza outros tipos de marcadores de forma conjunta é possível que haja um melhor entendimento a respeito dos processos evolutivos na distribuição da variação genética. Marcadores moleculares, tanto mitocondriais quanto nucleares estão sob as mesmas pressões evolutivas, mas podem ocorrer diferenças nos padrões de mutação e modo de herança, o que poderá identificar diferenças na variabilidade e subdivisão populacional (Awise, 1994; Awise, 2000).

Os padrões da estrutura genética das populações de *C. mydas* baseados em marcadores moleculares neutros (DNA mitocondrial e microsatélites) suportam o delineamento de diferentes unidades: (1) Austrália (Jensen et al., 2016), (2) Brasil (Naro-Maciel et al., 2007; Naro-Maciel et al., 2014), (3) Florida (Shamblin et al., 2015), (4) Caribe (Shamblin et al., 2015). A variabilidade genética em todos os estudos mencionados foi baixa, indicando um nível baixo de estrutura populacional. Na verdade, populações com grande tamanho efetivo ou que possuem um alto grau de conectividade geralmente exibem pequena ou nenhuma estrutura populacional quando se observa os marcadores genéticos neutros. Por outro lado, essas populações podem constituir um reservatório de variação adaptativa genética importante para o potencial evolutivo da espécie (Limborg et al., 2012; Vásquez-Carrillo et al.,

2014).

Os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex* - MHC) têm sido usados como marcadores genéticos que caracterizam a variação genética adaptativa em diferentes espécies (Edwards et al., 2000; Stiebens et al., 2013; Magalhães et al., 2015; Rivero-de-Aguilar et al., 2016) devido ao seu papel na resposta imunológica do organismo (Hedrick, 1998). Existem dois tipos de moléculas MHC, classe I e classe II. Ambas as moléculas codificam glicoproteínas que atuam na superfície celular, e que agem no reconhecimento de antígenos exógenos (i.e. peptídeos oriundos de bactérias, vírus e fungos) quando entram em contato com as células do sistema imunológico e desencadeiam resposta imune adequada (Germain & Margulies, 1993; Vásquez-Carrillo et al., 2014). Devido a essa função, considera-se então que parasitas e patógenos são as maiores pressões seletivas atuando na evolução dos genes MHC (Sommer, 2005; Milinski, 2006). A alta diversidade do MHC é mantida nas populações por seleção, via vantagem do heterozigoto (Doherty & Zinkernagel, 1975), vantagem do alelo raro (Clark & Kirby, 1966), e/ou seleção flutuante (Hedrick, Ginevan & Ewing, 1976). A associação positiva entre a diversidade do MHC e o *fitness* individual resultante da resistência a infecções e doenças tem sido documentada amplamente em diferentes espécies (Bernatchez & Landry, 2003; Kloch et al., 2013; Lenz et al., 2013; Sepil, Lachish & Seldon, 2013). Por conseguinte, a perda da variabilidade do MHC devido a efeito gargalo pode comprometer a viabilidade da população (Altizer, Harvell & Friedle, 2003). A variação do MHC entre as populações é mantida por seleção flutuante, em que a pressão seletiva dos patógenos varia no espaço e tempo (Hedrick et al., 1976). Portanto, diferenças regionais nas comunidades de patógenos podem gerar maior estrutura populacional dos genes MHC do que o esperado para os marcadores neutros (Hedrick, 2002).

A hipótese de que a filopatria prejudica o potencial adaptativo de espécies ameaçadas parece convincente, mas levanta algumas questões cruciais. Precisamente, quais são os papéis da evolução neutra e adaptativa na manutenção da diversidade genética em espécies ameaçadas de extinção? Como a filopatria realmente afeta a diversidade genética adaptativa e, portanto, o potencial adaptativo? E, finalmente, qual é o significado evolutivo da filopatria

se reduz a diversidade genética em pequenas populações? Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivos (1) caracterizar a variação do gene MHC classe I ( $\alpha$ -1 cadeia pesada) em *C. mydas* amostradas em quatro áreas diferentes de alimentação no litoral do brasileiro; (2) avaliar a adequação deste marcador para inferir a variação genética adaptativa e associar à presença da doença (fibropapilomatose) entre as quatro regiões amostradas; (3) determinar se a estrutura populacional baseada no MHC correlaciona-se com os padrões de variação genética neutra.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Área de estudo

