

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

Que influência tem a localização do ninho na proporção de sexos da espécie tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), na ilha de Poilão, Guiné-Bissau?

Ana Margarida Catarino Marques

Dissertação

Mestrado em Biologia da Conservação

2014

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal



Que influência tem a localização do ninho na proporção de sexos da espécie tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), na ilha de Poilão, Guiné-Bissau?

Ana Margarida Catarino Marques

Dissertação

Mestrado em Biologia da Conservação

Orientadores:

Doutor Rui Rebelo (FCUL)

Doutor Paulo Catry (ISPA - Instituto Universitário)

2014

Este trabalho foi realizado no âmbito do Projecto “*La recherche participative au service de la conservation de la biodiversité du Parc National Marin de João Vieira-Poilão (Archipel des Bijagós)*”, financiado pela Fundação MAVA – *Fondation pour la Nature*. O trabalho e a recolha de amostras biológicas decorreram sob autorização do Instituto da Biodiversidade e das Áreas Protegidas da Guiné-Bissau (IBAP).



Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no âmbito do Projecto “*La recherche participative au service de la conservation de la biodiversité du Parc National Marin de João Vieira-Poilão (Archipel des Bijagós)*”, financiado pela Fundação MAVA – *Fondation pour la Nature* e implementado pelo Instituto da Biodiversidade e das Áreas Protegidas da Guiné-Bissau (IBAP).

Agradeço ao IBAP, através do seu Director, Dr. Alfredo Simão da Silva, que autorizou as estadias em Poilão e à Dra. Aissa Regalla que permitiu a recolha e transporte do material biológico para Portugal, bem como por todo o seu inestimável trabalho no apoio organizacional e logístico.

Ao Director do Parque Nacional Marinho João Vieira e Poilão (PNMJVP), Dr. Quintino Tchantchalam, que autorizou o sacrifício dos recém-eclodidos de tartaruga-verde. Agradeço a extrema hospitalidade, preciosa cooperação e momentos de alegria que as equipas de campo me proporcionaram ao longo da estadia em Poilão. Aos técnicos: Castro Barbosa e Tozé Pires; aos guardas: César Banca, João Pereira (Preto) e Paulino e ao pessoal de apoio: Carlos, Beto, Sana, Correia e Seni. Por causa deles, foi mais fácil lidar com o trabalho de campo. Pela tentativa de me ensinarem crioulo e por me mostrarem um pedacinho da cultura e costumes da Guiné-Bissau e do fascinante povo Bijagó. Finalmente, por intensificarem a minha paixão pela conservação. Graças a tudo isto vou querer voltar!

Agradeço à Rita Patrício que me ajudou na recolha dos dados e foi a minha companheira de aventuras em Poilão, fazendo com que as saudades de casa fossem menos sentidas. A tudo o que me ensinou e aos preciosos conselhos para a realização deste trabalho.

Ao Professor Leonel Gordo, ao qual agradeço a simpatia por ter disponibilizado o laboratório para a obtenção dos cortes histológicos. Agradeço também à equipa deste laboratório pelo acolhimento e valioso apoio no trabalho laboratorial.

Aos meus orientadores, Professores Rui Rebelo e Paulo Catry, por estarem sempre presentes, pelo apoio incansável, pelas críticas e sugestões dadas ao longo de todo este percurso.

Ao meu namorado, pelo apoio incondicional, compreensão e pela força nos momentos de maior stress.

E por último, à minha família e aos meus amigos por acreditarem em mim e me apoiarem em todas as situações. Também por me distraírem e não me deixarem colapsar mentalmente!

Resumo

O sexo das tartarugas marinhas é determinado pela temperatura de incubação. Estes animais possuem um padrão “macho-fêmea”, onde temperaturas de incubação mais baixas produzem machos e temperaturas mais altas produzem fêmeas. A temperatura pivotal produz uma proporção equilibrada entre os sexos e varia entre espécies e entre populações da mesma espécie. As praias de nidificação podem apresentar várias zonas térmicas que podem assim influenciar o *sex-ratio* das posturas. As crias recém-eclodidas de tartarugas marinhas não possuem características externas que possam ser usadas para a identificação do sexo, sendo o método de sexagem mais preciso a identificação histológica das gónadas, que obriga ao sacrifício das crias ou à recolha de indivíduos mortos nas praias.

O estudo decorreu na ilha de Poilão (10°52'N, 15°43'W), Guiné-Bissau, entre 18 de Agosto e 22 de Novembro de 2013 e teve como principal objectivo determinar a influência da localização do ninho (exposto, na floresta e na transição entre os dois habitats) no *sex-ratio* das posturas de tartaruga-verde (*Chelonia mydas*). Foram monitorizadas as temperaturas de incubação de 45 ninhos, através de registadores automáticos de temperatura (*data loggers*) e determinados os sexos das crias ($4,86 \pm 0,58$ por ninho) através da análise histológica das gónadas. Também foi estimada a proporção de sexos entre as crias que nascem em toda a ilha, através da análise histológica das gónadas dos recém-eclodidos recolhidos e mortos por diferentes causas naturais. Para todos os ninhos foram ainda estimados os seguintes parâmetros reprodutores: período de incubação, dias na areia, tamanho da postura, sucesso de eclosão, sucesso de emergência e profundidade do ninho.

O período de incubação variou consoante o local do ninho, sendo mais longo em zonas de floresta. As crias que nasceram em ninhos de zonas expostas foram maioritariamente fêmeas, sendo que na maioria destes ninhos (67%) encontrámos apenas fêmeas. Em 71% dos ninhos da floresta foram encontrados apenas machos. Em Poilão o local do ninho tem influência no *sex-ratio* da população de *C. mydas*, uma vez que a produção de machos depende do ensombramento proporcionado pelas zonas de floresta.

Com o aquecimento global previsto no futuro, a conservação da floresta litoral terá uma elevada importância para o equilíbrio dos sexos destas populações.

Palavras-chave: Temperatura de incubação; *Sex-ratio*; Guiné-Bissau; Floresta; *Chelonia mydas*.

Abstract

The sex of turtles is determined by the incubation temperature. These animals have a “male-female” pattern in such a way that lower incubation temperatures produce males while higher temperatures produce females. The pivotal temperature produces a balanced sex-ratio. This temperature varies among species and among populations of the same species. Nesting beaches may have several zones with different temperatures each, thus producing different sex-ratios. Hatchlings of sea turtle do not have external features that can be used to identify its gender. The most accurate method of sexing is by histological identification of the gonads, which requires euthanizing or collecting individuals killed on the beaches.

The study took place on the island of Poilão (10°52'N, 15°43'W), Guinea-Bissau, between 18th August and 22nd November 2013, with the main goal of determining the influence of the location of the nest (in areas exposed to the sun, sheltered in the forest or in the transition between the two habitats) on the sex-ratio of the clutches of Green Turtle (*Chelonia mydas*). Incubation temperatures of 45 nests were monitored by loggers and the sex of the offspring of these nests was determined by histological analysis of the gonads (4.86 ± 0.58 hatchlings per nest). The proportion of sexes of the turtles that hatch throughout the whole island was also estimated by histological analysis of the gonads of hatchlings that were killed by various natural causes. Several breeding parameters were also estimated for all the nests: incubation period, days in sand (from hatching until emergence), clutch size, hatching success, emergence success and depth of the nest.

