



CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

ADÉLIO LUBIANA NETO

**TEMPERATURA PIVOTAL E DIMORFISMO SEXUAL EM FILHOTES DE
PODOCNEMIS EXPANSA (SCHWEIGGER, 1812) (Testudines, Podocnemididae)
DE DUAS POPULAÇÕES DOS ESTADOS DE GOIÁS E TOCANTINS**

**VILA VELHA
2009**

ADÉLIO LUBIANA NETO

**TEMPERATURA PIVOTAL E DIMORFISMO SEXUAL EM FILHOTES DE
PODOCNEMIS EXPANSA (SCHWEIGGER, 1812) (Testudines,
Podocnemididae) DE DUAS POPULAÇÕES DOS ESTADOS DE GOIÁS E
TOCANTINS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Ecologia de Ecossistemas
do Centro Universitário Vila Velha como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Ecologia de Ecossistemas.

Orientador: Dr. Paulo Dias Ferreira Júnior

**VILA VELHA
2009**

ADÉLIO LUBIANA NETO

**TEMPERATURA PIVOTAL E DIMORFISMO SEXUAL EM FILHOTES DE
PODOCNEMIS EXPANSA (SCHWEIGGER, 1812) (Testudines:
Podocnemididae) DE DUAS POPULAÇÕES DOS ESTADOS DE GOIÁS E
TOCANTINS**

BANCA EXAMINADORA

Dr. Paulo Dias Ferreira Júnior
Orientador

Dr. Alex Bager
1º Membro da banca

Dra. Flaviana Lima Guião Leite
2º Membro da banca

**VILA VELHA
26 de novembro de 2009**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

L929t Lubiana, Adélio.

Temperatura pivotal e dimorfismo sexual em filhotes de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) de duas populações dos estados de Goiás e Tocantins / Adélio Lubiana. – 2009.

54 f.: il.

Orientador: Paulo Dias Ferreira Júnior.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Centro Universitário Vila Velha, 2009.

Inclui bibliografias.

1. Tartaruga – Reprodução. 2. Tartarugas – Ovos – Incubação. 3. Ecossistema. 4. Ecologia. I. Ferreira Júnior, Paulo Dias. II. Centro Universitário Vila Velha. III. Título.

CDD 597.92

Dedico este trabalho a meus pais por todo carinho, respeito, ajuda e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao orientador Paulo Dias Ferreira Junior por mais uma vez ter me aturado, incentivado e dado a oportunidade de realizar um trabalho em conjunto.

Agradecer a todos meus amigos que estiveram ao meu lado, me apoiando e me ajudando nos momentos de dificuldade, principalmente a galera que esteve efetivamente me dando uma força para que este trabalho fosse concluído com sucesso. À Aline Gomes que me salvou em inúmeras ocasiões e me deu a maior força desde o início do mestrado para que esta dissertação fosse possível bem como às “meninas” Jordana e Bruna que me auxiliaram e deram um incremento na reta final no laboratório.

Ao Centro Universitário Vila Velha pela bolsa de estudo e pela infra-estrutura disponibilizada para que este trabalho fosse realizado.

Ao pessoal dos laboratórios de ecologia, sempre presente para dar uma mãozinha, um palpite, ou para fazer uma brincadeira, contar uma piada: Meu amigão “Brunão” também conhecido como “José”, Ingrid Dias, Eurico Neto, Frederico Eutrópio.

Não posso esquecer de toda a galera da minha sala, sempre prontos para fazer uma farra, e sempre juntos nos momentos de “desespero”.

Agradecimento especial ao “Robertão”, um amigo no laboratório de histopatologia que foi de extrema importância para a conclusão deste trabalho, deixando até mesmo de lado a sua rotina para acelerar o corte e a preparação das lâminas histológicas.

À Belisa que me incentivou a acordar diversas madrugadas e me deu a maior força para a realização desta monografia.

Ao IBAMA e ao projeto RAN por autorizarem a realização deste trabalho.

RESUMO

A determinação da temperatura pivotal para *Podocnemis expansa* é de grande importância para os estudos de manejo da espécie, visto que esta temperatura varia entre as diferentes populações. Um problema comum aos estudos que abordam a razão sexual de filhotes recém-eclodidos de tartarugas é a ausência de dimorfismo sexual, o que gera a necessidade da utilização de métodos invasivos para a identificação do sexo dos indivíduos. No presente trabalho, 300 ovos de *P. expansa* oriundos do Rio Araguaia, estado de Goiás, e 300 ovos oriundos do Rio Javaés, estado do Tocantins foram incubados em laboratório a temperaturas constantes. Após a eclosão, fotografias da carapaça de cada indivíduo foram tomadas para análises da morfometria geométrica. Posteriormente, os filhotes foram eutanasiados para confirmação do sexo, permitindo calcular a temperatura pivotal em 33 °C para a população do Rio Araguaia e 33,5 °C para a população do Rio Javaés. Esta variação ocorre provavelmente como um reflexo das diferentes latitudes em que as duas populações se encontram. A partir da aplicação dos princípios da morfometria geométrica foi possível discriminar o sexo dos filhotes sexados em laboratório com base na forma da carapaça e individualizar os filhotes oriundos de ninhos naturais a partir da função discriminante gerada pelos filhotes sexados. Por outro lado, não foi possível separar as populações do Rio Araguaia e do Rio Javaés com base na forma da carapaça dos filhotes.

Palavras-chave: Tartaruga, morfometria, Araguaia, Javaés, conservação.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVO GERAL	17
	2.1 Objetivos específicos	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
	3.1 Coleta de ovos	18
	3.2 Período de incubação e eclosão	20
	3.3 Registro fotográfico de filhotes oriundos de ninhos naturais	23
	3.4 Análise da morfometria geométrica da carapaça	23
	3.5 Análise histológica	25
	3.6 Análise estatística	27
4	RESULTADOS	28
	4.1 Temperatura pivotal	28
	4.2 Morfometria geométrica	31
5	DISCUSSÃO	38
	5.1 Morfometria geométrica	42
6	CONCLUSÕES	45
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

A tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812; Testudines: Podocnemididae) é a maior espécie do gênero *Podocnemis*. Nativa das bacias dos rios Amazonas, Tocantins-Araguaia, Orinoco e Essequibo, a espécie se dispersa por uma grande área ao norte do continente sul-americano, principalmente nas regiões amazônicas (IVERSON, 1986). Esta espécie, altamente migratória e com comportamento de nidificação em grupo, constitui um importante recurso econômico e cultural para os habitantes locais, sendo usada como alimento desde os tempos pré-colombianos (VALENZUELA, 2001a; PEARSE *et al.*, 2006).

A pressão imposta nas populações de *P. expansa* em decorrência da exploração inadequada resultou na inclusão da espécie na Lista de Espécies Ameaçadas da IUCN-2009 (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*) sendo apresentada na condição de baixo risco/dependente de conservação. A espécie também se encontra no apêndice II do CITES (*Convention on International Trade Endangered Species*) que lista as espécies que não se encontram ameaçadas de extinção, mas que podem vir a se tornar, sendo, desta maneira, seu comércio altamente controlado. Isto mostra a importância de estudos ecológicos para melhorias nas práticas de manejo e conservação de *P. expansa*.

Diferentemente da determinação sexual genotípica, onde o sexo é definido no momento da concepção por genes contidos nos cromossomos, em *P. expansa* a determinação sexual é influenciada por fatores ambientais após a fertilização (BULL & VOGT, 1979; BULL, 1980; BULL, 1983; VOGT & FLORES-VILLELA, 1986). Segundo Alho *et al.* (1984 e 1985), *P. expansa* possui determinação sexual dependente da temperatura de incubação dos ovos, mecanismo reportado pela primeira vez por Charnier (1966) em *Agama agama*, um lagarto típico da África.

O sexo dos embriões na determinação sexual dependente da temperatura de incubação é definido pela temperatura a que os ovos são submetidos durante uma janela de tempo, chamada de período termo-sensitivo, que se situa no segundo terço do período de incubação (YNTEMA, 1979; BULL & VOGT, 1981; BULL, 1983; MROSOVSKY & PIEAU, 1991). Tartarugas podem

apresentar dois modelos distintos de DST (determinação sexual dependente da temperatura de incubação dos ovos): DSTIa, na qual fêmeas são geradas em altas temperaturas e machos em baixas temperaturas, e DSTII em que as fêmeas são geradas em temperaturas altas e baixas e os machos em temperaturas intermediárias (BULL & VOGT, 1979; EWERT & NELSON, 1991; EWERT *et al.*, 1994).

Para a maioria das tartarugas, incluindo *P. expansa*, machos são gerados em temperaturas de incubação mais baixas e fêmeas em temperaturas mais altas, sendo assim espécies típicas do modelo DSTIa (ALHO *et al.*, 1985; VALENZUELA *et al.*, 1997). Em altas temperaturas ocorre, no embrião, a produção da enzima aromatase, um hormônio feminilizante responsável pela geração de fêmeas. Temperaturas baixas não levam à síntese desse hormônio, resultando em machos (PIEAU, 1996).

Divergindo das citações acima, Valenzuela (2001c) encontrou em seu trabalho de campo, com temperaturas fluando durante a incubação, uma maior porcentagem de fêmeas em dois ninhos (dentre 20 ninhos monitorados) com as menores temperaturas registradas, e Lubiana & Ferreira Júnior (2009) em experimento de incubação controlada e constante em laboratório observaram a eclosão de uma fêmea (e dois machos) na incubadora de temperatura mais baixa, próxima a 28 °C. Estas observações sugerem que *P. expansa* pode ser uma espécie com DSTII, mas a expressão deste mecanismo pode ser inibida pelos altos índices de mortalidade em temperaturas baixas (VALENZUELA, 2001c).

Dois parâmetros de grande importância nos estudos ecológicos para manejo e conservação de espécies são a razão sexual e o sucesso de eclosão de cada ninho. A razão sexual é a proporção entre fêmeas e machos eclodidos. Já o sucesso de eclosão é a relação entre o número de filhotes que consegue completar a incubação e o número total de ovos no ninho.

A determinação sexual dependente da temperatura de incubação difere da determinação sexual genotípica, pois uma variedade de fatores interage para definir o sexo dos filhotes. Bull *et al.* (1982) citaram, como alguns destes fatores, o comportamento materno na escolha do local de desova, a resposta do zigoto à temperatura e outros aspectos ambientais do local de nidificação. Sendo assim, na determinação sexual dependente da temperatura de

incubação, a razão sexual dos filhotes não deverá ser necessariamente de 1:1 como na determinação genotípica (VALENZUELA *et al.*, 2003).

A razão sexual e o sucesso de eclosão estão diretamente relacionados à temperatura a que os ovos são submetidos no ninho. A data da desova, o substrato onde se encontra o ninho, a profundidade e a posição dos ovos dentro do ninho são aspectos que afetam o sucesso reprodutivo dos quelônios (VALENZUELA *et al.*, 1997; VALENZUELA, 1999). Dentre os fatores que influenciam a temperatura do ninho, Vogt & Flores-Villela (1986) para o gênero *Graptemys* e Bull & Vogt (1979) para *Graptemys*, *Chrysemys* e *Trionyx*, mostraram que, ninhos de tartarugas que produziram fêmeas se localizavam em áreas arenosas abertas, com escassez de cobertura herbácea e, conseqüentemente, apresentando temperaturas elevadas, e os ninhos com predominância de machos estavam associados à moitas de vegetação baixa e densa. Valenzuela (2001b) descreve que as fêmeas de *P. expansa* escavam seus ninhos até que sua cabeça esteja no mesmo nível da superfície da praia durante a ovoposição. Deste modo, fêmeas maiores cavam ninhos mais profundos que fêmeas menores, influenciando na razão sexual dos filhotes. Porém, como apontam Ferreira Júnior & Castro (2003), o tamanho do sedimento será determinante na profundidade da câmara de ovos e ninhos localizados em areia fina tendem a ser mais rasos que os ninhos situados em praias de areia mais grossa. Bull (1985) mostrou que em outro gênero de tartaruga (*Graptemys*), a quantidade de horas por dia acima de uma determinada temperatura tem uma forte associação com a razão sexual dos filhotes.

Alho *et al.* (1985) monitoraram a temperatura de seis ninhos de *P. expansa* durante todo o período de incubação, sendo que três destes ninhos ficaram encobertos, e os outros três ficaram expostos à radiação solar. A variação da temperatura entre esses grupos de ninhos foi de aproximadamente 1 °C durante todo período de incubação e foi capaz de influenciar a razão sexual desta espécie. Como resultado das temperaturas mais amenas nos ninhos encobertos, foi encontrado uma maior proporção de machos. Nos ninhos incubados a céu aberto, a quantidade de fêmeas foi maior, chegando à proporção de um macho para 30 fêmeas.

Estudos relacionados à determinação sexual dependente da temperatura de incubação levaram a outras importantes descobertas. Bull (1980) apontou a existência de uma temperatura limiar dentro deste tipo de mecanismo capaz de produzir em uma mesma ninhada 50% de machos e 50% de fêmeas. Esta temperatura foi denominada de temperatura pivotal. Próximo a temperatura pivotal existe uma faixa de transição onde são gerados machos e fêmeas em diferentes proporções (PIEAU, 1996). Essa faixa de transição varia de 1 °C para *P. expansa* (ALHO *et al.*, 1985) e *Natator depressus* (HEWAVISENTHI & PARMENTER, 2000) até 4 °C para *Chelonia mydas* (MROSOVSKY *et al.*, 1984).

Valenzuela *et al.* (1997) apontaram uma temperatura pivotal para *P. expansa* oriundos da Colômbia, incubados em laboratório a temperaturas constantes, maior que 32,5 °C, porém menor que os 34,5 °C apresentada por Alho *et al.* (1985) em estudo de campo no rio Trombetas (PA). Em outro trabalho, Valenzuela (2001c) incubou ovos de *P. expansa*, também da Colômbia, em laboratório, sob temperaturas constantes, registrando uma temperatura pivotal de 32,6 °C. Lubiana & Ferreira Júnior (2009) trabalhando com temperaturas constantes encontraram uma temperatura pivotal de 33,5 °C para uma população do Rio Javaés (TO), na Ilha do Bananal.