Amostras de sangue de *C. mydas* foram coletadas em duas localidades no estado do Espírito Santo (ES), sudeste do Brasil (Ilha do Frade e Anchieta), e duas localidades no nordeste do Brasil, Ilha da Coroa Vermelha no estado da Bahia (BA) e Atol das Rocas no estado do Rio Grande do Norte (RN) (Figura 1). A Ilha do Frade (20° 18' S e 40° 16' W) está localizada no município de Vitória (ES) entre o canal da passagem e a Baía de Vitória. Essa ilha é caracterizada por intensa urbanização, e tem sido bastante utilizada para atividades pesqueiras e recreação das populações vizinhas. A área próxima à ilha apresenta efluentes domésticos e industriais oriundos da própria ilha e das regiões vizinhas (Fernandes et al., 2006). A localidade de Anchieta (ES) (20° 79' S e 40° 58' W) situa-se a cerca de 85 Km da cidade de Vitória, é caracterizada por intensa atividade pesqueira e portuária (Alvarenga, 2010). A Ilha da Coroa Vermelha (BA) (17° 50' S e 39° 10' W) possui pouca influência antrópica direta e atividade pesqueira de pequenos grupos de moradores de locais próximos que ficam na ilha por alguns dias para recreação. Por fim, Atol das Rocas (RN) (3° 52' S e 33° 48' W) atualmente é uma Reserva Biológica Marinha. Antes da criação da reserva, Atol das Rocas era utilizado para atividade pesqueira, extração de corais e areia, mas sem influência de efluentes antrópicos (Moraes et al., 2003).





Figura 1. Mapa da localização das áreas de amostragem das populações de *Chelonia mydas*. Os círculos coloridos são referentes as quatro localidades de coleta no litoral brasileiro.

Todas as áreas amostradas são caracterizadas pela presença de ambientes recifais utilizados para alimentação da tartaruga verde, sendo Atol das Rocas uma das áreas de desova da tartaruga verde (Moraes et al., 2003).

## 2.2. Coleta do tecido

As amostras de sangue foram coletadas pelos médicos veterinários do Instituto Marcos Daniel (IMD), localizado no município de Vitória, e Instituto de Pesquisa e Conservação Marinha (IPCmar), localizado no município de Anchieta, sob licença SiSBio nº 50762-1 e nº 31255-8. No total foram coletadas 42 amostras de sangue das quatro populações, sendo 11 indivíduos de Vitória, 7 indivíduos de Anchieta, 14 indivíduos de Coroa Vermelha e 10 indivíduos de Atol das Rocas. Nos municípios de Vitória, Anchieta e Atol das Rocas os indivíduos foram capturados com rede de arrasto e em Coroa Vermelha através

de captura ativa. Todos os indivíduos foram avaliados quanto a presença de fibropapilomatose. Após a avaliação, era feita a assepsia na área correspondente ao seio venoso cervical com álcool, o sangue era coletado, e armazenado em tubos a vácuo contendo Heparina Sódica como anticoagulante. Os tubos foram mantidos em caixas térmicas com gelo até o final da coleta. Logo após a coleta do sangue, os indivíduos foram devolvidos ao mar. Os tubos de sangue foram mantidos em geladeira por até uma semana no Complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha, para posterior isolamento do DNA.

### 2.3. Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o Kit “Ilustra blood genomicPrep Mini Spin Kit” (GE Healthcare Life Sciences). Cerca de 200µl de sangue foram utilizados para a digestão a 55° C. Após a digestão completa, o DNA genômico foi isolado a partir de extrações na coluna de sílica. A qualidade e concentração do DNA extraído foram verificadas em gel de agarose de 1% corado com SyBR Safe (Invitrogen) para visualização em luz ultravioleta. As amostras de DNA extraído foram mantidas em *freezer* (– 20° C).

### 2.4. PCR

Os fragmentos do gene mitocondrial ND2 foram amplificados utilizando os *primers* delineados por mim ND2F (5' CCTACGCACATACAATTATCATCC 3') ND3R (5' AGTAGGGTTGGTGTGATTGG 3'). Para o gene nuclear MHC classe I, foram utilizados os *primers* Cc-MHC-I-F (5'-GATGTATGGGTGTGATCTCCGGG-3') e Cc-MHC-I-R (5'-TTCACCTTCGATGCAGGTCDNCTCCAGGT-3') originalmente delineados para *Caretta caretta* (Stiebens et al., 2013). As amplificações por PCR foram realizadas no termociclador *BioRad* CFX96, seguindo o protocolo descrito em Clemente-Carvalho et al., (2011). As condições para amplificação por PCR para um total de 40 ciclos são as seguintes: desnaturação, 94°C – 30 segundos; hibridização, 52-63 °C – 45 segundos; extensão, 72°C – 1 minuto; extensão final, 72 °C – 7 minutos. Os produtos amplificados nas reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com SyBR Safe

(Invitrogen) para visualização em luz ultravioleta. Os *amplicons* foram purificados com o Kit Wizard<sup>®</sup> SV gel and PCR clean-up System (Promega) para o corte de banda específica e eliminação de fragmentos inespecíficos.