The incubation period varied depending on the location of the nest, being longer in forest areas. Hatchlings from nests in exposed areas were mostly females. In the majority of these nests (67%), only females were found. On the contrary, only males were found in 71% of the nests on the forest. In Poilão, nesting sites have a strong influence in the sex-ratio of the clutches of *C. mydas*, since the production of males is strongly dependent on the shadow provided by the forest areas.

Considering the current global warming, conservation of coastal forest will have a high importance for the balance of sexes of this turtle population.

Key-words: Incubation temperature; Sex-ratio; Guinea-Bissau; Forest; *Chelonia mydas*.

Índice

Introdução.....	9
Previsão do <i>sex-ratio</i> através de métodos directos.....	11
Previsão do <i>sex-ratio</i> através de métodos indirectos.....	12
Influência da localização do ninho no <i>sex-ratio</i>	13
Impactos do aquecimento global nas tartarugas marinhas.....	14
Tartaruga-verde, <i>Chelonia mydas</i>	15
Metodologia.....	19
Área de estudo.....	19
Métodos de campo.....	22
Monitorização das actividades de nidificação da tartaruga-verde.....	22
Seleccção dos ninhos.....	22
Registo das temperaturas dos ninhos.....	22
Monitorização dos ninhos.....	23
Parâmetros reprodutores.....	24
Amostragem de tartarugas sacrificadas nos ninhos monitorizados.....	25
Recolha de tartarugas mortas por causas aleatórias.....	26
Obtenção das gónadas.....	26
Trabalho laboratorial.....	26
Elaboração das preparações histológicas das gónadas.....	26
Identificação do sexo.....	27
Análise estatística.....	27
Resultados.....	32
Discussão.....	45
Referências bibliográficas.....	52
Anexos.....	60

Introdução

As tartarugas marinhas são um dos grupos animais mais ameaçados a nível mundial, visto que actualmente todas as espécies têm um estatuto de conservação desfavorável. As principais causas para o declínio destas espécies são: o consumo de adultos e dos ovos pelos seres humanos, a pesca acidental (*bycatch*), a poluição das praias e oceanos, a alteração e redução das praias de nidificação e as alterações climáticas (Broderick *et al.* 2006; Hamann *et al.* 2010). Uma das principais estratégias de conservação direcionada às tartarugas marinhas tem sido a protecção das praias de nidificação, visto que entre as acções possíveis é uma das mais praticáveis e com mais visibilidade para o público. Estas estratégias têm especial importância em países tropicais e subtropicais, uma vez que a maioria das espécies de tartarugas marinhas nidificam nestas regiões e todas apresentam grande fidelidade para os locais de nidificação e de alimentação (Limpus & Miller 1993; Arthur *et al.* 2008).

A determinação do sexo pela temperatura de incubação (TSD - Temperature-dependent Sex Determination) foi descrita pela primeira vez numa espécie de lagarto por Charnier (1966). Desde então, já foi reportada numa grande variedade de répteis, incluindo todos os crocodilos, a maioria das tartarugas, alguns lagartos e a tuatara (*Sphenodon* spp.) (Raynaud & Pieau 1985; Cree *et al.* 1995). Nas tartarugas marinhas, a TSD foi descrita pela primeira vez em tartaruga-comum, *Caretta caretta* (Yntema & Mrosovsky 1980). Desde então, já foi descrita para todas as espécies de tartarugas marinhas actuais (Wibbels 2003). A ocorrência de TSD em grupos primitivos de répteis como as tartarugas levou alguns investigadores a afirmar que a TSD é uma forma ancestral de determinação do sexo, e que os sistemas de determinação do sexo das aves e mamíferos se desenvolveram a partir deste (Marshall & Shetty 2001). A TSD tem o potencial de gerar uma grande variedade de *sex-ratios* (Wibbels 2003), mas as vantagens evolutivas deste potencial não são completamente claras, apesar de existirem várias hipóteses para a sua manutenção em muitas espécies de répteis (Girondot & Pieau 1999). Warner & Shine (2008) mostraram experimentalmente que a TSD é favorecida pela selecção natural, pois a temperatura de incubação afecta diferentemente a *fitness* de cada sexo. Apesar da grande variedade de répteis com TSD, o efeito de uma determinada temperatura pode variar dependendo da espécie (Ewert *et al.* 1994). Já foram documentados diferentes padrões de determinação do sexo e, no caso das tartarugas marinhas, todas apresentam o padrão “macho-fêmea” (MF), no qual temperaturas de incubação mais baixas produzem machos e temperaturas mais altas produzem fêmeas (Yntema & Mrosovsky 1980; Godfrey *et al.* 1999; Broderick *et al.* 2000; Godley *et al.* 2002).

A gama de transição de temperaturas (TRT - Transitional Range of Temperatures) é o intervalo de temperaturas onde o *sex-ratio* muda de 100% machos para 100% fêmeas ou vice-versa. No caso do padrão MF das tartarugas marinhas, temperaturas acima do TRT produzirão só fêmeas e temperaturas abaixo do TRT produzirão só machos (Eckert *et al.* 1999; Wibbels 2003). O TRT pode variar entre 1 a 3 °C, dependendo da espécie e população (Wibbels 2003). Sensivelmente a meio do TRT há uma temperatura referida como a temperatura pivotal, à qual é produzida uma proporção equilibrada dos dois sexos. Esta temperatura pode variar entre espécies e entre populações da mesma espécie (Mrosovsky 1994), tal como o TRT (Chevalier *et al.* 1999). Em geral, as temperaturas pivotais estimadas para tartarugas marinhas correspondem a um intervalo estreito, de aproximadamente 27,7 °C e 31 °C, dependendo da espécie e do estudo, mas a maioria situa-se entre 29 - 30 °C (Mrosovsky 1994; Wibbels *et al.* 1998; Godley *et al.* 2002). Estas temperaturas foram geralmente estimadas a partir da incubação em laboratório de ovos mantidos sob diferentes temperaturas constantes, não sujeitos por isso às variações diárias e sazonais das temperaturas que ocorrem no ambiente natural (Georges *et al.* 1994).

Nas espécies com TSD, as mudanças de temperatura afectam a determinação do sexo apenas durante um certo período da incubação. O período termo-sensível (TSP - Thermosensitive Period) foi definido como o intervalo de tempo em que qualquer tipo de variação de temperatura mostra ter algum efeito significativo na proporção entre os dois sexos (Merchant-Larios *et al.* 1997). Nas tartarugas marinhas foi demonstrado que o TSP decorre durante o segundo terço do período de incubação; depois deste período, a determinação do sexo é irreversível (Yntema & Mrosovsky 1982).