As temperaturas pivotais de *P. expansa* estão entre as maiores já registradas para as espécies de tartarugas estudadas até o momento. Páez *et al.* (2009) apontam uma temperatura pivotal de 33,4° C ($\pm 0,4$), tanto em trabalho de campo como no laboratório, para *Podocnemis lewyana*, espécie de tartaruga endêmica da Colômbia. A determinação da temperatura pivotal é importante, pois ela varia entre espécies e entre populações da mesma espécie em diferentes regiões geográficas (EWERT *et al.*, 1994; EWERT & NELSON, 1991). A ampla distribuição geográfica de espécies que apresentam determinação sexual dependente da temperatura de incubação, como *P. expansa*, leva ao desenvolvimento de diversas temperaturas pivotais para compensar os efeitos das variações do clima (EWERT *et al.*, 1994; EWERT & NELSON, 1991). Para manter uma população condizente com as características ambientais da área de ocorrência, a temperatura pivotal é alterada, haja vista que, em sentido diverso, nos limites da distribuição da espécie poderiam ser gerados filhotes com apenas um sexo, o que

inviabilizaria a ocupação da região (BULL *et al.*, 1982). O conhecimento da temperatura pivotal para cada população pode auxiliar na escolha de uma técnica de manejo condizente com as necessidades de cada uma delas, como, por exemplo, manipulando as temperaturas de incubação e conseqüentemente a razão sexual de acordo com o desejado (VOGT, 1994).

Para tartarugas marinhas, por outro lado, a temperatura pivotal é praticamente a mesma em todo o mundo, sendo estável em torno dos 29 °C (DAVENPORT, 1997; MROSOVSKY, 1988, 1994; MARCOVALDI *et al.*, 1997), com exceção de *Lepidochelys olivacea* que apresenta 31 °C (WIBBELS *et al.*, 1998). Neste caso, o grande fluxo gênico entre as populações e a limitação da área de desova nas regiões tropicais possibilitam uma mesma temperatura pivotal na sua ampla área de distribuição (BINCKLEY *et al.*, 1998; WIBBELS *et al.* 1998).

Devido à interação de fatores ambientais e biológicos, torna-se difícil determinar qual seria uma razão sexual de equilíbrio para uma população com a determinação sexual dependente da temperatura de incubação (VALENZUELA & LANCE, 2004). Desta forma, experimentos laboratoriais e trabalhos de campo se tornam necessários para se estabelecer a razão sexual de diferentes populações, principalmente em projetos de manejo e conservação (LUBIANA & FERREIRA JÚNIOR, 2009).

Outro método apontado para a determinação da razão sexual de filhotes recém-eclodidos de tartarugas-marinhas é a duração de incubação dos ovos, considerando-se o período de tempo, em dias, entre a desova e a emersão dos filhotes dos ninhos. A duração da incubação se correlaciona negativamente com a temperatura de incubação dos ovos. Para temperaturas mais altas, o metabolismo é mais rápido, o que leva a um menor período de incubação e maior número fêmeas, ocorrendo o inverso para os machos (MARCOVALDI *et al.*, 1997 & MROSOVSKY *et al.*, 1999). Exemplificando essa premissa, Valenzuela *et al.* (1997) encontraram uma duração média do período de incubação para uma população de *P. expansa* da Colômbia maior que a descrita por Alho *et al.* (1985) para uma população do Brasil, sendo esta diferença provavelmente relacionada a diferença climática entre as duas regiões.

A duração pivotal da incubação, obtida pelo número de dias em que é gerada uma razão sexual de 1:1, para *Caretta caretta* foi de 55,2 dias em laboratório e 59,3 dias em campo, segundo Marcovaldi *et al.* (1997), e de 59,9 em laboratório de acordo com Mrosovsky *et al.* (1999). Esta diferença de cerca de quatro dias entre a incubação no laboratório e em campo pode estar relacionada ao tempo que os filhotes levam para sair dos ninhos. No laboratório a eclosão é considerada quando o filhote rompe a casca do ovo, já no campo considera-se o momento em que estes emergem dos ninhos. Este método é utilizado para as populações mundiais de tartarugas marinhas, já que elas possuem a temperatura pivotal conservativa (MROSOVSKY, 1988; WIBBELS *et al.*, 1998; FERREIRA JÚNIOR *et al.*, 2003b). Contudo, esta metodologia vem sendo contestada, tendo em vista que, variações climáticas durante o período termo-sensitivo podem gerar um sexo não esperado para o período de incubação dos embriões. Por exemplo, em um ninho com o período de incubação de 70 dias deve ocorrer a prevalência de machos. No entanto, se durante o segundo terço da incubação ocorrer um aumento repentino na temperatura, as condições serão favoráveis ao desenvolvimento de fêmeas. Se após esse período a temperatura voltar a cair, o desenvolvimento embrionário será prolongado levando a uma duração pivotal de incubação condizente com uma razão sexual favorável aos machos.

A comprovação da eficácia da determinação sexual relacionada à duração de incubação para outras espécies de quelônios, principalmente nas de água doce, torna-se importante por ser um método de baixo custo, não invasivo e de fácil aplicação. Estes pressupostos são importantes principalmente devido à escassez de recursos, pois, esse método, apesar de ser relativamente impreciso, pode se tornar uma ferramenta eficaz em projetos de manejo e conservação como um indicativo da razão sexual das populações (LUBIANA & FERREIRA JÚNIOR, 2009).

Apesar de muitas espécies de tartarugas apresentarem grande dimorfismo sexual quando adultas, filhotes normalmente exibem um pequeno ou nenhum dimorfismo que possibilite a identificação do sexo por observação a olho nu (ERNST & BARBOUR, 1989). Este problema também é notado para filhotes e juvenis de *P. expansa* gerando a necessidade da utilização de métodos invasivos para a sexagem dos indivíduos recém-eclodidos,

normalmente tornando necessária a eutanásia dos animais. Dentre estes métodos podemos citar a análise histológica e anatômica das gônadas (ALHO *et al.*, 1985; EWERT & NELSON, 1991; MALVASIO *et al.*, 2002; LUBIANA & FERREIRA JÚNIOR, 2009), testes de radioimunoensaio (RIA) para quantificar as concentrações de esteróides no plasma sanguíneo (LANCE *et al.*, 1992; VALENZUELA *et al.*, 1997; VALENZUELA, 2001b; VALENZUELA *et al.*, 2004) e laparoscopia em juvenis (WYNEKEN *et al.*, 2007).

Todos os métodos citados anteriormente pecam por associarem altos custos, necessidade de mão-de-obra e treinamentos específicos e extensivos, ou requerem a eutanásia dos filhotes (VALENZUELA *et al.*, 2004). Na busca por métodos não-invasivos e alternativos, alguns estudiosos como Michel-Morfin *et al.* (2001) para *Lepidochelys olivacea*, Boone & Holt (2001) para *Gopherus agassizii*, e Hildebrand *et al.* (1997) para *P. expansa*, apostaram na utilização da análise da morfometria convencional, baseada na tomada de distâncias lineares para encontrar relações entre o sexo e o comprimento e a largura da carapaça, do plastrão e dos escudos do casco dos filhotes destas espécies. Neste trabalho os autores não obtiveram sucesso.

Como a morfometria convencional não se mostrou eficaz em alguns dos casos estudados, Valenzuela *et al.* (2004) e Myers *et al.* (2006) tentaram quantificar as variações morfológicas utilizando a metodologia da morfometria geométrica, que se baseia nas características morfológicas externas, avaliando a forma do casco como um todo, através de pontos com correspondência biológica.

Através da morfometria geométrica Valenzuela *et al.* (2004) conseguiram classificar o sexo de filhotes de *P. expansa* de uma população na Colômbia com 90% de acerto, e de *Chrysemys picta* (EUA) com 98%, utilizando imagens da carapaça. Com esta mesma metodologia, Lubiana & Ferreira Júnior (2009) classificaram com 100% de acerto o sexo de filhotes recém-eclodidos de *P. expansa* de uma população do Rio Javaés no estado do Tocantins, oriundos de ovos incubados a temperaturas constantes em laboratório. Neste último trabalho, apenas 10,8% da variação da forma da carapaça dos filhotes foi explicada pelo sexo. Em ambos os casos, análises histológicas das gônadas foram utilizadas para a comprovação do sexo dos filhotes.

Lubiana & Ferreira Júnior (2009) compararam seus resultados com os obtidos por Valenzuela *et al.* (2004) e apontaram diferenças não somente entre o sexo dos filhotes em cada população, mas também entre as duas populações. Isto pode ser explicado pela grande distribuição geográfica da espécie, bem como pelo isolamento geográfico e conseqüentes diferenças genéticas entre as duas populações (BOCK *et al.*, 2001; SITES JÚNIOR *et al.*, 1999).

Em outro estudo com a aplicação da morfometria geométrica, Myers *et al.* (2006) utilizaram imagens do plastrão de filhotes de *Trachemys scripta* dos Estados Unidos, e separaram duas populações desta espécie encontradas a menos de 5 km de distância uma da outra. Portanto, para *P. expansa*, espécie que pode migrar grandes distâncias (SITES JÚNIOR *et al.*, 1999), a ferramenta da morfometria geométrica avaliando as variações na forma da carapaça (VALENZUELA *et al.*, 2004; LUBIANA & FERREIRA JÚNIOR, 2009) pode fornecer elementos que possibilitem a individualização de populações por um método de sexagem não-invasivo que pode ser de grande utilidade nos estudos ecológicos.

2. OBJETIVO GERAL

Determinar a temperatura pivotal em *Podocnemis expansa* do Rio Araguaia, no estado de Goiás, e comparar esta população com outra do Rio Javaés, estado do Tocantins, através da morfometria geométrica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a existência de dimorfismo sexual em filhotes recém-eclodidos de *P. expansa* através da aplicação dos princípios da morfometria geométrica.
- Comparar a forma da carapaça das populações de *Podocnemis expansa* dos rios Araguaia e Javaés com base na morfometria geométrica.
- Estimar a razão sexual de filhotes oriundos de ninhos naturais a partir da forma da carapaça dos filhotes gerados em laboratório.

3. MATERIAIS E METODOS

3.1 Coleta dos ovos

No Rio Araguaia 300 ovos foram coletados na Fazenda Montaria (13°12' S e 50°35' W), próximos ao povoado de Luiz Alves, no município de São Miguel do Araguaia, estado de Goiás em outubro de 2007 (Figura 1), temporada de desova das tartarugas-da-amazônia (*Podocnemis expansa*). Dez ninhos foram selecionados para a coleta dos ovos. A coleta foi feita no início da manhã, no período mais fresco do dia, para evitar a desidratação dos ovos. Os filhotes do Rio Javaés foram obtidos de 300 ovos coletados na temporada reprodutiva de 2006 na Praia do Canguçu (9°59' S e 50°05' W), Ilha do Bananal, estado do Tocantins (LUBIANA & FERREIRA JÚNIOR, 2009).

Os ninhos escolhidos foram aqueles desovados no mesmo dia da coleta, o que foi confirmado pelos rastros recentes das fêmeas e pelo substrato úmido proveniente de fluidos liberados durante a desova ou pela visualização das fêmeas no ato da desova (Figura 2).

Para identificação, os ovos foram numerados a lápis e transportados em duas caixas plásticas contendo vermiculita expandida (argilomineral com grande capacidade de absorção e retenção de líquidos) umedecida com água, para evitar a desidratação, e choques durante o transporte. Os ovos foram transportados de carro da Fazenda Montaria às margens do Rio Araguaia, onde se encontra instalada uma base do Projeto Quelônios da Amazônia do RAN-IBAMA, até Brasília. De Brasília até Vitória o transporte foi aéreo. Os ovos foram mantidos por cerca de 24h nas caixas plásticas, no período que se estendeu da coleta ao início da incubação no Laboratório de Ecologia Aquática e Terrestre do Complexo Biopráticas do Centro Universitário Vila Velha.

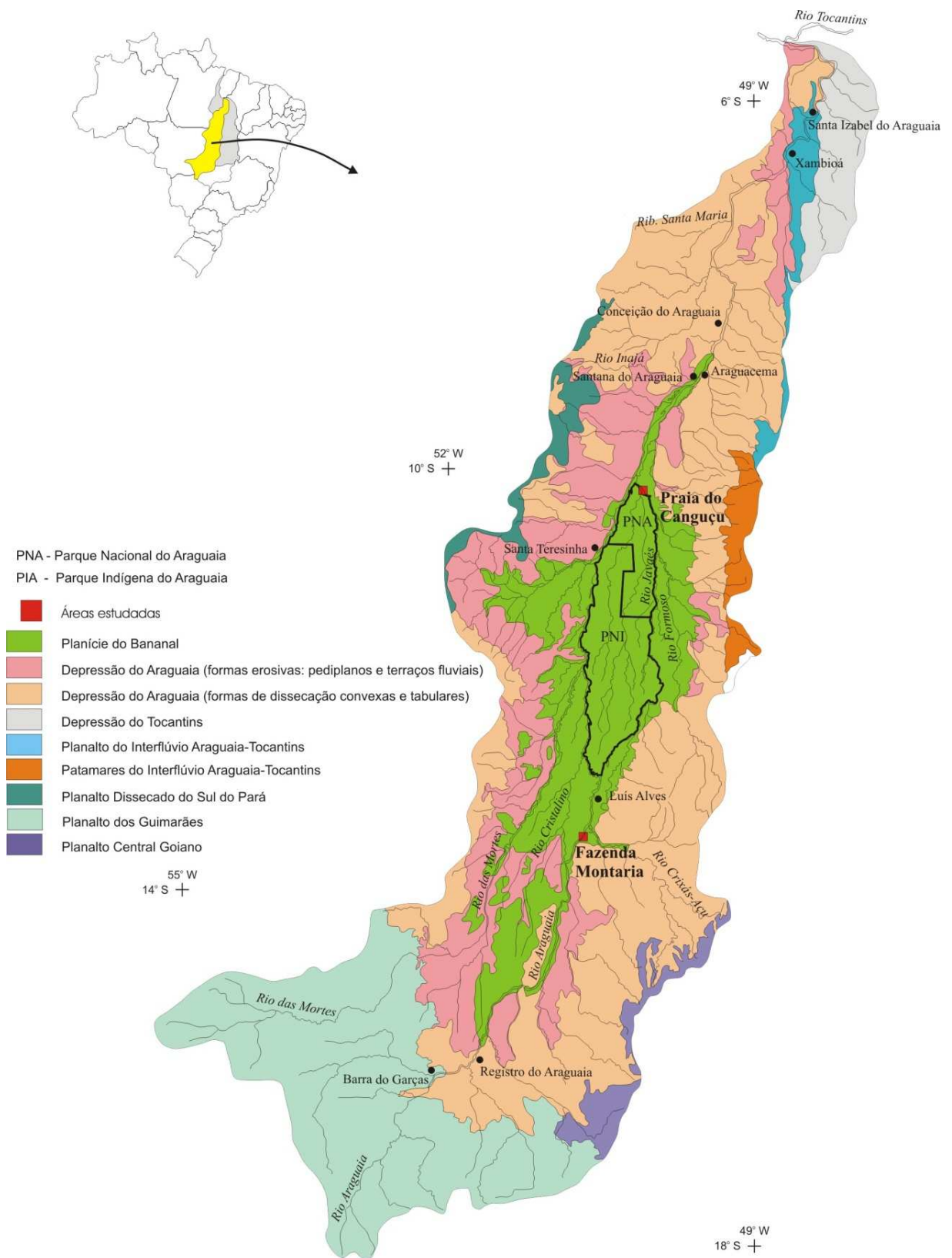


Figura 1 – Localização geográfica das áreas de coleta. Fazenda Montaria, no Rio Araguaia (GO) e Praia do Canguçu, no Rio Javaés (TO).