## **2.5. Sequenciamento do gene mitocondrial ND2, e do gene nuclear MHC**

Os produtos de PCR obtidos para ambos os genes foram enviados para sequenciamento no Laboratório Multiuso de Genotipagem e Sequenciamento da Universidade Estadual de Campinas – LMGs/UNICAMP. A validade das sequências obtidas dos dois genes foi verificada através da ferramenta *Nucleotide-Nucleotide Blast* (*National Center for Biotechnology Information*, [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). A acurácia das sequências obtidas foi garantida pela sobreposição das fitas leve e pesada sempre que possível.

## **2.6. Presença de fibropapilomatose**

Uma tabela de prevalência foi elaborada para descrever a frequência de indivíduos amostrados que apresentam fibropapilomatose nos quatro locais amostrados.

## **2.7. Análise de dados**

As sequências de DNA obtidas para o gene mitocondrial ND2 e nuclear MHC classe I foram editadas no programa BioEdit versão 7.2.5. (Hall, 1999), e alinhadas no programa ClustalX (Thompson et al., 1997) implementado no programa BioEdit. Sítios polimórficos foram identificados onde haviam dois ou mais nucleotídeos diferentes em pelo menos dois indivíduos.

Para o gene mitocondrial ND2 foi estimada a diversidade de haplótipos seguindo Nei (1987), no programa PopArt versão 1.7.2. (French et al., 2013), utilizando a função *Integer NJ net* e *reticulation tolerance=0*. As frequências de haplótipos para os fragmentos de ND2 foram comparadas com as sequências disponíveis no GenBank de *C. mydas*.

Para o gene MHC classe I a diversidade genética foi caracterizada com base no número de alelos, número de sítios segregantes e diversidade de nucleotídeos estimados no programa PopArt versão 1.7.2. (French et al., 2013). Os peptídeos foram inferidos a partir da tradução do segmento de MHC no programa Mega v6 (Tamura et al., 2013). As frequências dos peptídeos

inferidos foram calculadas para cada população como o número de indivíduos que possuem dada sequência de peptídeos dividido pelo número de sequências detectadas na população.

A seleção no gene MHC classe I foi testada seguindo dois métodos. O primeiro, considera a razão entre as substituições não-sinônimas e sinônimas ( $\omega$ ). Sob a influência de seleção positiva, o número de mutações não-sinônimas será maior do que o número de mutações sinônimas e  $\omega$  será portanto, maior do que 1 (Bamshad & Wooding, 2003). A significância de  $\omega$  foi acessada através do teste Z sob a hipótese nula de neutralidade ( $\omega = 1$ ) utilizando o método de Nei & Gojobori (1986) com a correção de Jukes-Cantor. O segundo método para testar a seleção no gene MHC foi o teste estatístico D de Tajima, em que se testa a seleção de equilíbrio (*balancing selection*) comparando-se o número de sítios segregantes e o número de diferenças pareadas de nucleotídeos. As estatísticas  $\omega$ , D de Tajima e teste Z foram conduzidas no programa Mega v6 (Tamura et al., 2013).

### 3. RESULTADOS

A fibropapilomatose foi evidenciada em três populações amostradas, apresentando variação gradual de incidência com relação a proximidade geográfica com a baía de Vitória (Tabela I). Os indivíduos amostrados em Atol das Rocas não apresentaram nenhuma evidência da presença da doença (0%), enquanto os indivíduos amostrados na baía de Vitória apresentaram a maior ocorrência da doença (61%) (Tabela I).

Tabela I. Tabela de prevalência demonstrando a frequência de indivíduos que apresentam fibropapilomatose nas quatro populações amostradas. As distâncias foram estimadas linearmente.

<b>Localidade</b>	<b>Presença de Fibropapilomatose (%)</b>	<b>Distância até a baía de Vitória</b>
<b>Ilha do Frade</b>	61%	0km
<b>Anchieta</b>	50%	85km
<b>Ilha da Coroa Vermelha</b>	17%	300km
<b>Atol das Rocas</b>	0%	2000km

O alinhamento dos fragmentos amplificados de ND2 indicou a presença de 3 haplótipos, sendo dois semelhantes ao que foi encontrado previamente para a espécie e depositado no GenBank, e um novo haplótipo ainda não identificado (Atol das Rocas) (Figura 2). O haplótipo compartilhado entre as populações de Atol das Rocas, Anchieta, Coroa Vermelha e Jurema apresenta 0-8 mutações que o diferencia dos haplótipos previamente encontrados para a espécie na região da Flórida (Shamblin et al., 2015). O novo haplótipo encontrado no presente trabalho diferencia-se de 1-3 mutações com relação aos haplótipos depositados no GenBank e que são provenientes das regiões do Suriname, Costa Rica e Florida (Figura 2).