Existem vários factores que afectam a temperatura de incubação e por conseguinte o *sex-ratio* das tartarugas marinhas: a latitude, a variação sazonal das temperaturas, o ensombramento dos ninhos, a cor da areia, a humidade e a profundidade a que a postura se encontra (Broderick *et al.* 2000; Hays *et al.* 2001; Godley *et al.* 2002; Houghton *et al.* 2007; Fuentes *et al.* 2010). O tamanho da postura também pode afectar a temperatura de incubação, porque o calor produzido pelo metabolismo dos embriões em desenvolvimento faz com que as temperaturas do interior da postura e de todo o ninho sejam diferentes das da areia envolvente (Yntema & Mrosovsky 1980; Godfrey *et al.* 1997). Assim, quanto maior a quantidade de embriões em desenvolvimento, maior será o efeito do calor metabólico (Zbinden *et al.* 2006). Este aquecimento tem geralmente início durante o período termo-sensível, tendo então elevada influência no *sex-ratio* (Godfrey *et al.* 1997). O consumo de oxigénio e a produção de calor metabólico ao longo do tempo têm no entanto um padrão de variação sigmóide, atingindo o máximo na eclosão (Matsuzawa *et al.* 2002).

Previsão do *sex-ratio* através de métodos directos

A laparoscopia é um método de sexagem que consiste na identificação das características externas das gónadas através de uma sonda (laparoscópio); esta técnica só funciona em juvenis, quando a gónada já está bem diferenciada e é uma técnica difícil de executar no terreno (Chaloupka & Limpus 2005).

As crias recém-eclodidas de tartarugas marinhas não possuem características externas que possam ser usadas para a identificação do sexo (Bull 1980). O aspecto das gónadas das crias de tartarugas marinhas depende do tempo que estes animais levam a eclodir e a emergir à superfície da areia e estas aparecem como uma estrutura esbranquiçada e alargada na superfície ventral do rim (ver Anexos - Figura 1). Alguns investigadores sugeriram que esta morfologia externa da gónada seria suficiente para a identificação do sexo do animal (McCoy *et al.* 1983; Wibbels *et al.* 1998); no entanto estudos mais recentes refutaram esta hipótese (Mrosofsky & Benabib 1990; Mrosofsky & Godfrey 1995).

O método de sexagem mais preciso continua a ser a dissecação das gónadas e posterior identificação histológica (Mrosofsky & Benabib 1990; Mrosofsky & Godfrey 1995). Nos cortes histológicos já são visíveis as diferenças entre as gónadas (Miller & Limpus 1981). No ovário o córtex é bem desenvolvido e diferenciado em células de forma colunar espaçadas, com células germinais perto da membrana basal. A medula é densa, mal organizada e não possui túbulos com lúmen aberto. No testículo, o córtex é quase inexistente, aparecendo como células escamosas posicionadas próximas da túnica albugínea. A medula é organizada e preenchida com túbulos seminíferos com células germinais situadas perto da membrana interna (Miller & Limpus 2002). Para além da gónada, os ductos paramesonéfricos também podem ser usados para a distinção entre os sexos (Ceriani & Wyneken 2008). O ducto das fêmeas (futuro oviducto) é recto e corre ao longo da parte posterior do rim. Em secção transversal histológica, o lúmen deste ducto é aberto e forrado com células colunares que assentam numa membrana basal distinta. O mesentério suspenso é longo e fino. Pelo contrário, na maioria dos machos o ducto praticamente perdeu o seu lúmen, uma vez que as células começam a degradar-se ainda durante a incubação. As células deste ducto são, assim, densas e desorganizadas e a ligação ao rim é curta e larga (Eckert *et al.* 1999; Miller & Limpus 2002). Apesar do método histológico ser o mais preciso para a determinação do sexo em tartarugas marinhas, não é infalível na identificação do sexo nos casos anormais, como a existência de gónadas intersexo (com características de ambos os sexos). Este método obriga ainda ao sacrifício das crias ou à recolha de indivíduos mortos nos

ninhos ou nas praias (Godley *et al.* 2002; Kaska *et al.* 2006). O método histológico também é utilizado para a calibração dos métodos indirectos (Mrosovsky & Benabib 1990; Wibbels 2003).

A viabilidade de uma técnica de sexagem eficaz e não letal iria aumentar a capacidade de previsão do *sex-ratio* nas populações de tartarugas marinhas, principalmente nas mais ameaçadas. Foram propostos métodos menos invasivos que os anteriores, como a análise dos níveis de hormonas sexuais no sangue (Owens *et al.* 1978) ou no líquido amniótico (Gross *et al.* 1995). No entanto estas técnicas são dispendiosas e apenas resultam em crias mais velhas, devido à elevada quantidade de material biológico necessário (Gross *et al.* 1995).

Previsão do *sex-ratio* através de métodos indirectos

Para estimar o *sex-ratio* de populações de tartarugas marinhas, a dificuldade na sexagem dos indivíduos e o dilema ético associado ao sacrifício das crias levou ao desenvolvimento de uma variedade de métodos indirectos. Os métodos mais utilizados são: a medição da temperatura da areia (Glen & Mrosovsky 2004; Hawkes *et al.* 2007), a estimativa do período de incubação (Marcovaldi *et al.* 1997; Zbinden *et al.* 2007) e a medição da temperatura de incubação (Broderick *et al.* 2000; Godley *et al.* 2001). No entanto, numa fase inicial estes métodos também requerem o sacrifício de crias para a obtenção de uma estimativa das temperaturas pivotais e TRTs específicos das praias. Se estes parâmetros forem conhecidos para a população de tartarugas marinhas em estudo, a previsão do *sex-ratio* dessa população com base nos métodos indirectos é mais robusta (Wibbels 2003).

A temperatura da areia está sujeita a variações sazonais e diárias (Limpus *et al.* 1983), determinadas por eventos mais ou menos previsíveis, como por exemplo a precipitação, que diminui a temperatura, principalmente em regiões tropicais (Houghton *et al.* 2007). A medição da temperatura da areia não é o método mais correcto para estimar o *sex-ratio*, uma vez que o registo desta temperatura não corresponde exactamente ao que se passa no interior dos ninhos, não registando a influencia dos factores abióticos como a humidade, profundidade, entre outros, ou do tamanho da postura. Por outro lado, há uma variação térmica importante entre as diferentes zonas das praias (Marcovaldi *et al.* 1997). Para a estimativa do *sex-ratio* com base nas temperaturas da areia, os termómetros devem ser colocados o mais próximo possível dos ninhos para reduzir a diferença entre as temperaturas registadas e as de incubação.

Para além dos efeitos na determinação do sexo, o aumento da temperatura da areia também acelera o desenvolvimento embrionário das crias e reduz o período de incubação dos ovos.