Figura 2 – **a)** Fêmea de *P. expansa* no momento da desova. **b)** Ninho com ovos de *P. expansa*. **c)** Exemplar adulto de *P. expansa* retornando para o rio após a desova. **d)** Filhote de *P. expansa*.

3.2 Período de incubação e eclosão

Foram utilizadas dez incubadoras construídas em caixas de isopor. Na tampa de cada incubadora foram fixadas com silicone gel duas lâmpadas incandescentes de 60 W. As incubadoras foram reguladas entre as temperaturas de 28 °C a 37 °C, mantendo uma diferença de 1 °C entre elas. O controle da temperatura foi realizado por um termostato analógico eletrônico, da marca Chocmaster com 0,1 °C de precisão, colocado em cada incubadora (Figura 3).

Os ovos foram incubados em vermiculita umedecida na proporção de 1:1. Em cada incubadora foram colocados 30 ovos, acondicionados em um recipiente plástico. Para monitorar a temperatura de incubação foram feitas de uma a três medidas por dia com um termômetro digital de precisão ($\pm 0,1$ °C), durante todo o período de incubação, registrando em cada monitoramento a temperatura encontrada próxima aos ovos. Quando necessário, o termostato era regulado para garantir a temperatura desejada na incubadora.



Figura 3 – Incubadoras utilizadas para a determinação da temperatura pivotal. **a)** Detalhe interno da tampa com as lâmpadas e o termostato. **b)** Aspecto geral da incubadora. **c)** Recipiente plástico utilizado para a incubação dos ovos. **d)** Vista da parte superior da incubadora.

Cada ovo foi pesado com auxílio de uma balança de precisão ($\pm 0,1g$) e em seguida foram distribuídos dentro de dez recipientes plásticos. Cada incubadora recebeu três ovos de cada ninho, para evitar que as características das fêmeas fossem preponderantes sobre os efeitos da temperatura de incubação.

Durante a incubação, ovos com fungo, em estado de decomposição ou muito desidratados, foram retirados das incubadoras para evitar a contaminação dos demais. A vistoria das incubadoras quanto à presença de fungos nos ovos ou no substrato era feita diariamente durante a medição das temperaturas. Para evitar a proliferação de fungos nas incubadoras foi adicionado fungicida utilizado em aquários, da marca Labcon Aqualife, na água misturada com vermiculita.

Neste estudo, a duração da incubação é o período que se estende da desova à eclosão dos ovos. A eclosão ocorre quando o filhote rompe a casca

do ovo. Os filhotes recém-eclodidos foram separados em recipientes individuais (copos plásticos contendo vermiculita umedecida) até emergirem por completo.

Após a emergência, cada indivíduo foi pesado e mantido nos copos plásticos por mais três ou quatro dias, até a completa absorção do saco vitelínico. Para marcação foram colocados anéis de metal nas placas marginais do casco, para identificação dos filhotes, segundo a metodologia de Haller (2002). Neste momento, eles tiveram o comprimento de suas carapaças medido e foram transferidos para um compartimento com água e suporte para termo-regulação, recebendo diariamente, e em abundância, ração para peixe com 28% de proteína bruta (Figura 4).



Figura 4 – **a)** Tanque com suporte para termo-regulação dos filhotes. **b)** Filhote com saco vitelínico ainda não absorvido. **c)** Ovo com fungo.

Depois de todos os filhotes terem eclodido, durante o período de aproximadamente um ano e meio (entre dezembro de 2007 e março de 2009) medidas morfométricas de peso, comprimento da carapaça e largura da carapaça, foram realizadas no intuito de acompanhar o seu desenvolvimento.

3.3 Registro fotográfico de filhotes oriundos de ninhos naturais

Na temporada reprodutiva de 2007 foram fotografados 259 filhotes de *P. expansa* na Base do Projeto Quelônios da Amazônia no Rio Araguaia, em Luiz Alves (GO). Os filhotes foram oriundos de 20 ninhos eclodidos entre 23 e 28 de novembro.

Os 723 filhotes de ninhos naturais do Rio Javaés foram fotografados entre 18 e 25 de novembro de 2006 e foram provenientes de 40 ninhos. Os filhotes foram coletados nas praias do Canguçu, Bonita, Coco, Comprida, Goiaba e Marreca, todas dentro dos limites protegidos pelo Projeto Quelônios da Amazônia do RAN/IBAMA.

Em ambos os casos os filhotes foram coletados antes de emergirem do ninho. A abertura dos ninhos foi realizada pelos pesquisadores e agentes do RAN/IBAMA durante o monitoramento do sucesso reprodutivo. Neste momento, os filhotes vivos e mortos, filhotes retidos e ovos não eclodidos eram contados permitindo estimar o sucesso de eclosão. A abertura dos ninhos era realizada quando a parte superior da câmara de ovos colapsava devido à ascensão dos filhotes, o que causa o afunilamento da superfície do ninho. Os filhotes vivos eram coletados e mantidos por cerca de uma semana em berçários dentro da água antes de serem soltos no rio ou lagos mais próximos. Para o registro fotográfico dos filhotes procedentes de ninhos naturais foram observados os mesmos procedimentos adotados para os filhotes incubados em laboratório. As fotografias foram tiradas perpendicularmente à carapaça de cada tartaruga, tanto do laboratório como da natureza, utilizando uma câmera digital Sony DSC-T30 posicionada a 25 cm de altura em relação aos filhotes.

3.4 Análise da morfometria geométrica da carapaça

Para o estudo da correlação entre o sexo dos filhotes e a forma do casco dos recém-eclodidos foram utilizados os princípios da morfometria geométrica aplicados por Valenzuela *et al.* (2004) e por Lubiana & Ferreira Júnior (2009).

Para analisar as possíveis variações morfométricas existentes entre a forma da carapaça e o sexo dos indivíduos estudados, programas de computador que geram padrões morfológicos a partir de marcos digitalizados

nas imagens foram utilizados. Estes programas foram criados por F. James Rohlf e estão disponibilizados gratuitamente no site <<http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>>. Dentre eles estão tpsUtil, tpsDig2 e tpsRelw.

O programa tpsUtil (ROHLF, 2005) tem as funções de ordenar os espécimes num único arquivo com o formato TPS a partir de uma pasta com arquivos de imagens, possibilitando o acesso às imagens pelos outros programas da série. No programa tpsDig2 (ROHLF, 2006a) são digitalizados os marcos anatômicos nas imagens, que posteriormente serão utilizadas nas análises morfométricas. Já no tpsRelw (ROHLF, 2006b) as variáveis de forma são obtidas a partir da sobreposição dos marcos anatômicos, definidos nas imagens digitalizadas das carapaças de cada indivíduo. Este método envolve a translação, centralizando a configuração dos marcos anatômicos; rotação, minimizando as distâncias entre os marcos e escalamento, padronizando a configuração dos marcos anatômicos a partir do Tamanho do Centróide (BOOKSTEIN, 1991). No programa tpsRelw (ROHLF, 2006b) os valores das distâncias entre os marcos anatômicos são confrontados com o sexo de cada indivíduo permitindo quantificar as variações na forma da carapaça e estabelecer se as diferenças são estatisticamente significativas.

Dos dezesseis marcos anatômicos utilizados, quatorze foram do tipo 1, e dois marcos do tipo 2, seguindo a classificação de Bookstein (1991). Marcos anatômicos do tipo 1 são formados pelas intercessões entre as linhas que delimitam os escudos vertebrais, laterais e marginais; já os marcos anatômicos do tipo 2 incluem as invaginações da porção externa dos escudos marginais próximos à cauda e à cabeça dos filhotes (marcos de números 12 e 16 respectivamente) (Figura 5). As tartarugas que possuíam anomalia no casco não foram utilizadas para a análise da morfometria geométrica, mas foram eutanasiadas para a determinação da temperatura pivotal.

Como as tartarugas possuem simetria bilateral apenas metade da carapaça foi utilizada para as análises de morfometria geométrica, pois, desta forma, o número de variáveis é reduzido, minimizando a probabilidade de erros.

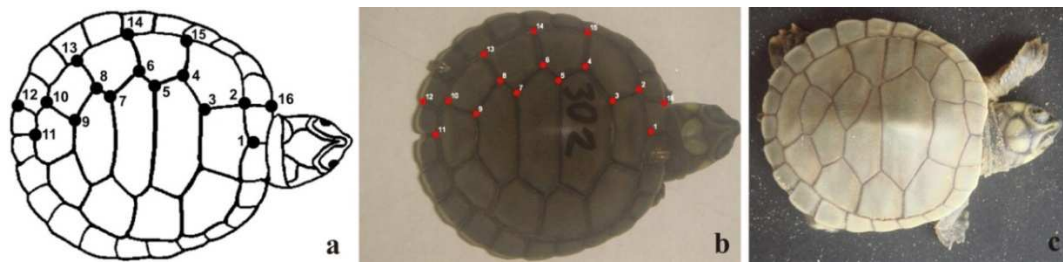


Figura 5 – **a,b)** Marcos anatômicos utilizados na análise da morfometria geométrica de filhotes recém-eclodidos de *P. expansa*. **c)** Filhote com anomalia na carapaça que não foi utilizado para a análise morfométrica.

3.5 Análise histológica

Os filhotes foram eutanasiados com aproximadamente um ano e meio de idade com uma injeção intra-cardíaca de 2 ml de tiopental sódico 1 g. Após a eutanásia, os plastrões foram removidos com auxílio de tesouras cirúrgicas e bisturis descartáveis, para a visualização, identificação e remoção das gônadas (Figura 6). Depois de removidas, as gônadas foram coradas com hematoxilina-eosina, facilitando sua visualização nos blocos de parafina, e separadas dentro de cassetes, identificados com a numeração do casco e armazenados em recipientes contendo formalina a 10% para conservação e fixação dos tecidos.

As gônadas foram emblocadas em parafina histológica. Posteriormente, cada bloco foi desbastado em um micrótomo para a confecção das lâminas histológicas, que foram analisadas em microscópio óptico para a identificação das gônadas. Estes procedimentos foram realizados no laboratório de histopatologia do complexo Biopráticas do Centro Universitário Vila Velha.

De acordo com Malvasio *et al.* (2002), a caracterização histológica dos testículos é feita pela presença de cordões de células vacuolizadas, que se tornaram túbulos seminíferos. Já os ovários possuem ovócitos que aparecem como áreas ovaladas com o núcleo centralizado (Figura 7). O oviduto e o ducto deferente apresentam-se pouco diferenciados.

Os resultados encontrados na análise das gônadas foram utilizados na quantificação de machos e fêmeas em cada incubadora para a determinação da temperatura pivotal e também na análise do dimorfismo sexual via morfometria geométrica.

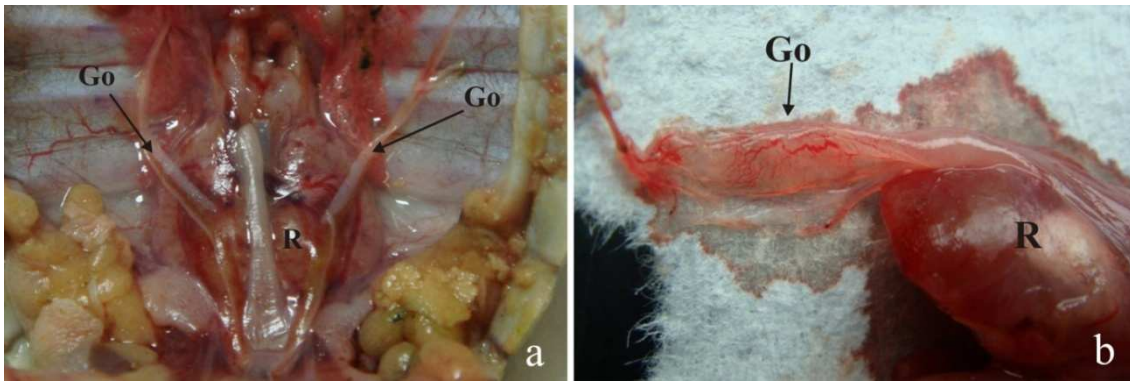


Figura 6 – Detalhes das gônadas (**Go**) e rins (**R**) de filhotes *P. expansa*.