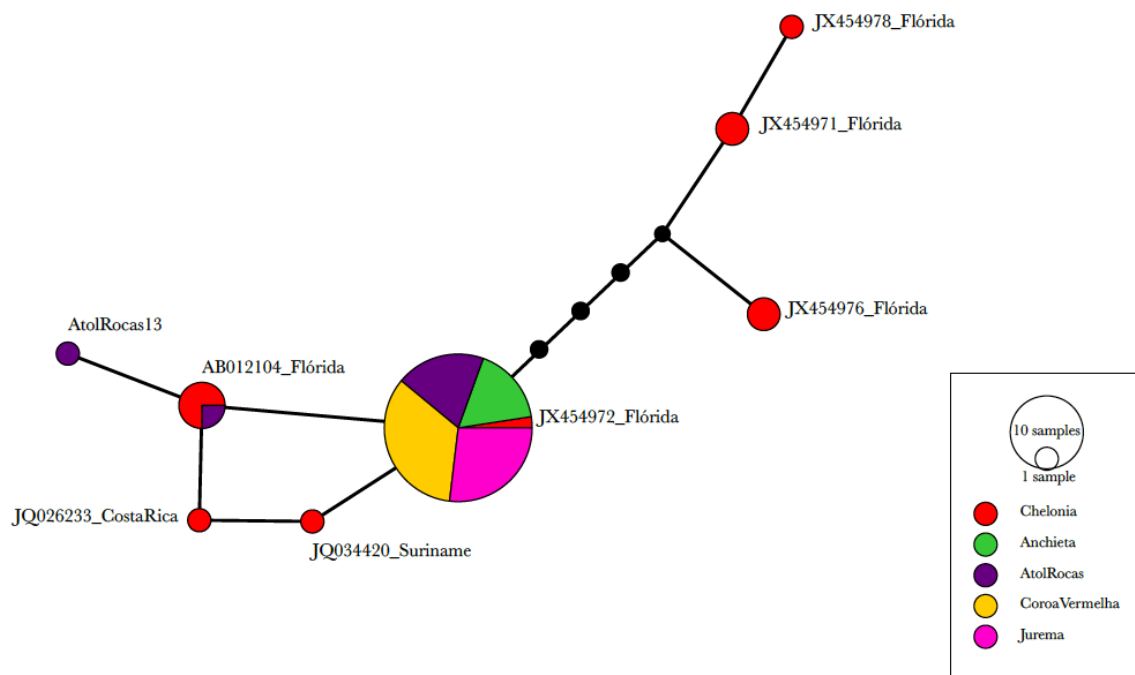


Figura 2. Rede de haplótipos ilustrando a relação entre os haplótipos encontrados neste trabalho e previamente publicados para a espécie *Chelonia mydas* (em vermelho). As barras e os círculos pretos entre cada haplótipo representam o número de mutações existentes entre cada haplótipo.

Um alto nível de polimorfismo foi observado para o gene MHC classe I com pelo menos 40 alelos detectados no total de 160bp amplificados (Tabela II). O número de sítios segregantes identificados foi igual a 45 (Tabela II), sendo os sítios caracterizados por duas variantes (dois nucleotídeos). Não houve mudança no quadro de leitura (deleções ou inserções), ou códons de parada em nenhum dos alelos identificados, sugerindo que são todos funcionais. Além disso, após a tradução das sequências em aminoácidos foram observados alguns sítios conservados (Figura 3). A razão entre substituições não-sinônimas e substituições sinônimas foi menor do que 1, sendo o Z teste significativo ( $Z = -2,15$ ;  $p = 0,03$ ). O teste D de Tajima foi utilizado como um segundo método para inferir a respeito da seleção nos sítios segregantes. Foi obtido o valor de  $D = 0,8493$ , com o total de 45 sítios segregantes (Tabela II).



## 4. DISCUSSÃO

O padrão de variação no gene mitocondrial ND2 encontrado foi semelhante ao identificado para outros genes mitocondriais estudados em *C. mydas* e *C. caretta* (Naro-Maciel et al., 2007; Stiebens et al., 2013), indicando que nesses genes pouca ou nenhuma variação acontece mesmo quando comparadas populações de tartarugas de provenientes de localidades muito distantes. Ao contrário do que ocorre com o gene mitocondrial estudado, a variabilidade do gene MHC foi alta. Essa alta variabilidade do gene MHC encontrada também ocorre na espécie *C. caretta*, e em diversas outras espécies de aves, répteis e mamíferos (Alcaide, Edwards & Negro, 2007; Miller et al., 2010; Stiebens et al., 2013; Vasquez-Carrillo et al., 2014). Diferentes hipóteses têm sido propostas para explicar o alto polimorfismo do gene MHC. Entretanto, dada a importância e função desse gene, a seleção de equilíbrio deve ser a força que potencialmente mantém múltiplos variantes do gene na população (Takahata, Satta & Klein, 1992; Hughes & Yeager, 1998; Stiebens et al., 2013). Nossos resultados suportam a seleção de equilíbrio como um fator que influencia na variabilidade do MHC dado os valores significativos do teste D de Tajima e teste Z.