Ninhos mais quentes tipicamente incubam mais rápido e produzem mais fêmeas, enquanto ninhos menos quentes têm um período de incubação mais longo e produzem mais machos (Limpus *et al.* 1983; Godfrey *et al.* 1999; Broderick *et al.* 2000). A duração de incubação é assim também usada para estimar o *sex-ratio* dos recém-eclodidos, e o período de incubação pivotal que produz um *sex-ratio* equilibrado pode ser calculado (Marcovaldi *et al.* 1997; Mrosovsky *et al.* 1999). O método mais utilizado para estimar o *sex-ratio* através do período de incubação foi proposto por Marcovaldi *et al.* (1997), e consiste numa função calculada a partir de posturas incubadas a diferentes temperaturas em laboratório e que relaciona o período de incubação dos ovos com o *sex-ratio*. Actualmente esta função tem em conta o intervalo de dias adicional entre a eclosão e a emergência dos recém-eclodidos que ocorre na natureza (Mrosovsky *et al.* 1999). No entanto, este intervalo é variável e difícil de calcular com precisão na natureza.

A forma mais fidedigna de estimar indirectamente o *sex-ratio* das posturas de tartarugas marinhas é através do registo das temperaturas de incubação no interior dos ninhos. Estas já incluem o acréscimo provocado pelo calor metabólico produzido pelos embriões (proporcional ao tamanho da postura) e a influência da profundidade, ensombramento, tipo da areia e variações diárias e sazonais (exemplo, precipitação) nestas temperaturas (Mrosovsky 1994; Godfrey *et al.* 1997; Broderick *et al.* 2000; Wibbels 2003). Para o registo das temperaturas de incubação e da areia são utilizados registadores automáticos de temperatura (*data loggers*).

A variação da temperatura pivotal entre diferentes áreas geográficas pode também complicar as estimativas do *sex-ratio* com base nos métodos indirectos (Mrosovsky 1988).

Influência da localização do ninho no *sex-ratio*

As praias de nidificação podem apresentar várias zonas térmicas (zonas de vegetação, expostas ao sol, entre outras) que podem influenciar o *sex-ratio* das posturas, pois as temperaturas da areia variam com a proximidade à linha de maré, floresta, etc (Mrosovsky & Provancha 1992). O local da postura influencia também o ambiente hídrico e térmico dos ninhos, afectando as trocas gasosas entre a câmara de ovos e o exterior (Ackerman 1980), o calor metabólico (Broderick *et al.* 2001) e a taxa de predação (Spencer 2002).

Na selecção do local do ninho, as tartarugas marinhas tendem a preferir zonas específicas da praia (Whitmore & Dutton 1985; Hays *et al.* 1995; Dobbs *et al.* 1999), embora não se saiba ao certo o que determina essa selecção (Wood *et al.* 2000), que pode variar entre espécies e dentro da mesma espécie (Mortimer 1990). Por exemplo, as posturas de tartarugas verdes *C. mydas*

ocorrem maioritariamente em zonas acima da linha de maré alta e com vegetação herbácea (Wang & Cheng 1999), sendo o sucesso de eclosão maior nestas zonas (Turkozan *et al.* 2011). As características do habitat e o microambiente dos ninhos têm influência no desenvolvimento, sucesso de eclosão, sucesso de emergência e *sex-ratio* dos recém-eclodidos (Yntema & Mrosovsky 1980; Weisrock & Janzen 1999; Wibbels 2003). Os sucessos de emergência e de eclosão dependem da interação de vários factores abióticos e bióticos e variam entre espécies e populações de tartarugas marinhas (Hirth 1980). Em climas tropicais quentes, ninhos completamente expostos ao sol têm temperaturas de incubação próximas dos limites letais, resultando num sucesso de eclosão baixo e numa produção desequilibrada no sentido das fêmeas (Tiwol & Cabanban 2000). Em geral, ninhos colocados em zonas de vegetação densa terão temperaturas mais baixas e produzirão mais machos que ninhos em zonas abertas (Spotila *et al.* 1987). Dependendo da praia escolhida por *C. mydas* para nidificar na ilha Heron, na Austrália, a proporção de fêmeas pode variar entre 30 a 63% (Limpus *et al.* 1985). Uma situação semelhante ocorre na ilha de Ascensão, com praias que podem atingir diferenças térmicas de 2,6 °C (Hays *et al.* 1999).

Impactos do aquecimento global nas tartarugas marinhas

Entre todas as praias onde o *sex-ratio* das crias de tartarugas marinhas foi avaliado nota-se uma predominância das que produzem *sex-ratios* desequilibrados no sentido das fêmeas (Kaska *et al.* 1998; Broderick *et al.* 2000; Godley *et al.* 2001), com algumas tendências extremas, como por exemplo *C. caretta* na Florida com uma proporção de fêmeas maior que 93% (Hanson *et al.* 1998). Para nenhuma população de tartarugas marinhas está descrito um *sex-ratio* desequilibrado no sentido dos machos (Wibbels 2003).

O aquecimento global em curso pode vir a contribuir para um declínio acentuado das populações de tartarugas marinhas, uma vez que pode provocar alterações nas fontes de alimento e nutrientes disponíveis, nos habitats de alimentação e nidificação, assim como na reprodução e no *sex-ratio* destes animais (Hawkes *et al.* 2009). Este desequilíbrio já se começa a verificar actualmente, com poucos sítios chave com condições ideais para a produção de machos (Kaska *et al.* 2006). Este desequilíbrio na proporção dos sexos irá aumentar se as temperaturas continuarem a subir (Zbinden *et al.* 2007; Fuentes *et al.* 2010). Contudo, os desvios para o sexo feminino são uma ameaça menor em relação ao que acontece com espécies onde os desvios se processam no sentido dos machos, como alguns crocodilos e a tuatara. Alguns modelos mostram que a taxa intrínseca de crescimento demográfico pode até ser

reforçada se os desvios do *sex-ratio* forem no sentido da produção de mais fêmeas, e alguns investigadores têm até sugerido que os *sex-ratios* das populações ameaçadas deveriam ser manipulados artificialmente para produzir um desvio para a produção de fêmeas (Mitchell *et al.* 2010).

Tartaruga-verde, *Chelonia mydas*

A espécie alvo deste estudo, a tartaruga-verde (*Chelonia mydas*, Linnaeus 1758) está ameaçada mundialmente, encontrando-se classificada como “em perigo de extinção” pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN 2012) e listada no anexo I da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da fauna e flora Selvagens Ameaçadas de Extinção (CITES) (Seminoff 2004). As estimativas mais recentes apontam para uma redução a nível global de 48% a 67% das populações de *C. mydas* ao longo das três últimas gerações (~130 anos) (Seminoff 2004). O declínio das populações de tartaruga-verde deve-se principalmente à sobreexploração dos seus ovos e da sua carne, à morte acidental relacionada com a pesca e à degradação do seu habitat marinho e de nidificação (Chaloupka *et al.* 2008; Varghese *et al.* 2010).

Tal como para outras espécies de tartarugas marinhas, a atribuição deste estatuto está longe de ser consensual, visto que muitas das maiores populações nidificantes de *C. mydas* do Atlântico têm aumentado nos últimos 20 - 30 anos (Broderick *et al.* 2006). Na verdade, a tartaruga-verde tem uma distribuição global muito ampla, ocorrendo em águas tropicais e subtropicais dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico (Seminoff 2004). Algumas populações contam com milhares de indivíduos reprodutores, como a de Tortuguero, na Costa Rica (Bjorndal *et al.* 1999) e a da Ilha de Ascensão, no Reino Unido (Godley *et al.* 2001). Na Guiné-Bissau, esta espécie de tartaruga marinha é a mais abundante, mas a maior parte da população concentra-se num único local, na ilha de Poilão (Catry *et al.* 2009).