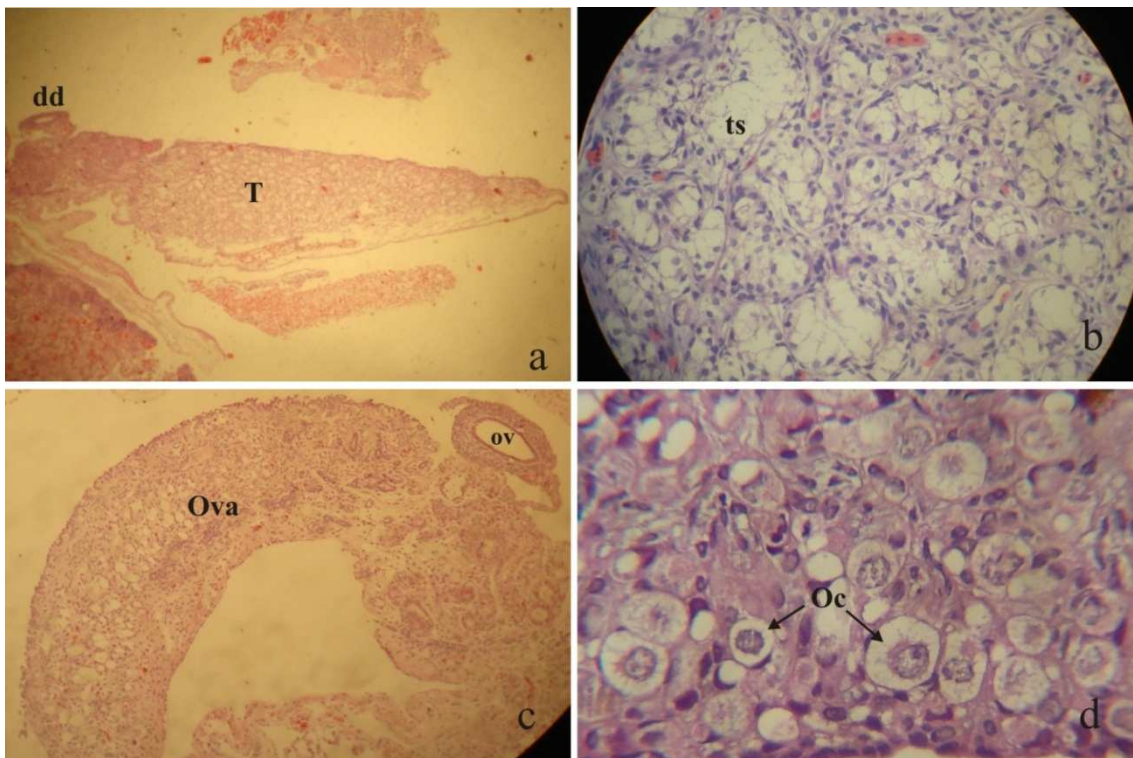


Figura 7 – Aspecto geral e detalhes das gônadas de *P. expansa* sob microscópio. **a)** Aspecto geral de um testículo (**T**) com o ducto deferente (**dd**). **b)** Detalhe de um testículo mostrando os túbulos seminíferos (**ts**). **c)** Aspecto geral de um ovário (**Ova**) com o oviduto (**ov**). **d)** Detalhe de um ovário apontando os ovócitos (**Oc**).

3.6 Análise estatística

As variáveis mensuradas foram transformadas pelo seu logaritmo decimal objetivando a normalização, que foi verificada pelo teste de K^2 , considerando a curtose e a simetria do conjunto de dados como indicadores de normalidade (ZAR, 2008). A análise discriminante foi realizada com base na morfometria geométrica da carapaça dos filhotes, a partir dos 16 marcos anatômicos digitalizados nesta. A consistência dos descritores entre os sexos nas duas espécies foi verificada através dos parâmetros Lambda de Wilks, Traço de Pillai e Traço de Lawley-Hotelling. A capacidade de explicação da variação do conjunto dos dados foi expressa pelos autovalores da matriz padronizada. Esta matriz padronizada foi gerada no programa tpsRelw (ROHLF, 2006b). A classificação de indivíduos nos grupos para estimar a função discriminante foi procedida, de modo a que cada indivíduo fosse inserido no grupo cujo centróide se encontrasse mais próximo do valor observado. A taxa de sucesso da função discriminante e a classificação dos indivíduos não-sexados histologicamente foi estimada pela Distância Quadrada de Mahalanobis. A validação cruzada foi feita pelo método de Jackknife. A análise discriminante e seu diagnóstico foram executados no programa Systat 9.0 para Windows.

4. RESULTADOS

4.1 Temperatura pivotal

A temperatura pivotal para a população de *P. expansa* do Rio Araguaia em São Miguel do Araguaia (GO) é de 33 °C (Figura 8), calculada a partir da sexagem de 72 filhotes oriundos da incubação em dez temperaturas distintas (Tabela 1). Para o cálculo da temperatura pivotal foram utilizadas as médias das temperaturas do segundo terço de incubação (período termo-sensitivo).

Tabela 1 – Resultado da incubação de *P. expansa*. Total de indivíduos sexados (n); Número de machos e fêmeas por temperatura, acompanhados da porcentagem relativa de cada sexo. O sucesso de eclosão foi estimado a partir do número de filhotes eclodidos em cada incubadora. Para a duração da incubação: média ± desvio padrão (intervalo).

Temperatura Média (°C)	n	Duração da Incubação (Dias)	Macho	Fêmea	Sucesso de Eclosão
28,3 ± 0,12	4	84 ± 1,15 (83-85)	4 (100%)	0	13,3%
29,1 ± 0,14	12	73,3 ± 3,98 (70-85)	12 (100%)	0	40%
30	0				0
31	0				0
32,5 ± 0,12	16	48,8 ± 0,34 (48-49)	12 (75%)	4 (25%)	53,3%
33,6 ± 0,17	15	44,2 ± 0,70 (43-45)	3 (20%)	12 (80%)	50%
34	0				0
35,3 ± 0,17	12	39,5 ± 0,66 (39-41)	0	12 (100%)	40%
36,1 ± 0,21	10	38,5 ± 0,70 (38-40)	0	10 (100%)	33,3%
36,9 ± 0,14	3	38 ± (38)	0	3 (100%)	10%

Nas temperaturas mais baixas foram gerados somente machos (28,3 °C e 29,1 °C) e nas mais elevadas somente fêmeas (35,3 °C, 36,1 °C e 36,9 °C). Nas temperaturas intermediárias (32,5 °C e 33,6 °C) ocorreram os dois sexos em diferentes proporções. A duração pivotal da incubação, considerada como o período da desova até o rompimento do ovo, foi estimada em 47 dias (Figura 10).

O sucesso da eclosão foi influenciado pela temperatura de incubação (Figura 12). Temperaturas muito elevadas foram letais para a maioria dos embriões. Ocorreu uma diminuição abrupta do sucesso de eclosão abaixo de 29 °C e acima de 36 °C. Não foram gerados filhotes nas incubadoras com temperaturas de 30 °C, 31 °C e 34 °C.

A temperatura pivotal e a duração pivotal da incubação para a população do Rio Javaés (TO), foram respectivamente de 33,5 °C e 43 dias (Figuras 9 e 11). Estes dados foram obtidos de Lubiana & Ferreira Júnior (2009).

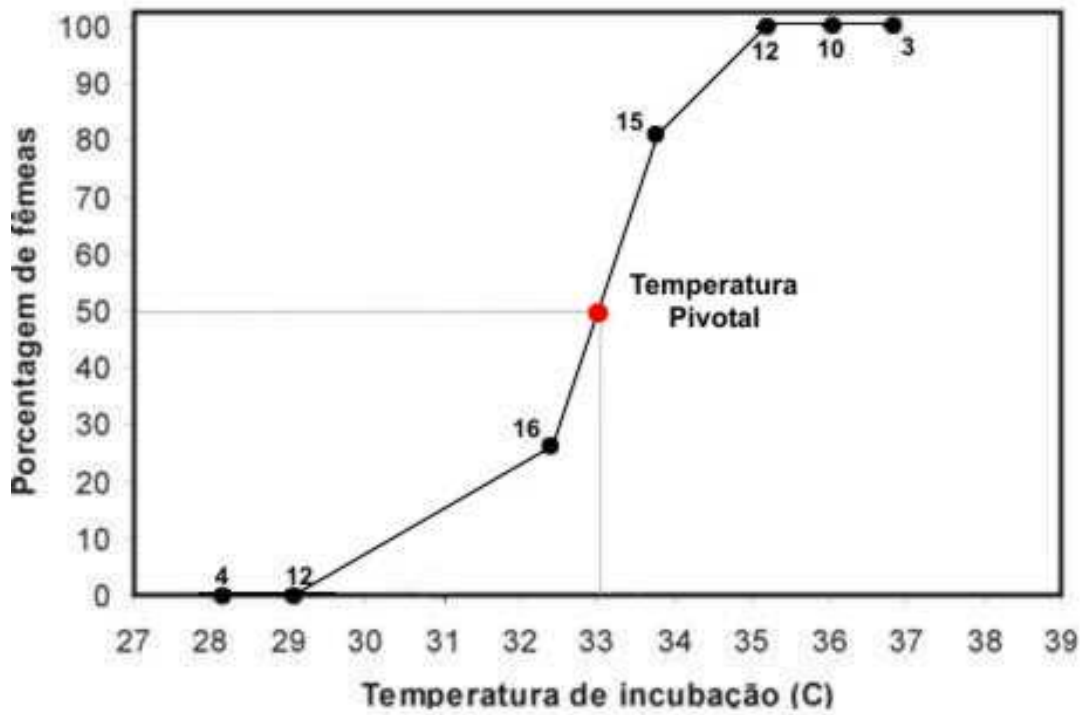


Figura 8 – Razão sexual de *P. expansa* em diferentes temperaturas de incubação. A temperatura pivotal para a população do Rio Araguaia, em São Miguel do Araguaia, é de 33 °C. Os valores dos pontos indicam o tamanho da amostra.

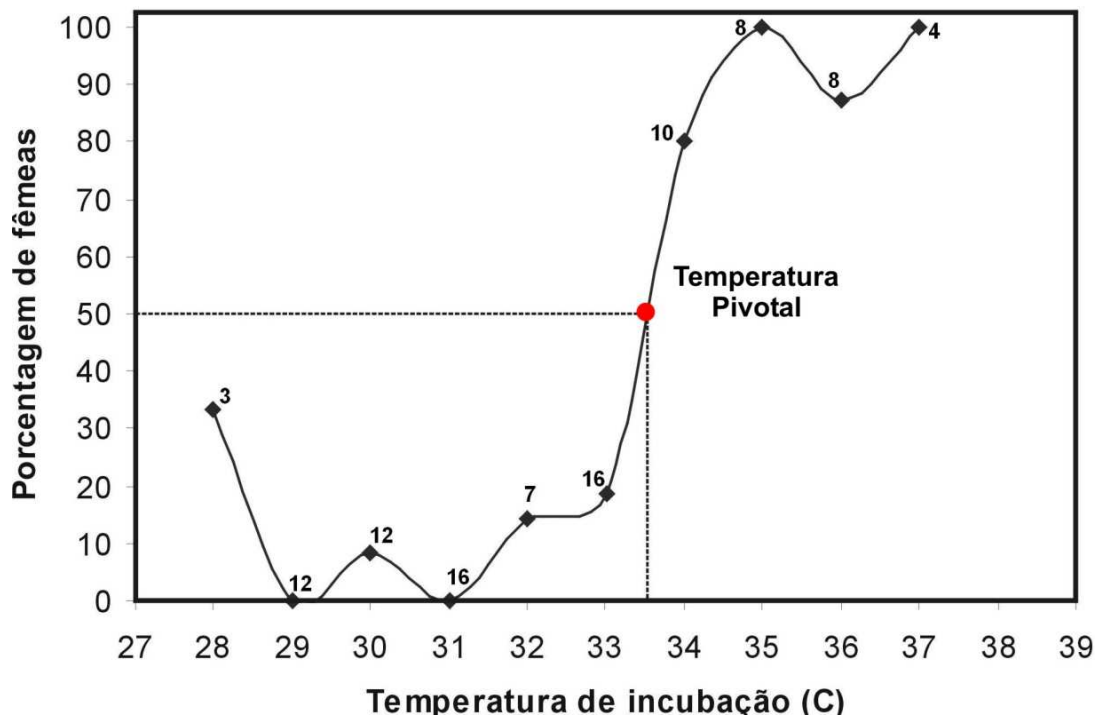


Figura 9 – Razão sexual de *P. expansa* em diferentes temperaturas de incubação. A temperatura pivotal para a população do Rio Javaés, na Ilha do Bananal, é de 33,5 °C. Os valores dos pontos indicam o tamanho da amostra.

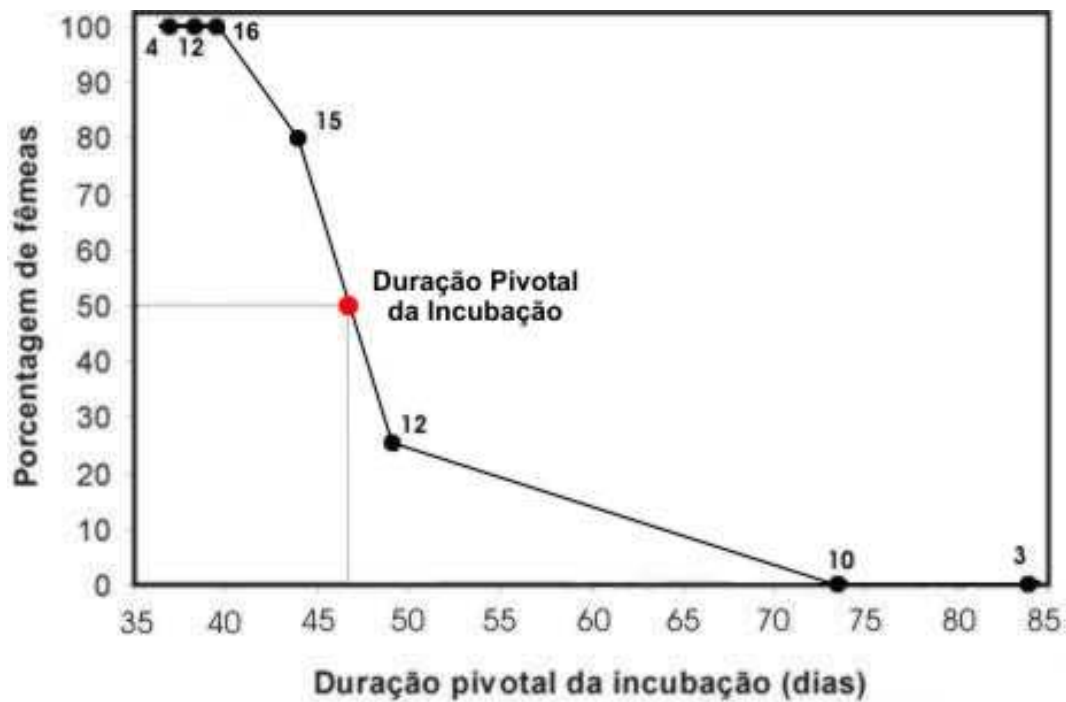


Figura 10 – Relação entre a duração da incubação e a porcentagem de fêmeas de *P. expansa* do Rio Araguaia. A duração pivotal da incubação foi estimada em 47 dias. Os valores dos pontos indicam o tamanho da amostra.