A diversidade do MHC tem sido relacionada a resistência a patógenos e aptidão (*fitness*) para diferentes grupos animais (Van Oosterhout et al., 2006; Kloch et al., 2013; Sepil et al., 2013). Neste trabalho tentamos associar a ocorrência da doença com a variabilidade do gene MHC classe I. Entretanto, como todos os indivíduos analisados apresentaram pelo menos duas variantes do gene (dois alelos), a associação da doença com a heterozigosidade não pode ser efetuada. Em *C. mydas*, foram encontrados no máximo dois alelos distintos de MHC classe I em cada indivíduo, o que pode contribuir para a redução da susceptibilidade a doenças. O número total de alelos na população encontrados neste trabalho foi particularmente similar ao encontrado para outras espécies ameaçadas como o guepardo e a tartaruga oliva (Castro-Pietro et al., 2011; Stiebens et al., 2013). Porém, o número de alelos identificados aqui pode ser uma estimativa subestimada considerando que o método de sequenciamento utilizado não permitiu a identificação de um número maior de



variantes. Pode ser que em *C. mydas* o gene MHC classe I ocorra de forma duplicada, podendo o indivíduo apresentar cópias do mesmo gene. Isso foi evidenciado previamente para *C. caretta*, em que um indivíduo pode apresentar até 4 alelos distintos de MHC, o que pode ser muito vantajoso já que cópias funcionais do gene representam um efeito adaptativo com relação a parasitas e patógenos (Stiebens et al., 2013). Outro aspecto importante a ser levado em consideração é a possível recombinação entre cópias existentes no genoma gerando o alto polimorfismo do gene MHC classe I encontrado (Hughes & Yeager, 1998; Stiebens et al., 2013). A recombinação entre *loci* pode explicar a ocorrência de sequências variantes que são particularmente divergentes, podendo promover uma vantagem particular contra o ataque de parasitas.

O gene MHC classe I codifica proteínas derivadas do próprio organismo ou de parasitas que são apresentadas para as células do sistema imune (Sommer, 2005). Se a proteína apresentada é derivada de um patógeno, desencadeia-se uma resposta do sistema imune (Hughes & Yeager, 1998). Cada molécula de MHC se liga a uma diversidade de peptídeos, e, portanto, as chances de reconhecimento de um determinado patógeno dependem do repertório individual de moléculas MHC (Altuvia & Margalit, 2004). Isso significa que uma resposta imune bem sucedida depende tanto do número de alelos MHC (vantagem do heterozigoto) quanto da especificidade do alelo. Trabalhos recentes sugerem que as diferentes variantes de MHC num mesmo indivíduo pode reduzir a susceptibilidade a doenças e aumentar a aptidão (Sommer, 2005; Lenz et al., 2013). A presença de fibropapilomatose nos indivíduos que foram amostrados a uma distância de até 100 km da baía de Vitória indica que apesar desses indivíduos apresentarem mais do que uma variante do gene MHC, essa variante não é específica ao ponto de conferir uma resposta adequada do organismo diante do patógeno (vírus). A proximidade dos animais às áreas que recentemente foram degradadas ou poluídas faz com que ocorra o desencadeamento da doença nesses indivíduos. A longo prazo, a tendência é que os indivíduos que apresentem os alelos que conferem a resistência a esse patógeno em específico sejam selecionados. Isso faz todo sentido considerando que a variação do MHC entre as populações é mantida por seleção flutuante, em que a pressão seletiva dos patógenos varia no espaço e tempo (Hedrick et al., 1976).

Apesar de não ser o foco do presente trabalho, podemos dizer que a filopatria em espécies ameaçadas não necessariamente reduz o potencial adaptativo da população como um todo. Considerando que os machos dessa espécie não são filopátricos no mesmo grau em as fêmeas (Stiebens et al., 2013), de alguma forma o fluxo gênico mantém-se entre indivíduos oriundos de colônias de reprodução distintas pois os machos durante as rotas migratórias para os locais de reprodução podem acoplar de forma esporádica com outras fêmeas (FitzSimmons et al., 1997; Wright et al., 2012; Naro-Maciel et al., 2014). Portanto, a filopatria pode não ser prejudicial a diversidade genética, mantendo um alto potencial adaptativo para cada população (Vucetich et al., 2003; Klopstein et al., 2006), facilitando a retenção do polimorfismo genético adaptado localmente (Stiebens et al., 2013).