A tartaruga-verde possui uma cabeça pequena e redonda, com um par de escamas pré-frontais, enquanto a maioria das espécies possuem dois pares. A carapaça possui quatro pares de placas laterais justapostas e pode chegar a medir mais de 130 cm de comprimento (Pritchard 1999). Em *C. mydas* a coloração da carapaça é muito variável, podendo alterar-se com o tempo. As crias são brancas ventralmente e pretas dorsalmente. Os juvenis e adultos têm carapaças que variam do verde-cinza a uma mistura entre preto e castanho (Wyneken & Witherington 2001). É a segunda maior tartaruga marinha actualmente existente, depois da tartaruga-de-couro

(*Dermochelys coriacea*, Vandelli 1761), apesar do tamanho ser bastante variável de umas populações para outras. Em média, o peso dos animais adultos varia entre 70 e 250 kg (Catry *et al.* 2010).

Em *C. mydas* a variabilidade interpopulacional das temperaturas pivotais ronda os 2 °C (Godfrey 1997). Até à data existem poucos estudos com a estimação da pivotal para esta espécie (Tabela 1). O período de incubação na ilha de Ascensão e Chipre para *C. mydas* é ≥ 56 dias (Broderick *et al.* 2000; Godley *et al.* 2002). Em relação ao calor metabólico em Ascensão para *C. mydas*, em média este factor aumenta a temperatura do ninho entre 0,07 - 2,86 °C em todo o período de incubação e em 0,07 - 2,61 °C no período termo-sensível (Broderick *et al.* 2001).

Tabela 1. Valores das temperaturas pivotais para várias populações de *C. mydas*. Adaptado de Godfrey & Mrosovsky (2006).

População	Temperatura pivotal °C	Referência
Estudos em laboratório		
Suriname (1983)	28,8	Mrosovsky <i>et al.</i> 1984
Suriname (1983 & 1995)	29,2	Godfrey & Mrosovsky 2006
Sarawak	<29,5	Leh <i>et al.</i> 1985
Austrália	<29	Miller & Limpus 1981
Estudos na natureza		
Costa Rica	28 - 30,3	Standora & Spotila 1985
Ilha de Ascensão	28,8	Godley <i>et al.</i> 2002
Norte do Chipre e Turquia	28,7	Kaska <i>et al.</i> 1998
Norte do Chipre	28,7 - 29,2	Broderick <i>et al.</i> 2000

Existem poucas estimativas do *sex-ratio* das posturas de *C. mydas* em condições naturais, especialmente para regiões tropicais e subtropicais. Foi estimada uma produção de 64% de fêmeas para o Suriname (Godfrey *et al.* 1996) e de 75% para a Ilha de Ascensão (Godley *et al.* 2002).

Quando emergem dos ninhos, as crias de tartaruga-verde dirigem-se para alto mar, onde passam os primeiros tempos da sua vida, mas quando atingem cerca de 25 cm de comprimento da carapaça deslocam-se para locais abrigados e pouco profundos da costa (zona nerítica), ricos em algas. Nesta zona passam a ocupar um nicho de alimentação bentónico, em vez do nicho pelágico que ocupavam no oceano. *C. mydas* é a única tartaruga marinha herbívora, alimentando-se de macroalgas e de fanerogâmicas após a fase pelágica. Assim, esta espécie tem

um importante papel no efeito da reciclagem de nutrientes e na estrutura da comunidade de algas (Bjorndal *et al.* 1997).

No caso da espécie *C. mydas*, a maturação sexual depende do local e/ou dieta e pode demorar muito tempo a ser atingida, com estimativas entre 25 - 40 anos em áreas temperadas e no Pacífico (Bjorndal *et al.* 2000; Chaloupka *et al.* 2004), de 15 - 19 anos para as Ilhas Caimão (Bell *et al.* 2005) e de 14 - 22 anos para Porto Rico (Patrício *et al.* 2014). Os adultos vivem temporariamente na zona oceânica, durante as migrações das áreas de alimentação para as de reprodução. As fêmeas permanecem junto das praias de nidificação durante o período entre posturas (Dizon & Balazs 1982).

As fêmeas de tartaruga-verde nidificam normalmente em intervalos de 2 a 4 anos, depositando em média três posturas por época de desova, em intervalos de 10 - 17 dias. O tamanho das posturas pode ser muito variável, quer entre populações e indivíduos, ou mesmo entre as várias posturas de uma mesma fêmea (Broderick *et al.* 2003). Na Guiné-Bissau, a tartaruga-verde nidifica essencialmente durante a época das chuvas, entre Julho e Novembro. Em Poilão, as desovas são mais abundantes em Agosto e Setembro e bastante escassas nos restantes meses do ano (Catry *et al.* 2010).

Para a maioria das populações a oviposição decorre no período da noite. Os ovos são depositados em câmaras, cuja profundidade varia entre 60 - 90 cm. O número de ovos por postura varia entre 50 a 150. Depois de 56 a 60 dias de incubação, dependendo da temperatura e da humidade do local, as tartarugas eclodem e movimentam-se em direção ao mar (Miller 1997).

A percentagem de crias de tartaruga marinha que sobrevive logo após a eclosão é muitas vezes reduzida, uma vez que ao longo da viagem do ninho até ao mar podem ser predadas por animais como caranguejos (Tomillo *et al.* 2010), répteis (Fortes *et al.* 1998), aves (Toland 1991) e mamíferos (Mendonca *et al.* 2010); outras ficam presas nas rochas ou morrem soterradas. Em relação à predação, na ilha de Poilão as tartarugas verdes recém-eclodidas são frequentemente predadas pelo caranguejo-fantasma (*Ocypode cursor*, Linnaeus 1758) que ataca maioritariamente as zonas da cabeça e/ou pescoço destas tartarugas (Tomillo *et al.* 2010).

O objectivo principal deste trabalho foi perceber de que forma o tipo de habitat escolhido para a escavação do ninho pode influenciar o *sex-ratio* das posturas de *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758) na ilha de Poilão, Guiné-Bissau.

Como objectivos secundários tentou perceber-se se: 1) os parâmetros reprodutores e o efeito do calor metabólico variam entre os habitats de nidificação e, conseqüentemente, se influenciam a produção de machos e fêmeas desta espécie de tartaruga marinha; e 2) a estimativa do *sex-ratio* através da medição de temperaturas de incubação (um método indirecto) se aproxima da estimativa efectuada pela dissecação das gónadas dos recém-eclodidos (método directo).

Para estimar o *sex-ratio* das posturas de *C. mydas* em cada habitat, foram monitorizadas as temperaturas de incubação dos ninhos e mais tarde determinados os sexos de uma amostra das crias nestes ninhos, através da análise histológica das gónadas. O *sex-ratio* das crias produzidas por esta população foi calculado também com base na análise histológica das gónadas de tartarugas recém-eclodidas mortas por causas aleatórias nas praias.