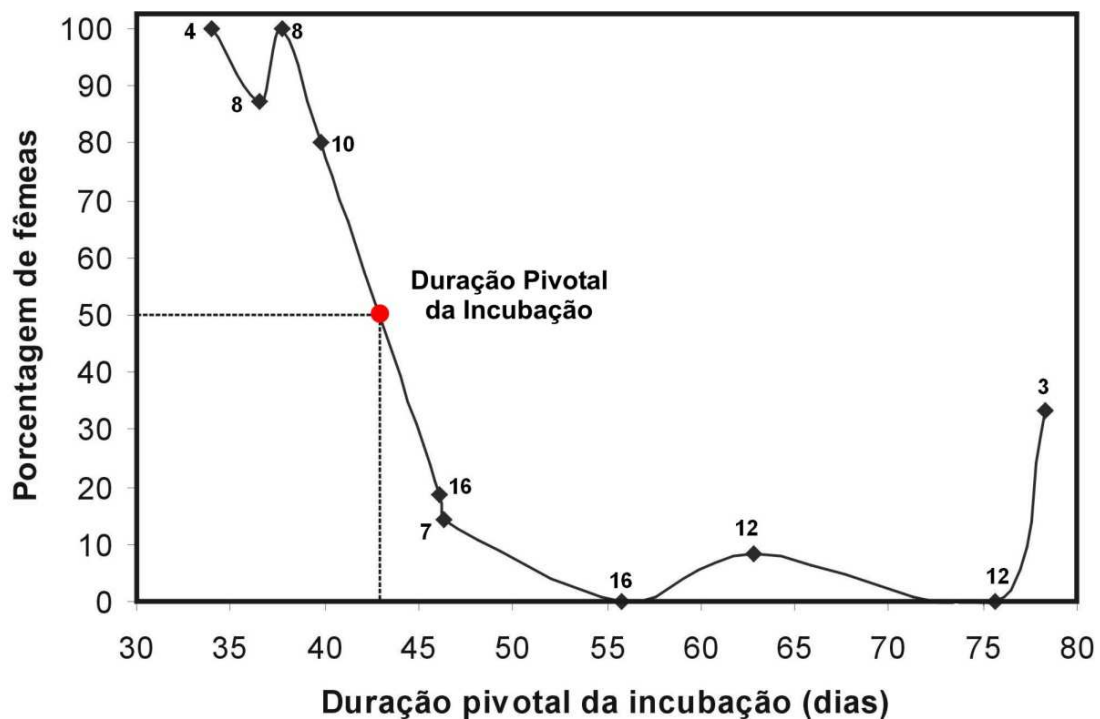


Figura 11 – Relação entre a duração da incubação e a porcentagem de fêmeas de *P. expansa*. A duração pivotal da incubação foi estimada em 43 dias. Os valores dos pontos indicam o tamanho da amostra.

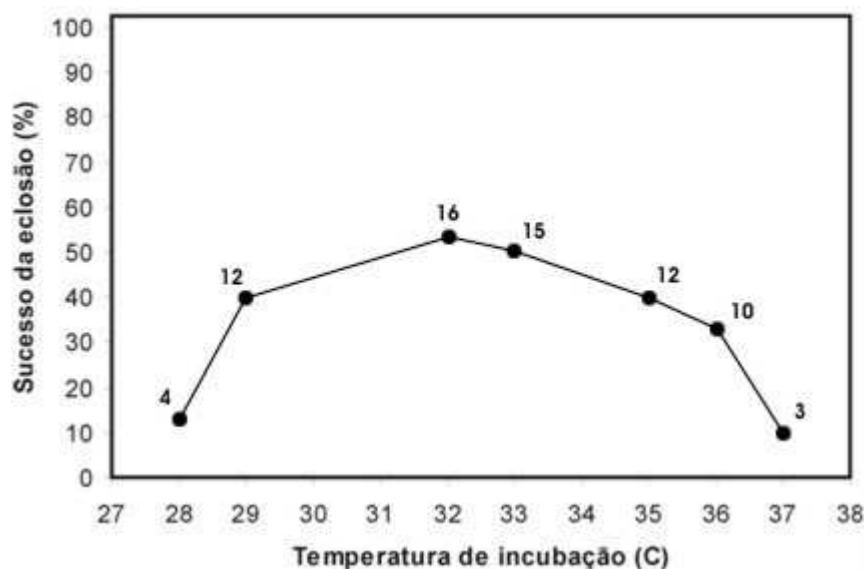


Figura 12 – Relação entre o sucesso de eclosão de *P. expansa* do Rio Araguaia e a temperatura de incubação. Os valores dos pontos indicam o tamanho da amostra.

4.2 Morfometria geométrica

A análise da morfometria geométrica em 70 filhotes recém-eclodidos de *P. expansa* do Rio Araguaia incubados em laboratório revelou que existe dimorfismo sexual para a população do Rio Araguaia ($F = 17,08$; $gl = 28;41$; $p < 0,01$). A análise discriminante detectou grupos consistentes altamente significativos (Tabela 2). O poder classificatório dos autovalores da matriz padronizada permitiu um acerto de 100% na discriminação de machos e 95% para a discriminação de fêmeas. A prova de validação cruzada permitiu um acerto médio de 84%, sendo 77% para os machos e 90% para as fêmeas.

Tabela 2 - Indicadores estatísticos para a relação entre a forma da carapaça e o sexo dos filhotes de *P. expansa* do Rio Araguaia. O sexo dos filhotes foi confirmado pela análise histológica das gônadas.

Parâmetros	Valor	F	gl	p
Lambda de Wilks	0,225	5,02	28;41	< 0,01
Traço de Pillai	0,774	5,02	28;41	< 0,01
Traço de Lawley-Hotelling	3,428	5,02	28;41	< 0,01

A diferença do sexo explica apenas 20,07% da variação da forma da carapaça. A análise de componentes principais (PCA) revelou sobreposição da forma de inúmeros espécimes (Figura 13). Essa sobreposição, entretanto, pode

ser explicada pela grande quantidade da variação que não é explicada pelo sexo.

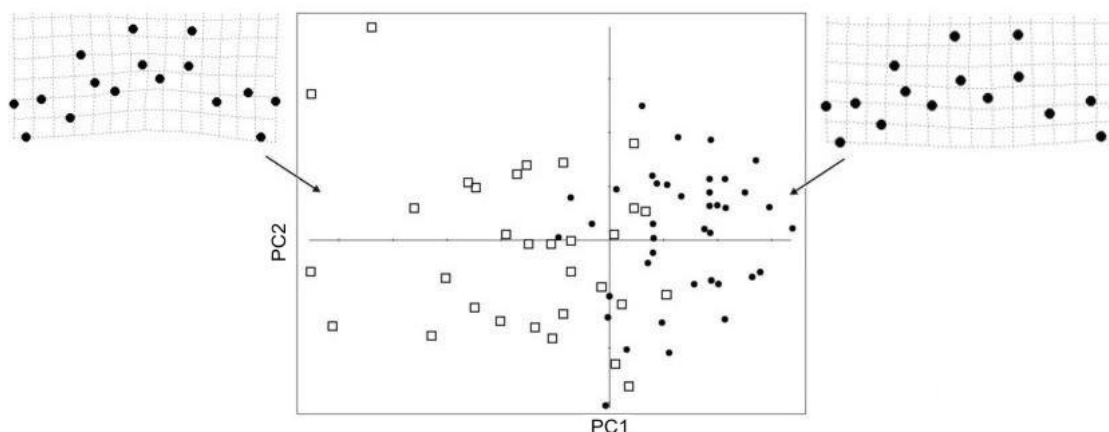


Figura 13 – Representação dos primeiros eixos da análise de componentes principais da forma da carapaça de 70 filhotes recém-eclodidos de *P. expansa* do Rio Araguaia. PC1 explica 37,5% da variação da forma e PC2 16,01%. Círculos representam fêmeas e quadrados machos. À esquerda tem-se a grade de deformação prevista para os machos e à direita para as fêmeas. A título de orientação, a cabeça está situada à direita da grade de deformação.

Para os 92 filhotes do Rio Javaés incubados em laboratório, a análise da morfometria geométrica, utilizando 16 marcos anatômicos, revelou que existe dimorfismo sexual para esta população ($F = 10,60$; $gl = 28;63$; $p < 0,01$). A análise discriminante detectou grupos consistentes altamente significativos (Tabela 3). O poder classificatório dos autovalores da matriz padronizada permitiu um acerto de 94% na discriminação de machos e 90% para a discriminação de fêmeas. A prova de validação cruzada permitiu um acerto médio de 81%, sendo 82% para os machos e 80% para as fêmeas. A diferença do sexo explica apenas 10,53% da variação da forma da carapaça (Figura 14).

Tabela 3 - Indicadores estatísticos para a relação entre a forma da carapaça e o sexo dos filhotes de *P. expansa* do Rio Javaés. O sexo dos filhotes foi confirmado pela análise histológica das gônadas.

Parâmetros	Valor	F	gl	p
Lambda de Wilks	0,313	4,93	28;63	< 0,01
Traço de Pillai	0,686	4,93	28;63	< 0,01
Traço de Lawley-Hotelling	2,191	4,93	28;63	< 0,01

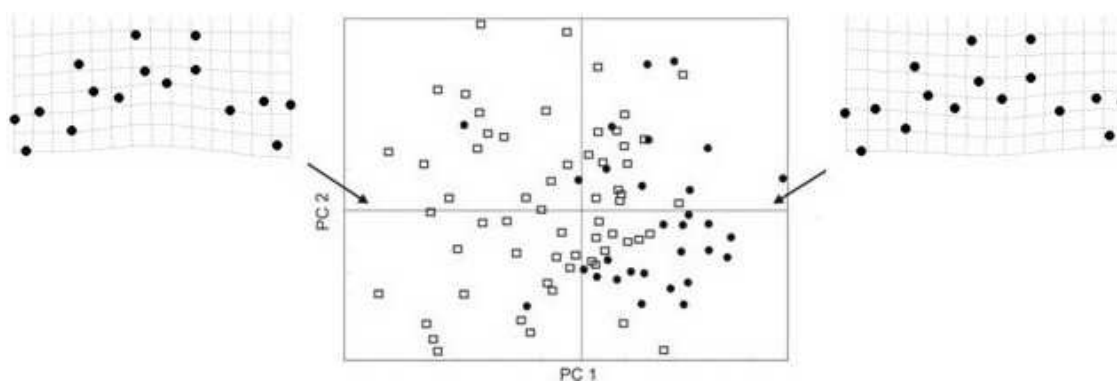


Figura 14 – Representação dos primeiros eixos da análise de componentes principais da forma da carapaça de 92 filhotes recém-eclodidos de *P. expansa* do Rio Javaés. PC1 explica 26,7% da variação da forma e PC2 17,4%. Círculos representam fêmeas e quadrados machos. À esquerda tem-se a grade de deformação prevista para os machos e à direita para as fêmeas. A título de orientação, a cabeça está situada à direita da grade de deformação.

Analisando conjuntamente os filhotes do Araguaia e do Javaés incubados no laboratório, não foi possível separar as duas populações pela forma da carapaça. Os resultados, apesar de estatisticamente significativos (Tabela 4), apontam uma sobreposição muito grande entre os indivíduos das duas populações (Figura 15).

Tabela 4 - Indicadores estatísticos para a comparação entre a forma da carapaça dos filhotes de *P. expansa* dos Rios Araguaia e Javaés. O sexo dos filhotes foi confirmado pela análise histológica das gônadas.

Parâmetros	Valor	F	gl	p
Lambda de Wilks	0,213	3,18	84;369	< 0,01
Traço de Pillai	1,044	2,53	84;399	< 0,01
Traço de Lawley-Hotelling	2,464	3,80	84;389	< 0,01

De maneira geral, a forma da carapaça dos filhotes machos e fêmeas do Rio Araguaia se assemelham a forma dos filhotes do Rio Javaés (Figura 16). Os machos das duas populações diferem das fêmeas apresentando um maior distanciamento na parte central da carapaça onde se encontram os escudos vertebrais. Os machos do Rio Araguaia apresentam os marcos dos escudos marginais mais próximos à cabeça um pouco mais abertos quando comparados aos machos do Rio Javaés e às fêmeas das duas localidades.

Os marcos dos escudos marginais próximos da cabeça e da cauda se apresentam mais agrupados nas fêmeas do que nos machos, sendo um agrupamento mais visível na região nucal das fêmeas do Rio Araguaia.