## 5. CONCLUSÃO

O trabalho promoveu uma nova visão a respeito da variabilidade genética das populações de *C. mydas*, o que pode trazer consequências importantes para o delineamento de estratégias para a conservação da espécie. O impacto decorrente das atividades humanas recentes é notório a ponto de influenciar na carga de patógenos existentes em diferentes locais, e consequentemente na seleção de genes presentes nos *pools* de indivíduos parasitados.

Potencialmente em longo prazo, a combinação de alelos MHC que conferir melhor resposta imune ao vírus da fibropilomatose será selecionada. Não foram identificadas linhagens específicas ou estrutura populacional quando se tratam de alelos MHC classe I. Quanto a variação neutra, confirmase mais uma vez a estrutura populacional, evidenciando que esses organismos são fieis à sua colônia reprodutiva. Além disso, foi identificado um haplótipo do gene ND2 ainda não conhecido para espécie entre os indivíduos de Atol das Rocas.

Apesar de ter utilizado uma amostragem modesta, o presente trabalho demandou intensivo trabalho no laboratório para isolar e caracterizar a variação dos genes MHC classe I e ND2 (mitocondrial). Esperamos que com a utilização de técnicas mais avançadas como o sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing*) possamos melhorar a estimativa de polimorfismo dos alelos MHC nas populações estudadas e assim, contribuir para uma melhor resolução da variabilidade genética em *C. mydas*.

## 6. REFERÊNCIAS

As referências abaixo seguem as normas da Revista Acta Herpetológica.

- Alcaide, M., Edwards, S.V., Negro, J.J. (2007): Characterization, polymorphism, and evolution of MHC class II B genes in birds of prey. *J. Mol. Evol.* **65**: 541-554.
- Altizer, S., Harvell, D., Friedle, E. (2003): Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends Ecol. Evol.* **18**: 589–596.
- Altuvia, Y., Margalit, H. (2004): A structure-based approach for prediction of MHC-binding peptides. *Methods.* **34**: 454-459.
- Araújo de C.C.V., Rosa, D.M., Fernandes, J.M., Ripoli, L.V., Krohling, W. (2008): Composição e estrutura da comunidade de peixes de uma praia arenosa da Ilha do Frade, Vitória, Espírito Santo. *Iheringia, Sér. Zoo.* **98**: 129-135.
- Avise, J.C. (1994): *Molecular markers, Natural history and evolution.* Chapman and Hall, New York.
- Avise, J.C. (2000): *Phylogeography: the History and Formation of Species.* Harvard University Press. Cambridge.
- Bamshad, M., Wooding, S.P. (2003): Signatures of natural selection in the human genome. *Nat. Rev. Genet.* **4**: 99-111.
- Bernatchez, L., Landry, C. (2003): MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *J. Evol. Biol.* **16**: 363-377.
- Boyle, M.C., Limpus, C.J. (2008): The stomach contents of post-hatchling green and loggerhead sea turtles in the southwest Pacific: an insight into habitat association. *Marin. Bio.* **155**: 233-241.
- Castro-Prieto, A., Wachter, B., Sommer, S. (2011): Cheetah paradigm revisited: MHC diversity in the world's largest free-ranging population. *Mol. Biol. Evol.* **28**:1455-1468.
- Clark, B., Kirby, D. (1966): Maintenance of histocompatibility polymorphisms. *Nature* **211**: 999-1000.
- Clemente-carvalho, R.B.G., Klaczko, J., Perez, S.I., Alves, A.C.R., Haddad, C.F.B., Reis dos, S.F. (2011): Molecular phylogenetic and phenotypic diversity in miniaturized toadlets, genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **61**: 79-89.