Metodologia

Área de estudo

O trabalho foi realizado na ilha de Poilão (10°52'N, 15°43'W), no Parque Nacional Marinho de João Vieira - Poilão (PNMJVP), situado no extremo sudeste do Arquipélago dos Bijagós, Guiné-Bissau (Figuras 1 e 2).

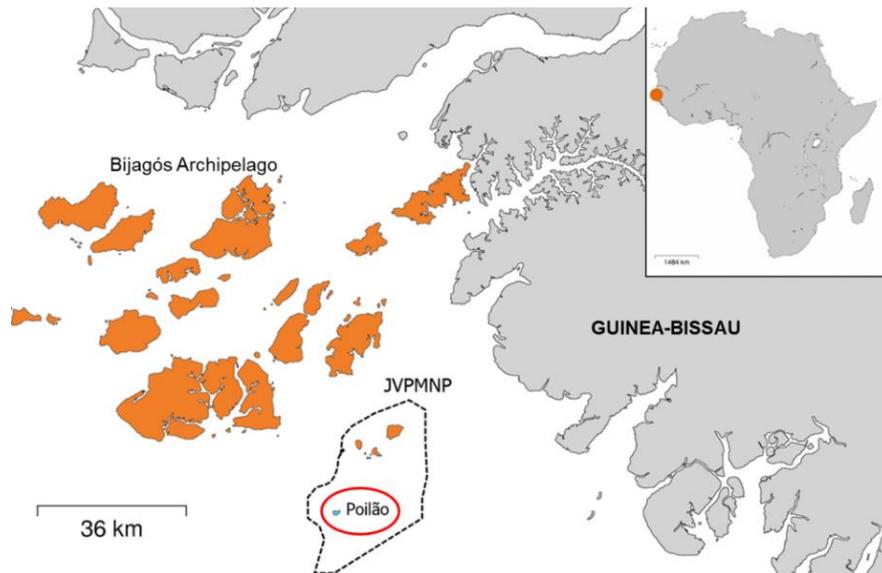


Figura 1. Localização da ilha de Poilão no Arquipélago dos Bijagós e no Parque Nacional Marinho de João Vieira - Poilão (JVPMP) na Guiné-Bissau. Autoria: Rita Patrício.

O Parque existe desde 2000 e é gerido pelo Instituto da Biodiversidade e das Áreas Protegidas da Guiné-Bissau (IBAP) desde 2004. Cobre uma superfície de 495 km² e inclui 4 ilhas principais (João Vieira, Cavalos, Meio e Poilão) e 2 ilhéus (Cabras e Aweto). O Parque tem como principais objectivos a protecção da biodiversidade e dos ecossistemas insulares e a conservação das tartarugas marinhas e das aves aquáticas coloniais. À excepção de João Vieira, as restantes ilhas do Parque são desabitadas. No entanto, são periodicamente utilizadas para a cultura de arroz, a colheita de produtos de palmeira e a realização de cerimónias religiosas.

Poilão é vigiada por patrulhas de barco durante todo o ano de forma a manter a protecção daquele território. Esta ilha, com aproximadamente 43 ha, tem pouco mais que 1000 m de comprimento ao longo do maior eixo e pouco relevo. Está rodeada por uma zona subtidal rochosa que, durante a maré baixa, impede o acesso às praias na quase totalidade do seu perímetro litoral. As praias arenosas ocupam 2,3 km dos 4 km de costa. O interior da ilha está

coberto por uma floresta tropical húmida e muito densa. O clima é tropical de monção, sendo a época das chuvas bem definida, entre Maio e Novembro (Catry *et al.* 2009). Na ilha as espécies de flora predominantes são: as árvores Poilão (*Ceiba pentandra*), Cabaceira (*Adansonia digitata*) e Figueira (*Ficus exasperata*) ou Po-di-lixia (em crioulo); o arbusto Três-folhas (*Allophylus africanus*) e, nas praias, a planta rasteira Lacacon (em crioulo) (*Ipomoea pes-caprae*).

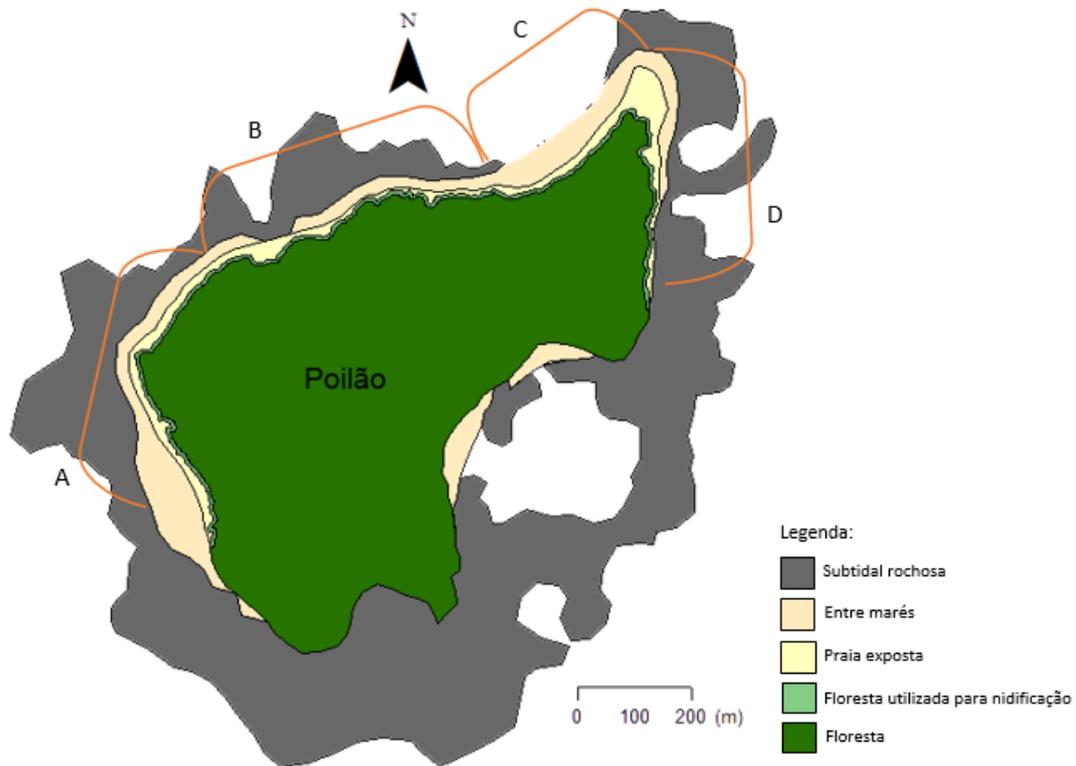


Figura 2. Ilha de Poilão com a indicação das praias monitorizadas: Farol (A), Acampamento Oeste (B), Acampamento Este (C) e Cabaceira (D). Mapa produzido no *software* ArcGis. Autoria: Rita Patrício.