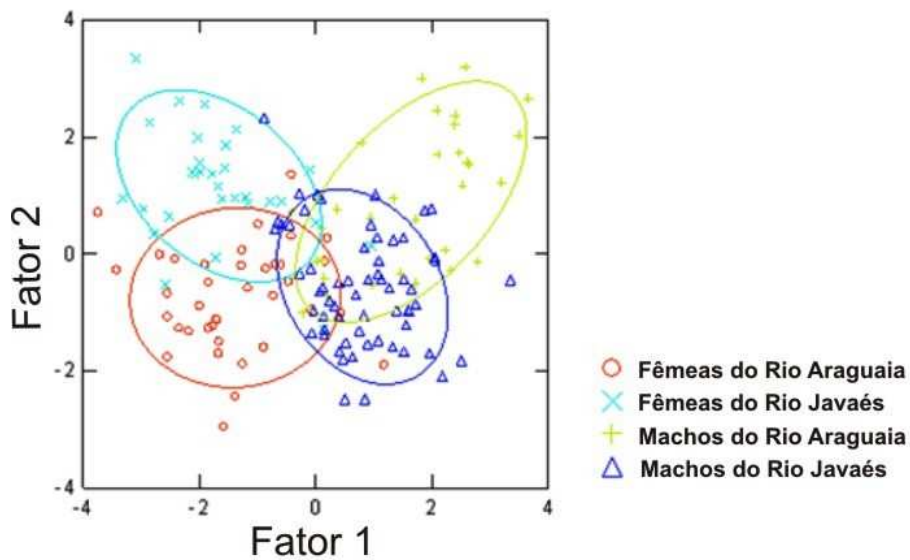


Figura 15 – Valores canônicos da análise discriminante conjunta dos filhotes de *P. expansa* dos Rios Araguaia e Javaés. Apesar da formação de quatro grupos, nota-se uma grande sobreposição entre eles.

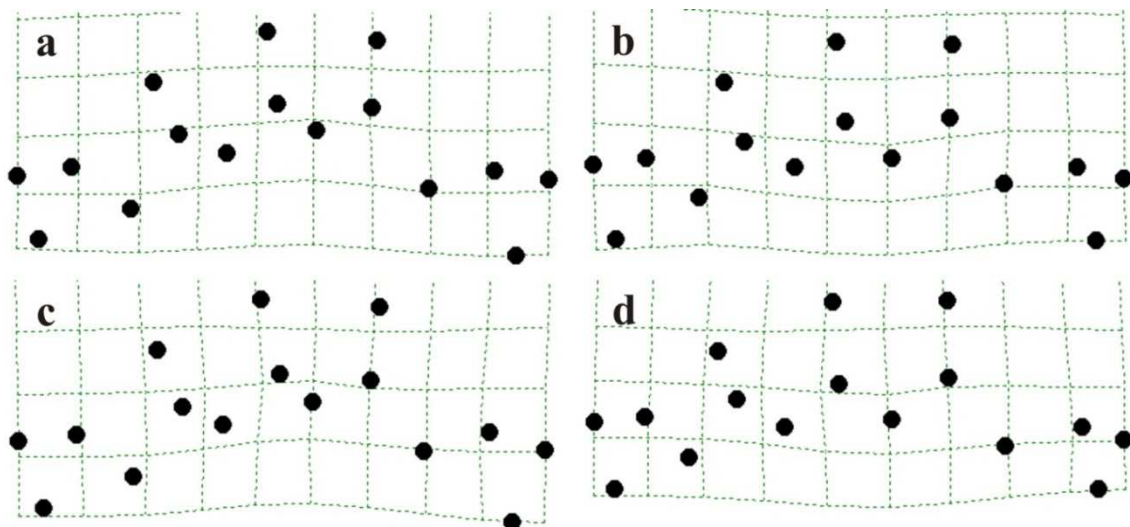


Figura 16 – Comparação das grades de deformação para machos e fêmeas de *P. expansa* do Rio Javaés e do Rio Araguaia. **a)** Macho do Rio Javaés. **b)** Fêmea do Rio Javaés. **c)** Macho do Rio Araguaia. **d)** Fêmea do Rio Araguaia. A título de orientação, a cabeça está situada à direita da grade de deformação.

Utilizando apenas os machos das duas populações, incubados em laboratório, os resultados não foram significativos (Tabela 5). O total de acertos

da validação cruzada foi de apenas 62%, mostrando que a morfometria geométrica não foi eficiente na separação dos machos das duas populações.

Tabela 5 - Indicadores estatísticos para a comparação entre a forma da carapaça dos filhotes machos de *P. expansa* dos Rios Araguaia e Javaés. O sexo dos filhotes foi confirmado pela análise histológica das gônadas.

Parâmetro	Valor	F	gl	p
Lambda de Wilks	0,606	1,50	28;65	0,09
Traço de Pillai	0,393	1,50	28;65	0,09
Traço de Lawley-Hotelling	0,647	1,50	28;65	0,09

Entretanto, analisando apenas as fêmeas, foi possível separar os indivíduos das duas populações (Tabela 6). Na matriz de classificação, 90% dos filhotes foram classificados corretamente e, na prova da validação cruzada, encontrou-se uma média de 72% de acerto, sendo 71% para as fêmeas do Rio Araguaia e 73% para as fêmeas do Rio Javaés.

Tabela 6 - Indicadores estatísticos para a comparação entre a forma da carapaça dos filhotes fêmeas de *P. expansa* dos Rios Araguaia e Javaés. O sexo dos filhotes foi confirmado pela análise histológica das gônadas.

Parâmetro	Valor	F	gl	p
Lambda de Wilks	0,337	2,73	28;39	< 0,01
Traço de Pillai	0,662	2,73	28;39	< 0,01
Traço de Lawley-Hotelling	1,959	2,73	28;39	< 0,01

Não foi possível classificar a origem dos filhotes, se do Rio Araguaia ou do Rio Javaés, a partir da forma da carapaça. Quando os filhotes gerados em laboratório de ambas as populações foram analisados, excluindo a variável “sexo”, os resultados não foram significativos ($p = 1$). A partir dos autovalores da matriz padronizada, apenas 48% dos indivíduos foram classificados corretamente dentro de sua população. A validação cruzada não classificou nenhum filhote corretamente. Os resultados indicam que os filhotes recém-eclodidos não apresentam variações morfológicas que permitam separá-los por populações.

A partir da forma da carapaça dos filhotes eclodidos em laboratório e sexados histologicamente, foi possível classificar os filhotes não sexados histologicamente provenientes de incubação natural. A função discriminante

consolida a possibilidade de aplicação da morfometria geométrica na detecção do dimorfismo sexual na espécie em estudo com um acerto médio de 84% para os filhotes do Rio Araguaia (Tabela 7) e 82% para os do Rio Javaés (Tabela 8), sem a necessidade da eutanásia dos indivíduos. As Tabelas 7 e 8 mostram a classificação dos filhotes não sexados histologicamente e a porcentagem de fêmeas encontradas em cada ninho amostrado na natureza. Os resultados indicam uma razão sexual favorável aos machos nos rios Araguaia e Javaés. No Rio Javaés a duração da incubação foi de $60,1 \pm 4,23$ dias, variando entre 52 e 68 dias. No Rio Araguaia os ninhos amostrados se concentraram no início do período da eclosão, mas não se tem o registro da data da desova.

O maior número de filhotes classificados como machos em ambas as populações reflete uma amostragem parcial com indivíduos do início da estação de eclosão. Para a população do Rio Javaés, as durações da incubação dos ninhos foram longas, condizentes com as baixas porcentagens de fêmeas. Existe uma correlação entre a duração da incubação e a razão sexual do Rio Javaés ($r^2 = 0,119$; $F = 5,12$; $p = 0,029$).

Tabela 7 - Classificação dos filhotes não sexados histologicamente provenientes de incubação natural do Rio Araguaia.

Ninho	Machos	Fêmeas	Dúvidosos	Total	% fêmeas
N4	14	0	0	14	0
N7	9	0	1	10	0
N18	11	0	1	12	0
N29	11	0	0	11	0
N1	18	1	0	19	5,26
N3	13	1	2	16	6,25
N20	12	1	0	13	7,69
N5	8	1	3	12	8,33
N30	7	1	1	9	11,11
N21	9	2	1	12	16,67
N22	7	2	3	12	16,67
N19	12	3	0	15	20
N24	10	3	1	14	21,43
N25	3	3	4	10	30
N6	5	4	4	13	30,77
N2	11	6	0	17	35,29
N17	5	5	3	13	38,46
N11	5	6	2	13	46,15
N28	3	6	3	12	50
N23	2	9	1	12	75
TOTAL	175	54	30	259	20,85

Tabela 8 - Classificação dos filhotes não sexados histologicamente provenientes de incubação natural do Rio Javaés. Duração da Incubação (D.I.). O total da duração da incubação representa a média \pm o desvio padrão dos ninhos amostrados.

Ninho	Machos	Fêmeas	Dúvidas	Total	D.I.	% fêmeas
N6	12	0	3	15	62	0
N9	13	0	2	15	59	0
N13	11	0	4	15	67	0
N14	15	0	1	16	63	0
N33	19	0	1	20	64	0
N36	19	0	1	20	64	0
N18	22	1	1	24	63	4,17
N20	16	1	3	20	57	5
N24	19	1	0	20	65	5
N40	18	1	1	20	64	5
N5	12	1	2	15	57	6,67
N12	9	1	5	15	55	6,67
N15	17	2	1	20	63	10
N35	15	2	3	20	64	10
N39	11	2	7	20	64	10
N3	11	2	2	15	65	13,33
N22	17	3	0	20	59	15
N26	8	3	9	20	62	15
N8	9	3	3	15	65	20
N27	9	3	3	15	57	20
N32	10	4	6	20	65	20
N34	12	4	4	20	68	20
N23	8	4	7	19	52	21,05
N7	5	3	6	14	61	21,43
N1	5	3	5	13	61	23,08
N17	9	4	4	17	57	23,53
N21	10	5	5	20	57	25
N30	12	5	3	20	59	25
N4	5	4	6	15	61	26,67
N16	9	6	5	20	65	30
N2	6	5	4	15	61	33,33
N11	7	5	3	15	59	33,33
N25	8	8	4	20	57	40
N29	10	8	2	20	52	40
N37	10	8	2	20	64	40
N19	6	9	5	20	57	45
N31	2	10	8	20	63	50
N38	4	11	5	20	68	55
N28	2	15	3	20	53	75
N10	2	12	1	15	55	80
TOTAL	424	159	140	723	60,1 \pm 4,2	21,99

5. DISCUSSÃO

A temperatura pivotal para *Podocnemis expansa* do Rio Araguaia incubadas sob temperaturas constantes em laboratório foi de 33 °C. Em outros trabalhos, com incubação no ambiente natural, diferentes temperaturas pivotais foram encontradas para *P. expansa*, dentre elas 34,5 °C para uma população do Rio Trombetas no Pará (ALHO *et al.*, 1984) e 32,5 °C para uma população do Rio Caquetá na Colômbia (VALENZUELA *et al.*, 1997). Em dois outros estudos, com temperatura controlada e constante em laboratório, Valenzuela *et al.* (2001c) encontraram 32,6 °C e Lubiana & Ferreira Júnior (2009) apontaram 33,5 °C para uma população do Rio Javaés na Ilha do Bananal (TO). Estas variações dos resultados podem estar relacionadas às diferenças que existem entre as populações, mesmo que estas possam apresentar algum fluxo gênico (SITES JÚNIOR *et al.*, 1999), e às diferentes latitudes e climas em que estas se encontram. A temperatura pivotal para as tartarugas do Rio Javaés, que se encontram mais próximas à linha do Equador, é maior que a encontrada para os filhotes do Rio Araguaia, condizente com a variação climática entre as áreas (Figura 17). Este padrão foi anteriormente reportado para outras espécies como *Chelydra serpentina*, *Chrysemys picta* e *Trachemys scripta* (EWERT *et al.* 1994, 2004).

Podocnemis expansa, possui uma elevada temperatura pivotal (VALENZUELA, 2001c) assim como *Podocnemis unifilis* que possui temperatura pivotal em torno de 32 °C (SOUZA & VOGT, 1994), e *Podocnemis lewyana*, 33,4 °C (PÁEZ *et al.*, 2009). Esta característica está associada ao hábito destas espécies desovarem em praias abertas e arenosas, e na maioria das vezes desprovidas de vegetação (ESCALONA & FÁ, 1998; FERREIRA JÚNIOR & CASTRO, 2003). Além disso, elas se distribuem geograficamente pela zona tropical (PRITCHARD & TREBBAU, 1984; ALMONACID *et al.*, 2007), e, desta forma, a incubação dos ovos normalmente se dá em altas temperaturas. Isso promove a necessidade de uma temperatura pivotal mais alta, com o intuito de evitar o nascimento apenas de fêmeas e um conseqüente desequilíbrio populacional que inviabilizaria a ocupação das áreas

(EWERT & NELSON, 1991; EWERT *et al.*, 1994; STANDING *et al.*, 1999; EWERT *et al.*, 2004).



Figura 17: Temperaturas médias anuais nas duas áreas de coleta, no Rio Javaés mais ao Norte (29,5 °C), e Rio Araguaia mais ao Sul (26,5 °C).

Fonte: http://www.bestcountryreports.com/Temperature_Map_Brazil.html.

Para os filhotes incubados em laboratório, existiu uma correlação inversamente proporcional entre a duração da incubação e a temperatura da incubação de *P. expansa* como apontado por Lubiana & Ferreira Júnior (2009). Nas temperaturas mais elevadas de incubação (35,3; 36,1 e 36,9 °C) foram geradas 100% de fêmeas que apresentaram uma menor duração de incubação. De forma inversa, 100% dos machos foram gerados nas temperaturas mais baixas (28,3 e 29,1 °C), que apresentaram uma maior duração da incubação. As maiores porcentagens de machos ocorreram nas durações de incubação mais longas, acima de 48 dias, para os filhotes incubados em laboratório.