- Cruz, C.V. (2014): Composição da fauna associada à *Ulva spp* Delile (Ulvaes, Ulvaceae) em três áreas do litoral do estado do Espírito Santo. *REB* **7**: 387-417.
- Doherty, P.C., Zinkernagel, R.M. (1975): Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the h-2 gene complex. *Nature* **256**: 50-52.
- Edwards, S. V., Nusser, J., Gasper, J. (2000): Characterization and evolution of MHC genes from non-model organisms, with examples from birds. In: A. J. Baker, ed. *Molecular methods in ecology*. Blackwell Scientific, Cambridge, pp. 168-207.
- FitzSimmons, N.N., Moritz, C., Limpus, C.J., Pope, L., Prince, R. (1997): Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow. *Genetics*. **147**:1843-1854.
- George, R.H. (1997): Health Problems and Diseases of Sea Turtles. In: Lutz, P.L., Musick, J.A. (Eds). *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton. 432 pp
- Germain, R.N., Rinker, A.G. (1993): Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes surface expression of occupied molecules. *Nature*. **363**:725-728.
- Grohmann, P.A. (2006): Importância dos acompanhamentos de longa duração do estudo da biodiversidade: exemplo da fauna de hidróides (Cnidaria) da Baía do Espírito Santo. *Floresta e Ambiente*. **13**: 97-112.
- Jensen, M., Bell, I., Limpus, C.J., Hamann, M., Ambar, S., Whap, T., David, C., FitzSimmons, N.N. (2016): Spatial and temporal genetic variation among size classes of green turtles (*Chelonia mydas*) provides information on oceanic dispersal and population dynamics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **543**: 241-256.
- Haimovici, M., Klippel, S. (1999): Diagnóstico da biodiversidade dos peixes teleósteos demersais marinhos e estuarinos do Brasil. Programa Nacional de Biodiversidade Biológica – PRONABIO, Subprojeto “Avaliação e Ações Prioritárias para a Zona Costeira e Marinha”, área temática “Peixes demersais”, Rio Grande, RS.
- Hedrick, P.W., Ginevan, M., Ewing, E. (1976): Genetic polymorphism in heterogeneous environments. *Annu Rev Ecol Systemat* **7**: 1-32.
- Hedrick, P.W. (1998): Balancing selection and MHC. *Genetics*. **104**: 207-214.
- Hedrick, P.W. (2002): Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. *Evolution* **56**: 1902-1908.
- Hughes, A.L., Nei, M. (1992): Maintenance of MHC polymorphism. *Nature*. **355**: 402-403.

- Hughes, A.L., Yeager, M. (1998): Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annu. Rev. Genet.* **32**:415-435.
- Keller, L.F., Waller, D.M. (2002): Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol Evol.* **17**:230-241.
- Kloch, A., Baran, K., Buczek, M., Konarzewski, M., Radwan, J. (2013): MHC influences infection with parasites and winter survival in the root vole *Microtus oeconomus*. *Evol. Ecol.* **27**: 635-653.
- Klopfstein, S., Currat, M., Excoffier, L. (2006): The fate of mutations surfing on the wave of a range expansion. *Mol. Biol. Evol.* **23**: 482– 490.
- Lenz, T.L., Mueller, B., Trillmich, F., Wolf, J.B. (2013): Divergent allele advantage at MHC-DRB through direct and maternal genotypic effects and its consequences for allele pool composition and mating. *Proc. Biol. Sci.* **280**: 20130714.
- Limborg, M.T., Helyar, S.J., Bruyn, de M., Taylor, M.I., Nielsen, E.E., Ogden, R., Carvalho, G.R., Bekkevold, D. (2012): Environmental selection on transcriptome-derived SNPs in a high gene flow marine fish, the Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Mol. Ecol.* **21**: 3686-3703.
- Limpus, C.J. (2008): A biological review of Australian marine turtle species. 2. Green turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus). Environmental Protection Agency, The State of Queensland, Brisbane.
- Lopes, L.G.N. (2016): Meio Ambiente. Análise Situacional das Áreas Protegidas – Região V: Praia do Canto. Câmara de Vitória, pp.58.
- Lutcavage, M.E., Plotkin, P.T., Witherington, B.E., Lutz, P.L.L. (1997): Human impacts on sea turtle survival. In: Lutz PL, Musick JA (eds) *The biology of sea turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp. 107-136.
- Magalhães, V., Abrantes, J., Muñoz-Pajares, A.J., Esteves, P.J. (2015): Genetic diversity comparison of the DQA gene in European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) populations. *Immunogenetics.* **67**:579-590.
- Milinski, M. (2015): The major histocompatibility complex, sexual selection, and mate choice. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **37**:159–186.
- Miller, H.C., Allendorf, F., Daugherty, C.H. (2010): Genetic diversity and differentiation at MHC genes in island populations of tuatara (*Sphenodon* spp.). *Mol. Ecol.* **19**:3894-3908.
- Moraes, F.C., Vilanova, E.P., Muricy, G. (2003): Distribuição das esponjas (Porífera) na Reserva Biológica do Atol das Rocas, Nordeste, Brasil. *Arq. Mus. Nac.* **61**: 13-22.