O número de ninhos de tartaruga-verde que é depositado em Poilão por ano pode variar entre 7.000 e 29.000 (Catry *et al.* 2009). Esta ilha é o terceiro local mais importante para a nidificação da tartaruga-verde em todo o Atlântico, depois de Tortuguero na Costa Rica (Bjorndal *et al.* 1999) e da ilha de Ascensão (Godley *et al.* 2001), sendo um dos 12 locais mais importantes do mundo para esta espécie (Spotila 2004). Devido à elevada densidade de ninhos, Poilão tem sido foco de vários estudos ao longo das últimas duas décadas, e sendo *C. mydas* uma espécie em perigo de extinção é acrescido o valor desta ilha para a sua conservação. Poilão apresenta também registos de desova para a tartaruga-de-escama (*Eretmochelys imbricata*, Linnaeus 1766) (Catry *et al.* 2010).

Existem em Poilão vários predadores de ovos e recém-eclodidos de tartarugas marinhas: varano (*Varanus niloticus*, Linnaeus 1758), caranguejo-fantasma (*Ocypode cursor*, Linnaeus 1758), caranguejo do género *Cardisoma*, caranguejo da família Grapsidae, abutre-das-palmeiras (*Gypohierax angolensis*, Gmelin 1788), corvo-malhado (*Corvus albus*, Muller 1776), rola-do-mar (*Arenaria interpres*, Linnaeus 1758) e pilrito-das-praias (*Calidris alba*, Pallas 1764) (Catry *et al.* 2010). Todos já foram observados a predação os ovos e as tartarugas recém-eclodidas, mas os caranguejos-fantasma são os que terão mais impacto predatório sobre as tartarugas verdes recém-eclodidas (Catry *et al.* 2002).

As praias de Poilão foram divididas em quatro secções por razões de ordem prática, de modo a facilitar a monitorização: Farol, Acampamento Oeste, Acampamento Este e Cabaceira (Figura 2). Os habitats de nidificação disponíveis para as posturas em Poilão são: floresta, zona de transição, vegetação rasteira e zona exposta. Neste trabalho, a vegetação rasteira da praia foi considerada em conjunto com a zona exposta, uma vez que as tartarugas destroem completamente este tipo de vegetação quando fazem o ninho. Os 3 habitats amostrados (Figura 3) foram definidos em relação à sua exposição solar:

- 1) Zona exposta, com exposição solar máxima;
- 2) Zona de transição, com sombra durante parte do dia, por se encontrar no limite da floresta ou de arbustos altos ($\leq 2,5$ m);
- 3) Zona de floresta, com uma exposição solar muito reduzida.



Figura 3. Habitats de nidificação em Poilão: exposto (A), transição (B) e floresta (C).

De toda a área disponível na ilha de Poilão para as posturas de tartaruga marinha (3,7 ha), a zona exposta representa 78% (2,88 ha) e a zona da floresta (até 4 metros para o interior da vegetação) representa 22% (0,82 ha) (Figura 2). Este valor (4 metros) é o valor médio das estimativas, feitas a cada 100 metros, da penetração das tartarugas na vegetação da floresta.

Métodos de campo

Monitorização das actividades de nidificação da tartaruga-verde

A monitorização das actividades de nidificação e eclosão decorreu ao longo de três meses e 4 dias, entre 18 de Agosto e 22 de Novembro de 2013. Durante este período foram registadas diariamente a temperatura do ar com um termómetro (colocado a 2 metros de distância do solo e sem exposição solar directa) e a pluviosidade, esta última com três pluviómetros colocados ao longo da ilha. Os valores da área de captação de cada pluviómetro e do correspondente volume de água recolhido, em mililitro, foram convertidos em milímetro por metro quadrado.

Seleção dos ninhos

Nestes três meses realizaram-se caminhadas diárias ao longo de todas as praias durante a noite e no período de maré alta. Sempre que se encontrou uma fêmea em actividade de nidificação, identificou-se a praia, o tipo de habitat de nidificação e a data de postura. Do total de 539 ninhos de *C. mydas* identificados foram seleccionados 54 para este estudo, excluindo à partida os que estivessem muito próximos da linha de maré. Estes ninhos foram seleccionados de forma a estarem distribuídos pelas 4 praias e, em cada praia, pelos 3 habitats. As coordenadas geográficas de cada ninho foram registadas e os ninhos foram delimitados com estacas de madeira, uma em cada eixo cardeal, para protecção contra a escavação por outras fêmeas.

Registo das temperaturas dos ninhos

Para o registo das temperaturas de incubação e da areia foram utilizados registadores automáticos de temperatura (*data loggers*), *Tinytag Plus 2* TGP-4017, com bateria e sonda de temperatura interna. As temperaturas foram registadas a intervalos constantes (de hora a hora), até ao milésimo de grau.

Antes e depois da colocação dos *data loggers*, estes ficaram 24 horas numa sala a temperatura constante (28 °C), junto com um *logger* calibrado pela empresa fabricante (Gemini data loggers), para medir o desvio de temperatura de cada *logger* em relação ao *data logger* calibrado. O desvio médio foi de -0,12 °C.

No total, foram colocados 70 *data loggers*, 54 no interior dos ninhos monitorizados e 16 para medição da temperatura da areia, colocados 1 metro ao lado e à mesma profundidade de 16 ninhos seleccionados aleatoriamente entre os anteriores. Estes *loggers* serviram para medir o aumento da temperatura de incubação que ocorre nos ninhos devido ao calor metabólico gerado pelos embriões em desenvolvimento. Destes 16 *loggers*, 2 serviram para medir a temperatura da areia situada na região entre os três ninhos. No total, 20 ninhos (ca. 40% dos monitorizados) tiveram um *logger*-controlo associado.

A colocação dos *data loggers* no interior dos ninhos foi realizada enquanto as fêmeas estavam a realizar a postura, com o cuidado de causar a menor perturbação possível. A cada *logger* foi atada uma corda que foi levada até à superfície da areia, de modo a ser mais fácil a sua recuperação.

Os *loggers* estiveram activos durante um período de 93 dias. Após a recolha dos dados os *data loggers* foram novamente colocados a temperatura constante (28 °C) por 24h com o *logger* calibrado, para assegurar que todos funcionavam após estarem expostos aos elementos (chuva, maré, exposição solar extrema, entre outros). Os dados armazenados foram recolhidos e analisados com o *software* Tinytag® Explorer 4.8.

A variabilidade térmica diária em cada um dos 3 habitats de nidificação foi calculada através da diferença média entre as temperaturas máximas e mínimas diárias registadas nos *loggers* dos ninhos localizados em cada um dos habitats.

Monitorização dos ninhos

O período mínimo de incubação reportado para Poilão é de 49 dias (Catry *et al.* 2010). Os ninhos foram então monitorizados todos os dias, a partir do 49º dia depois da postura.