Outro resultado deste trabalho com *P. expansa* do Rio Araguaia está relacionado à duração pivotal da incubação, calculada em 47 dias para a incubação em laboratório. A duração pivotal da incubação de *P. expansa* mostra uma grande influência do ambiente termal e deve ocupar uma posição de destaque em relação a outros répteis com determinação sexual dependente da temperatura. A duração da incubação de *P. expansa* deve ser uma das menores entre as outras tartarugas. À duração da incubação obtida em laboratório, deve ser acrescentado o número de dias que os filhotes levam para abandonarem os ninhos no ambiente natural. Para a tartaruga marinha *Caretta caretta* são necessários mais quatro dias após a ruptura da casca e a emergência do ninho (MARCOVALDI *et al.*, 1997 & MROSOVSKY *et al.*, 1999). Outras espécies, como aquelas do gênero *Trachemys*, que ocupam zonas temperadas no Hemisfério Norte (ARESCO, 2004; TUCKER & PAUKISTIS, 1999), e *T. dorbignyi*, no Rio Grande do Sul (BAGER *et al.*, 2007), podem passar meses no ninho, após abandonarem completamente os ovos aguardando condições climáticas favoráveis. Por tanto, são necessários estudos complementares para avaliar o tempo decorrido por filhotes de *P. expansa* entre a ruptura do ovo e a saída do ninho com o intuito de extrapolar os dados do laboratório para os trabalhos de campo com ninhos naturais.

Outra dificuldade na projeção da duração pivotal da incubação obtida em laboratório para as condições de campo está nas diferenças no ambiente termal. Georges *et al.* (1994) apontaram que mudanças abruptas do clima

podem alterar a embriogênese com reflexos na duração da incubação, já que em temperaturas mais elevadas ocorre um desenvolvimento embrionário acelerado (PIEAU, 1982; MROSOVSKY *et al.*, 1984). Deste modo a duração média da incubação reflete o ambiente termal de todo o período e pode não contemplar variações climática importantes para a determinação sexual (GEORGES *et al.*, 2004; GEORGES, 1989).

Na classificação do sexo dos filhotes gerados na natureza pela morfometria geométrica as durações de incubação apresentadas situaram-se acima de 55 dias, e as porcentagens de machos também foram elevadas na maioria dos ninhos (Tabela 8). A razão sexual favorável aos machos é condizente com o período de amostragem que foi restrito ao início do período da eclosão. Ninhos do início da estação reprodutiva estão sujeitos a temperaturas mais baixas, levando a um maior desenvolvimento de filhotes machos e uma maior duração da incubação (FERREIRA JÚNIOR *et al.*, 2003b; FERREIRA JÚNIOR & CASTRO, 2003; BAPTISTOTTE *et al.*, 1999). A variação da duração da incubação em uma semana foi pequena, o que refletiu na razão sexual favorável aos machos na grande parte dos ninhos.

Apesar das limitações impostas pelas variações climáticas, a correlação entre a duração da incubação dos ninhos naturais e a razão sexual sugere que a duração da incubação pode ser usada como um indicativo para a razão sexual em projetos de longa duração e que envolvam um grande número de ninhos (MROSOVSKY *et al.*, 1999). Para espécies de vida longa e longo período reprodutivo são desejáveis estudos de longo prazo para que se possa avaliar as influências naturais e antrópicas sobre a estrutura da população (BURKE *et al.*, 1995; CONGDON *et al.*, 2000; BAGER *et al.*, 2007).

Como dados laboratoriais e de campo relativos à duração da incubação e à razão sexual se correlacionaram, recomenda-se a realização de trabalhos para definição das durações pivotais da incubação em campo, utilizando um número maior de ninhos dentro de diferentes populações e em diversas estações reprodutivas. A partir dos resultados será possível avaliar e quantificar os fatores ambientais (e.g. variações no clima) que influenciam a razão sexual e a duração da incubação (MARCOVALDI *et al.*, 1997 e MROSOVSKY *et al.*, 1999).

O baixo sucesso de eclosão nas temperaturas mais altas e mais baixas é atribuído ao limite termal apresentado por esta espécie, o que, por sua vez, limita a área de ocorrência e os ambientes de nidificação, restringindo a distribuição geográfica à zona tropical e a desova à praias abertas e ensolaradas (ALMONACID *et al.*, 2007).

5.1 Morfometria geométrica

A tentativa de individualizar o sexo de filhotes fotografados na natureza através da morfometria geométrica, comparando-os aos filhotes sexados em laboratório foi positiva tanto para as tartarugas do Rio Araguaia quanto para as do Rio Javaés. Para a população do Rio Araguaia foi possível definir o sexo dos filhotes eclodidos de ninhos naturais com um acerto total de 88,4%, para os filhotes do Rio Javaés o acerto foi de 80,63%. Para ambas as populações e na maioria dos ninhos amostrados a razão sexual favoreceu os machos. Este resultado está relacionado ao curto período em que as fotografias dos filhotes foram tiradas em campo (menos de uma semana). Além disto, as amostragens foram feitas no início do período de eclosão e os filhotes originários de ninhos desovados no início da temporada reprodutiva, o que pode explicar as longas durações de incubação, já que estes ninhos experimentaram temperaturas menores (PEZZUTI & VOGT, 1999; FERREIRA JÚNIOR *et al.*, 2003b; VOGT & BULL, 1982).

Filhotes de *Podocnemis expansa* recém-eclodidos em laboratório apresentam dimorfismo sexual, confirmando os resultados anteriores de Valenzuela *et al.* (2004) e Lubiana & Ferreira Júnior (2009), sendo a diferença das carapaças revelada via análise da morfometria geométrica. Quando comparadas, as grades de deformação das carapaças dos filhotes recém-eclodidos dos rios Araguaia e Javaés mostraram algumas diferenças sutis (Figura 14). As principais diferenças localizaram-se na região dos escudos vertebrais e próximos à nuca. De maneira geral as fêmeas apresentam uma carapaça mais dômica que os machos, conferindo um maior volume corporal. Um maior volume pode trazer vantagens reprodutivas às fêmeas que poderiam

produzir ninhadas com um número maior de ovos (VALENZUELA *et al.*, 2004; HAYS, 2001).

Quando a forma da carapaça dos filhotes dos rios Javaés e Araguaia foi comparada, excluindo-se o sexo como uma variável, não foi possível individualizá-los pela sua localidade. Uma sobreposição muito grande entre a forma da carapaça dos filhotes inviabilizou a distinção das duas áreas (Figura 13). A distância relativamente pequena, a ausência de barreiras geográficas e o fato de *P. expansa* ser uma espécie que migra por grandes distâncias dentro de uma mesma bacia hidrográfica (VOGT, 2008) podem explicar esta sobreposição, pois estes fatores facilitam o fluxo gênico entre as populações de ambas as regiões o que impede uma distinção morfológica (SITES JÚNIOR *et al.*, 1999). As diferenças genéticas entre as duas populações não seriam suficientes para causar variações na morfologia dos cascos das duas populações (BOCK *et al.* 2001).

Ao contrário do apontado por Myers *et al.* (2006), que separaram duas populações de *Trachemys scripta*, no estado de Illinois (EUA), não foi possível individualizar filhotes do Rio Araguaia e do Rio Javaés eclodidos no laboratório pela forma da carapaça, via morfometria geométrica, quando comparados machos e fêmeas conjuntamente ou quando comparados apenas os machos das duas populações. Contudo, quando analisamos apenas as fêmeas de ambas as localidades geradas no laboratório, as duas populações puderam ser distinguidas.

A variação em campo na morfologia dos filhotes deve ser ainda maior devido às oscilações da temperatura durante a incubação que podem levar a um desenvolvimento heterogêneo da carapaça. Variações na temperatura podem fazer com que parte do desenvolvimento dos embriões se dê nas condições de geração de fêmeas e parte na de machos (PIEAU, 1982). Como resultado final, a carapaça dos filhotes pode apresentar elementos dos dois sexos, o que dificultaria a distinção do gênero (GUIX *et al.*, 2001). A morfometria geométrica pode ser considerada uma ferramenta eficiente na diferenciação dos sexos, mas não foi adequada à separação das diferentes populações de filhotes gerados em laboratório em temperaturas constantes.

Apenas uma pequena parcela da forma da carapaça dos indivíduos é explicada pelo sexo: 20,07% para os filhotes do Rio Araguaia e 10,53% para os

filhotes do Rio Javaés. A porcentagem restante pode ser explicada por outros elementos como a múltipla paternidade e a influência genética da mãe nos filhotes, bem como a temperatura de incubação a qual os ovos são submetidos (VALENZUELA, 2000; VALENZUELA, 2001; YNTEMA & MROSOVSKY, 1982).

Os resultados mostram a possibilidade de aplicação da morfometria geométrica em trabalhos de campo, projetos de manejo e estudos ecológicos estimando com relativa segurança a razão sexual dos filhotes recém-eclodidos. Esta extensão, entretanto, apresenta limitações (e.g. separação entre as populações) e cada população deve, inicialmente, ser caracterizada morfológicamente e testada quanto ao dimorfismo sexual. A extensão da função discriminante da relação entre o sexo e a forma da carapaça de uma população para outra se mostrou inviável (LUBIANA & FERREIRA JÚNIOR, 2009). De maneira complementar, sugere-se a ampliação dos estudos utilizando a morfometria geométrica, principalmente para filhotes recém-eclodidos originados em ninhos naturais, avaliando-se a influência que a variação da temperatura exerce na forma da carapaça. Um exemplo para a aplicabilidade do método seria a de montar um banco de dados com as análises de morfometria geométrica, diferenciando as mais diversas populações, desde os filhotes até os adultos. Isto poderia auxiliar, por exemplo, em apreensões de cargas clandestinas, destinadas ao mercado de filhotes de estimação ou de carne, em que, seria possível confrontar os indivíduos apreendidos com as informações do banco de dados e inferir a área de onde os animais seriam provenientes, evitando solturas indesejadas dentro de populações distintas.

CONCLUSÕES

A temperatura pivotal encontrada para *Podocnemis expansa* do Rio Araguaia, estado de Goiás foi de 33 °C e do Rio Javaés, estado do Tocantins, foi de 33,5 °C.

A temperatura de incubação influencia diretamente a duração pivotal da incubação em *P. expansa*. Fêmeas, geradas a temperaturas mais elevadas, possuem um período de incubação mais curto em resposta a um metabolismo mais acelerado. Enquanto machos possuem maior duração de incubação, sendo gerados a temperaturas mais amenas.

A duração pivotal da incubação mostra-se como uma ferramenta eficaz para a determinação da razão sexual em *P. expansa*, porém trabalhos complementares, com maior número amostral e em diferentes populações, tornam-se necessários para a validação do método.

O sucesso de eclosão também está relacionado à temperatura de incubação. Temperaturas extremas, abaixo de 28 °C e acima de 37° C, são letais aos embriões.

O dimorfismo sexual de filhotes de *P. expansa* eclodidos em laboratório é revelado pela morfometria geométrica em ambas as populações dos rios Araguaia e Javaés.

O método da morfometria geométrica não é eficaz para separar populações, porém se mostra eficiente para a sexagem de filhotes recém-eclodidos na natureza sem a utilização de métodos invasivos. Isto o torna aplicável em trabalhos de campo, projetos de manejo e estudos ecológicos estimando com relativa segurança a razão sexual dos filhotes recém eclodidos.

Sugere-se a ampliação do método em filhotes oriundos de ninhos naturais avaliando a influência da temperatura na forma da carapaça e a caracterização morfológica de cada população separadamente.

A análise da morfometria geométrica deve ser mais explorada pelos estudiosos e estendida a outras populações, pois, além de ser um método não invasivo, é barato e de fácil aplicação, muito eficiente e com grande aplicabilidade em planos de manejo e conservação de populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALHO, C.J.R.; DANNI, T.M.S. & PÁDUA, L.F.M. 1984. Influência da temperatura de incubação na determinação do sexo da tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* (Testudinata: Pelomedusidae). **Revista Brasileira de Biologia** 44(3): 305-311.
- ALHO, C.J.R.; DANNI, T.M.S. & PÁDUA, L.F.M. 1985. Temperature-dependent sex determination in *Podocnemis expansa* (Testudinata: Pelomedusidae). **Biotropica** 17: 75-78.
- ALMONACID, J.V.R.; CARR, J.L.; MITTERMEIER, R.A.; MALECHA, J. V.; MAST, R.C.; VOGT, R.C.; RHODIN, A.G.J.; VELASQUEZ, J.O.; RUEDA, J.N. & MITTERMEIER, C. 2007. **Las Tortugas y los Cocodrilianos de los Países Andinos del Tropicó**. 1. ed. Bogotá, D. C. Colômbia: Conservacion Internacional, Colombia. 467 p.
- ARESCO, M. J. 2004. Reproductive ecology of *Pseudemys floridana* and *Trachemys scripta* (Testudines: Emydidae) in Northwestern Florida. **Journal of Herpetology** 38: 249-256.
- BAGER, A.; FREITAS, T.R.O. & KRAUSE, L. 2007. Nesting ecology of a population of *Trachemys dorbignyi* (Emydidae) in Southern Brazil. **Herpetologica** 63(1): 56-65.
- BAPTISTOTTE, C.; SCALFONI, J.T. & MROSOVSKY, N. 1999. Male-producing thermal ecology of a southern loggerhead turtle nesting beach in Brazil: implications for conservation. **Animal Conservation** 2(1): 9-13.
- BINCKLEY, C.A.; SPOTILA, J.R.; WILSON, K.S. & PALADINO, F.V. 1998. Sex determination and sex ratios of Pacific leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*. **Copeia** 1998(2): 291-300.
- BOCK, B.C.; PÁEZ, V.P. & WHITE, M.M. 2001. Genetic population structure of two threatened south american river turtle species, *Podocnemis expansa*

and *Podocnemis unifilis*. **Chelonian Conservation and Biology** 4(1): 47-52.

BOOKSTEIN, F.L. 1991. **Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology**. Cambridge University Press, 435p.

BOONE, J.L. & HOLT, E.A. 2001. Sexing young free-ranging desert tortoises (*Gopherus agassizii*) using external morphology. **Chelonian Conservation and Biology** 4(1): 28-33.

BULL, J.J. 1980. Sex determination in reptiles. **Quarterly Review of Biology** 55(1): 3-21.

BULL, J.J. 1985. Sex ratio and nest temperature in turtles: comparing field and laboratory data. **Ecology** 66(4): 1115-1122.