- Naro-Maciel, E., Becker, J.H., Lima, E.H.S.M., Marcovaldi, M.A., DeSalle, R. (2007): Testing dispersal hypotheses in foraging green turtle (*Chelonia mydas*) of Brazil. *J. Hered.*, **98**: 29-39.
- Naro-Maciel, E., Reid, B.N., Alter, A.E., Amato, G., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Martin, M., Nairn, C.J., Shamblyn, B., Pineda-Catalan, O. (2014): From refugia to rookeries: Phylogeography of Atlantic green turtles. *J. Experiment. Mar. Biol. Ecol.* **461**: 306-316.
- Nei, M., Gojobori, T. (1986): Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* **3**: 418-426.
- Nei, M. (1987): *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Netto, R.F., Barbosa, L.A. (2003): Cetaceans and fishery interactions along the Espírito Santo State, Southeastern Brazil during 1994-2001. *LAJAM* **2**: 57-60.
- Netto, R.F., Benedetto, Di A.P.M. (2008). Interactions between fisheries and cetaceans in Espírito Santo State coast, southeastern Brazil. *Rev. Bras. Zool.* **10**: 55-63.
- Palumbi, S.R., Martin, A.P., Romano, S.L., McMillan, W.O., Stice, L., Grabowski, G. (1991): *The Simple Fool's Guide to PCR*. Dept. of Zoology, University of Hawaii, Honolulu
- Ripoli, L.V., Fernandes, J.M., Rosa, D.M., Araujo, C.C.V. 2007. Dinâmica populacional de *Portunus spinimanus* Latreille, 1819 (Crustacea, Portunidae) em um trecho litorâneo da Ilha do Frade, Vitória-ES. *B. Inst. Pesca.* **33**: 205-212.
- Rivero-de-Aguilar, J., Westerdahl, H., Martínez-de-la-Puente, J., Tomás, G., Martínez, J., Merino, S. (2016): MHC-I provides both quantitative resistance and susceptibility to blood parasites in blue tits in the wild. *J. Avian Biol.* **47**: 669-677.
- Santos, R.G., Martins, A.S., Torezani, E., Baptistotte, C., Farias, J.N., Horta, P.A., Work, T.M., Balazs, G.H. (2010): Relationship between fibropapillomatosis and environmental quality: a case study with *Chelonia mydas* off Brazil. *Dis. Aqua Org.* **89**: 87-95.
- Sepil, I., Lachish, S., Sheldon, B.C. (2013): MHC-linked survival and lifetime reproductive success in a wild population of great tits. *Mol. Ecol.* **22**: 384-396.
- Shamblyn, B.M., Bagley, D.A., Ehrhart, L.M., Desjardin, N.A., Martin, R.K., Hart, K.M., Naro-Maciel, E., Rusenko, K., Stiner, J.C., Sobel, D., Johnson, C., Wilmers, T.J., Wright, L.J., Nairn, C.J. (2015): Genetic structure of Florida

- green turtle rookeries as indicated by mitochondrial DNA control region sequences. *Conserv. Genet.* **16**: 673-685.
- Shields, W.M. (1982): *Philopatry, Inbreeding, and the Evolution of Sex*. State University of New York Press, Albany.
- Sommer, S. (2005): Major histocompatibility complex and mate choice in a monogamous rodent. *Behav Ecol Sociobiol.* **58**:181-189.
- Stiebens, V.A., Merino, S.E., Roder, C., Chain, F.J.J., Lee, P.L.M., Eizaguirre, C. (2013): Living on the edge: how philopatry maintains adaptive potential. *Proc R Soc B.* **280**:20130305.
- Takahata, N., Satta, Y., Klein, J. (1992): Polymorphism and balancing selection at major histocompatibility complex loci. *Genetics.* **130**: 925-938.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725-2729.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994): ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Van Oosterhout, C., Joyce, D.A., Cummings, S.M., Blais, J., Barson, N.J., Ramnarine, I.W., Mohammed, R.S., Persad, N., Cable, J. (2006): Balancing selection, random genetic drift, and genetic variation at the major histocompatibility complex in two wild populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution.* **60**: 2562-2574.
- Vásquez-Carrillo, C., Friesen, V., Hall, L., Peery, M.Z. (2014): Variation in MHC class II B genes in marbled murrelets: implications for delineating conservation units. *Anim. Conserv.* **17**: 244-255.
- Vucetich, J.A., Waite, T.A. (2003): Spatial patterns of demography and genetic processes across the species' range: null hypotheses for landscape conservation genetics. *Conserv. Genet.* **4**: 639– 645.
- Work, T.M., Rameyer, R.A., Balazs, G.H., Cray, C., Chang, S.P. (2001): Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii. *J. Wildl. Dis.* **37**: 574-581.
- Work, T., Balazs, G., Wolcott, M., Morris, R. (2003). Bacteraemia in free-ranging Hawaiian green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis. *Dis. Aquat. Org.* **53**:41-46.
- Work, T.M., Balazs, G.H., Schumacher, J.L., Amarisa, M. (2005): Epizootiology of spirorchiid infection in green turtles (*Chelonia mydas*) in Hawaii. *J. Parasit.* **91**: 871-877.



Wright, L.I., Stokes, K.L., Fuller, W.J., Godley, B.J., McGowan, A., Snape, R., Tregenza, T., Broderick, A.C. (2012): Turtle mating patterns buffer against disruptive effects of climate change. *Proc. R. Soc. B.* **279**: 2122 – 2127.