BULL, J.J. & VOGT, R.V. 1979. Temperature-dependent sex determination in turtles. **Science** 206: 1186-1188.

BULL, J.J. & VOGT, R.C. 1981. Temperature-sensitive periods of sex determination in emydid turtles. **Journal of Experimental Zoology** 218: 435-440.

BULL, J.J.; VOGT, R.C. & MCCOY, C.J. 1982. Sex determining temperatures in turtles: a geographic comparison. **Evolution**: 326-332.

BURKE, V.J.; GREENE, J.L. & GIBBONS, J.W. 1995. The effect of sample size and study duration on metapopulation estimates for slider turtles (*Trachemys scripta*). **Herpetologica** 51: 451-456.

CITES. **Convention on International Trade Endangered Species**. Appendix II. Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/app/index.shtml>>. Acesso em 28 de Outubro de 2009.

CHARNIER, M. 1966. Action de la temperature sur la sex-ratio chez embryon d'*Agama agama* (Agamidae, Lacertilien). **Soc. Biol. Ouest Africa** 160: 620-622.

- CONGDON, J.D.; NAGLE, R.D.; KINNEY, O.M.; OSENTOSKI, M.; AVERY, H.W.; VAN LOBEN, C.R.S. & TINCKLE, D.W. 2000. Nesting ecology and embryo mortality: implications for hatchling success and demography of Blanding's turtles (*Emydoidea Blandingii*). **Chelonian Conservation and Biology** 3(4): 569-579.
- DAVENPORT, J. 1997. Temperature and the life-history strategies of sea turtles. **Journal of Thermal Biology** 22(6): 479-488.
- ERNST, C.H. & BARBOUR, R.W. 1989. **Turtles of the World**. Smithsonian Institution Press, Washington, USA, 313p.
- ESCALONA, T. & FA, J.E. 1998. Survival of nests of terecay turtle (*Podocnemis unifilis*) in the Nichare-Tawadu Rivers, Venezuela. **Journal of Zoology** 244: 303-312.
- EWERT, M.A. & NELSON, C.E. 1991. Sex determination in turtles: diverse patterns and some possible adaptive values. **Copeia** 1991(1): 50-68.
- EWERT, M.A.; JACKSON, D.R. & NELSON, C.E. 1994. Patterns of temperature-dependent sex determination in turtles. **Journal of Experimental Zoology** 270(1): 3-15.
- EWERT, M.A.; ETCHEBERGER, C.R. & NELSON, C.E. 2004. Turtle sex-determination modes and TSD patterns, and some TSD patterns correlates. In: Valenzuela, N.; Lance, V.A. (Eds). **Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates**. Smithsonian Books, Washington. 21-32.
- FERREIRA JÚNIOR, P.D. & CASTRO, P.T.A. 2003. Geological control of *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* nesting areas in Rio Javaés, Bananal Island, Brazil. **Acta Amazônica** 33(3): 445-468.
- FERREIRA JÚNIOR, P.D.; CASTRO, P.T.A.; ADDAD, L.E. & DE LORENZO, M. 2003b Aspectos fisiográficos das áreas de nidificação da tartaruga

marinha *Caretta caretta* na praia da Guanabara, Anchieta, Espírito Santo. **Anais do Instituto Pau Brasil de História Natural** 7(1): 25-40.

GEORGES, A. 1989. Female turtle from hot nests: Is it duration of incubation or proportion of development that matters? **Oecologia** 81: 323-328.

GEORGES, A.; LIMPUS, C. & STOUTJESDIJK, R. 1994. Hatchling sex in the marine turtle *Caretta caretta* is determined by proportion of development at a temperature, not daily duration of exposure. **Journal of Experimental Zoology** 270(3): 432-444.

GEORGES, A.; DOODY, S.; BEGGS, K. & YOUNG, J. 2004. Thermal models of TSD under laboratory and field conditions. *In*: Valenzuela, N.; Lance, V.A. (Eds). **Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates**. Smithsonian Books, Washington. 79-89.

GUIX, J.C.; FEDULLO, D.L. & MOLINA, F.B. 2001. Masculinization of captive females of *Chelonoidis carbonária* (Testudinidae). **Revista Espanhola de Herpetologia** 15: 67-75.

HALLER, E.C.P. 2002. Aspectos da Biologia Reprodutiva de *Podocnemis sextuberculata* (Cornalia, 1849) e *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae) na Região da Reserva Biológica do Rio Trombetas, Pará. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 78p.

HAYS, G. C. 2001. The implications of adult morphology for clutch size in the Flatback Turtle (*Natator depressa*). **Journal of Marine Biology Association U.K.** 81: 1063-1064.

HEWAVISENTHI, S. & PARMENTER, J.C. 2000. Hydric environment and sex determination in the flatback turtle (*Natator depressus Garman*) (Chelonia: Cheloniidae). **Australian Journal of Zoology**. 48(6): 653-659.

HILDEBRAND, V.P.; BERMÚDEZ, N. & PEÑUELA, M.C. 1997. La tortuga Charapa (*Podocnemis expansa*) en el Río Caquetá, Amazonas, Colombia.

Aspectos de su biología Reproductiva y Técnicas para su Manejo.
Disloque Editores, Santafé de Bogotá, Colombia.

IUCN 2009. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2009.1.
Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 28 out 2009.

IVERSON, J.B. 1986. A Checklist with Distribution Maps of the Turtles of the World. Richmond, Indiana.

LANCE, V.A.; VALENZUELA, N. & von HILDEBRAND, H. 1992. A hormonal method to determine the sex of hatchling giant river turtle, *Podocnemis expansa*. Application to endangered species research. **American Zoologist** **32**(16a).

LUBIANA, A. & FERREIRA JÚNIOR, P.D. 2009. Pivotal temperature and sexual dimorphism of *Podocnemis expansa* hatchlings (Testudines: Podocnemididae) from Bananal Island, Brazil. **Zoologia** **26**(3): 527-533.

MALVASIO, A.; SOUZA, A.M.; REIS, E.S. & FARIAS, E.C. 2002. Morfologia dos órgãos reprodutores de recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae). **Publicações Avulsas do Instituto Pau Brasil de História Natural** **5**: 27-37. São Paulo.

MARCOVALDI, M.A., GODFREY, M.H. & MROSOVSKY, N. 1997. Estimating sex ratios of loggerhead turtles in Brazil from pivotal incubation durations. **Canadian Journal of Zoology** **75**: 755-770.

MICHEL-MORFIN, J.E.; GÓMEZ MUÑOZ, V.M. & RODRÍGUEZ, C.N. 2001. Morphometric model for sex assessment in hatchling olive Ridley Sea Turtles. **Chelonian Conservation Biology** **4**: 53–58.

MROSOVSKY, N.; DUTTON, P.H. & WHITMORE, C.P. 1984. Sex ratio of two species of sea turtle nesting in Suriname. **Canadian Journal of Biology** **62**(11): 2227-2239.

- MROSOVSKY, N. 1988. Pivotal temperatures for loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from northern and southern nesting beaches. **Canadian Journal of Zoology** **66**(3): 661-669.
- MROSOVSKY, N. & PIEAU, C. 1991. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. **Amphibia-Reptilia** **12**: 169-179.
- MROSOVSKY, N. 1994. Sex ratios of sea turtles. **The Journal of Experimental Zoology** **270**: 16-27.
- MROSOVSKY, N.; BAPTISTOTTE, C. & GODFREY, M.H. 1999. Validation of incubation duration as an index of the sex ratio of hatchling sea turtles. **Canadian Journal of Zoology** **77**: 831-835.
- MYERS, E.M.; JANZEN, F.J.; ADAMS, D.C. & TUCKER, J.K. 2006. Quantitative genetics of plastron shape in slider turtles (*Trachemys scripta*). **Evolution** **60**(3): 563-572.
- PÁEZ, V.P.; RESTREPO, A.; VARGAS-RAMIREZ, M. & BOCK, B.C. 2009. *Podocnemis lewyana* Duméril 1852 – Magdalena River Turtle. **Chelonian Research Monographs. Conservation Biology of Fresh Water Turtles and Tortoises** **5**(1): 1-6.
- PEARSE, D.E.; ARNDT, A.D.; VALENZUELA, N.; MILLER, B.A.; CANTARELLI, V. & SITES JR, J.W. 2006. Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). **Molecular Ecology** **15**: 985-1006.
- PEZZUTI, J.C.B. & VOGT, R. 1999. Nesting ecology of *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Pelomedusidae) in the Japurá River, Amazonas, Brazil. **Chelonian. Conservation and Biology** **3**(3): 419-424.
- PIEAU, C. 1982. Modalities of the action of temperature on sexual differentiation in field developing embryos of the European pond turtle

- Emys orbicularis* (Emydidae). **Journal of Experimental Zoology** **220**: 353-360.
- PIEU, C. 1996. Temperature variation and sex determination in reptiles. **BioEssays** **18**(1): 19-26.
- PRITCHARD, P.C.H. & TREBBAU, P. 1984. **The Turtles of Venezuela**. Caracas. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 403p.
- ROHLF, F. J. **TpsUtil for Windows version 1.38**. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook. 2005. Disponível em: < <http://life.bio.sunysb.edu/morph/> > Acesso em: 28 dez. 2006.
- ROHLF, F. J. **TpsDig2 for Windows version 2.10**. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook. 2006a. Disponível em: < <http://life.bio.sunysb.edu/morph/> > Acesso em: 28 dez. 2006.
- ROHLF, F. J. **TpsRelw for Windows version 1.44**. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook. 2006b. Disponível em: < <http://life.bio.sunysb.edu/morph/> > Acesso em: 28 dez. 2006.
- SITES JÚNIOR, J.W.; FITZSIMMONS, N.N.; SILVA JÚNIOR, N.J. & CANTARELLI, V.H. 1999. Conservation genetics of the giant amazon river turtle (*Podocnemis expansa*; Pelomedusidae) – inferences from two classes of molecular markers. **Chelonian Conservation and Biology** **3**(3): 454-463.
- SOUZA, R.R. & VOGT, R.C. 1994. Incubation temperature influences sex and hatchling size in the neotropical turtle *Podocnemis unifilis*. **Journal of Herpetology** **28**(4): 453-464.
- STANDING, K.L.; HERMAN, T.B. & MORRISON, I.P. 1999. Nesting ecology of Blanding's turtle (*Emydoidea blandingi*) in Nova Scotia, the northeastern limit of the species' range. **Canadian Journal of Zoology** **77**(10): 1609-1614.

- TUCKER, J.K. & PAUKSTIS, G.L.. 1999. Post-hatching strate moisture and overwintering hatchling turtles. **Canadian Journal of Zoology** **33**: 608-615.
- VALENZUELA, N.; BOTERO, R. & MARTINEZ, E. 1997. Field study of sex determination in *Podocnemis expansa* from Colombian Amazonia. **Herpetologica** **53**(3): 390-398.
- VALENZUELA, N. 1999. Temperature-dependent sex determination and ecologic genetics of the Amazonian river turtle *Podocnemis expansa*. **Tese de Doutorado**.
- VALENZUELA, N. 2000. Multiple paternity in side-neck turtles *Podocnemis expansa*: evidence from microsatellite DNA data. **Molecular Ecology** **9**: 99-105.
- VALENZUELA, N. 2001a. Genetic differentiation among nesting beaches in the highly migratory Giant River Turtle (*Podocnemis expansa*) from Colombia. **Herpetologica** **57**(1): 48-57.
- VALENZUELA, N. 2001b. Maternal effects on life-history traits in the Amazon Giant River Turtle *Podocnemis expansa*. **Journal of Herpetology** **35**(3): 368-378.
- VALENZUELA, N. 2001c. Constant, shift, and natural temperatures effects on sex determination in *Podocnemis expansa* turtles. **Ecology** **82**(11): 3010-3024.
- VALENZUELA, N.; ADAMS, D.C. & JANZEN, F.J. 2003. Pattern does not equal process: exactly when is sex environmentally determined? **Amazon Nature** **161**: 676-683.
- VALENZUELA, N. & LANCE, V.A. 2004. **Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates**. Smithsonian Books, Washington, 194p.
- VALENZUELA, N.; ADAMS, D.C.; BOWDEN, R.M. & GAUGER, A.C. 2004. Geometric morphometric sex estimation for hatchling turtles: A powerful

- alternative for detecting subtle sexual shape dimorphism. **Copeia** **2004**(4): 735-742.
- VOGT, R.C. & BULL, J.J. 1982. Genetic sex determination in the spiny softshell *Trionyx spiniferus* (Testudines: Trionychidae). **Copeia** **1982**(3): 699-700.
- VOGT, R.C. & FLORES-VILLELA, O.A. 1986. Determinación del sexo em tortugas por la temperatura de incubación de los huevos. **Ciencia** **37**: 21-32.
- VOGT, R.C. 1994. Temperature controlled sex determination as a tool for turtle conservation. **Chelonian Conservation and Biology** **1**(2): 159-162.
- VOGT, R.C. 2008. **Tartarugas da Amazônia**. Lima, Peru, 104p.
- WIBBELS, T.; ROSTAL, D. & BYLES, R. 1998. High pivotal temperature in the sex determination of olive ridley sea turtle, *Lepidochelys olivacea*, from Playa Nancite, Costa Rica. **Copeia** **1998**(4): 1086-1088.
- WYNEKEN, J.; ETTERLY, S.P.; CROWDER, L.B.; VAUGHAN, J. & ESTER, K.B. 2007. Determining sex in posthatchling logghead sea turtles using multiple gonadal accessory duct characteristics. **Herpetologica** **63**(1): 19-30.
- YNTEMA, C.L. 1979. Temperature levels and periods of sex determination during incubation of eggs of *Chelydra serpentina*. **Journal of Morphology** **1979**(159): 17-28.
- YNTEMA, C.L. & MROSOVSKY, N. 1982. Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead turtles. **Canadian Journal of Zoology** **60**: 1012-1016.
- ZAR, J.H. 2008. **Biostatistical Analysis**. 5th Edition. New Jersey, Prentice Hall.