Todos os ninhos foram abertos no dia seguinte a se verificarem sinais de emergência, tais como uma pequena depressão no local do ninho e/ou rastros de tartarugas recém-eclodidas vindos dessa depressão. Foram recolhidos os seguintes parâmetros sobre a postura: número de crias

vivas e mortas dentro da câmara de ovos; número de cascas de ovos (ovos eclodidos); número de gemas (ovos não desenvolvidos) e número de crias mortas dentro do ovo (ovos não eclodidos). A data de emergência, a data de abertura e a profundidade (com recurso a fita métrica) também foram registadas para cada ninho. A profundidade do ninho foi medida depois das crias emergirem, desde a superfície da areia da praia até ao fundo da câmara, após todos os conteúdos do ninho serem removidos. Em relação à data de emergência, para sinais deste evento verificados até ao meio-dia admitimos que esta teria decorrido durante a noite anterior. Para emergências observadas depois desta hora, a data considerada foi a dessa tarde, já que não teriam havido evidências de emergência no censo matinal.

Parâmetros reprodutores

Para todos os ninhos foram calculados os seguintes parâmetros reprodutores: período de incubação, dias na areia, tamanho da postura, sucesso de eclosão e sucesso de emergência. O período de incubação foi calculado como a diferença (em dias) entre a data de eclosão e a de postura. Para definir a data de eclosão dos ninhos monitorizados com *loggers* foi analisada a variação de temperatura tal como disponibilizada pelo *software* Tinytag® Explorer 4.8 (Figura 4).

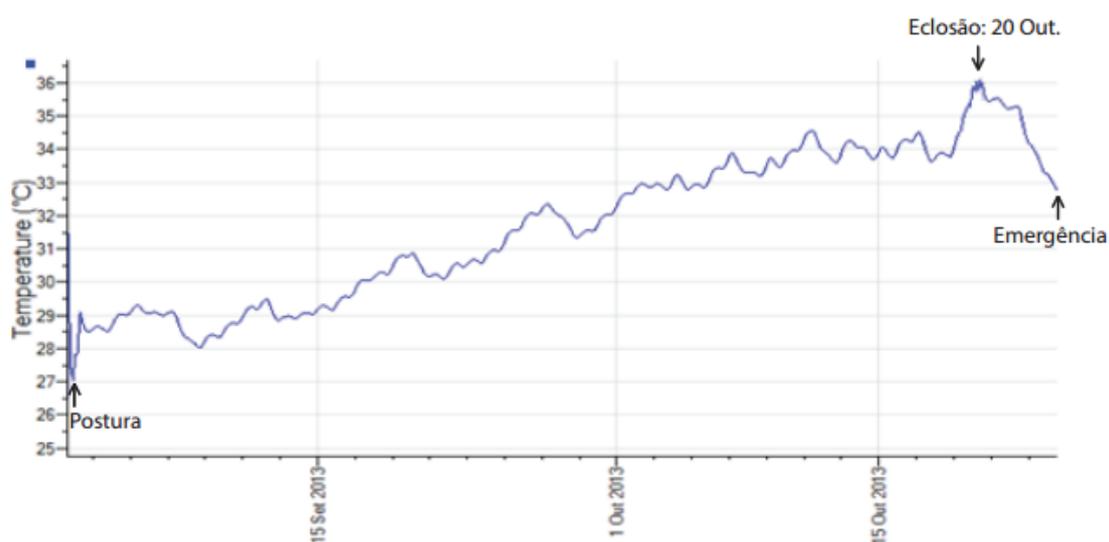


Figura 4. Variação da temperatura de um ninho entre 1 de Setembro e 24 de Outubro de 2013 (da postura até à emergência). O pico anterior à emergência corresponde ao momento da eclosão (Matsuzawa *et al.* 2002). Gráfico gerado pelo *software* Tinytag® Explorer.

O momento da eclosão corresponde ao valor máximo de temperatura anterior à data de emergência (Matsuzawa *et al.* 2002) (Figura 4), e deve-se à energia gerada pela massa de crias

em movimento, quando começam a subir desde a câmara de incubação até à superfície da areia. O parâmetro “dias na areia” foi calculado pela diferença entre o período de emergência e o de incubação, e apresentou um valor médio de $5 \pm 1,34$ dias (ver Resultados). Nos 6 ninhos onde não foi possível definir a data de eclosão, o período de incubação foi calculado com base na data de emergência e neste valor médio. Os parâmetros “tamanho da postura”, “sucesso de eclosão” e “sucesso de emergência” foram calculados da seguinte forma (Miller 1999):

Tamanho da postura = total de cascas + total de gemas + total de crias mortas nos ovos;

Sucesso de eclosão = $\frac{\text{total de cascas}}{\text{tamanho da postura}} \times 100$;

Sucesso de emergência = $\frac{(\text{total de cascas} - \text{crias vivas no ninho} - \text{crias mortas no ninho})}{\text{tamanho da postura}} \times 100$.

Para cada ninho monitorizado calculou-se a temperatura média durante todo o período de incubação e a temperatura média durante o segundo terço da incubação (período termo-sensível – TSP), e os respectivos desvios padrão (SD), valores mínimos e máximos.

Amostragem de tartarugas sacrificadas nos ninhos monitorizados

Em cada um dos 54 ninhos monitorizados foram sacrificadas em média $4,86 \pm 0,58$ crias (média \pm SD), seleccionadas aleatoriamente entre toda a eclosão. Não se sacrificaram mais crias, devido principalmente a questões éticas. Os recém-eclodidos de cada ninho foram capturados após a emergência com gaiolas de metal (35 x 25 cm), colocadas entre as estacas de madeira. Apesar, de se sacrificarem aleatoriamente 5 crias e serem todas fêmeas não quer dizer que esse ninho produza 100% de fêmeas. De modo a aplicar uma morte rápida e com o mínimo de sofrimento possível para os recém-eclodidos, as mortes foram realizadas por descerebração rápida, de acordo com o processo recomendado para eutanásia de répteis (Work & Balazs 2013). A autorização para o sacrifício dos recém-eclodidos de *C. mydas* foi previamente concedida pelo IBAP-GB (Instituto da Biodiversidade e das Áreas Protegidas da Guiné-Bissau).

Como tentativa de compensar o sacrifício dos recém-eclodidos foram salvas o máximo de crias possível, ao longo de toda a época de nidificação, através da procura e transporte para o mar de crias presas nas rochas durante o dia e escavadas ou esmagadas por fêmeas à noite. O número de crias salvas foi muito superior ao subconjunto sacrificado neste estudo.

Recolha de tartarugas mortas por causas aleatórias

Entre 2 de Setembro e 22 de Novembro de 2013 foram recolhidas regularmente tartarugas verdes recém-eclodidas e mortas por diferentes causas naturais ao longo das 4 praias da ilha. Entre as causas de morte acidental mais comuns, foram recolhidas tartarugas predadas, na maioria pelo caranguejo-fantasma *Ocypode cursor*, que ataca preferencialmente as zonas da cabeça e/ou pescoço; expostas, por tartarugas adultas que ao desovarem, acidentalmente destroem ninhos e expõem tartarugas ainda em desenvolvimento; esmagadas, pelo peso da tartaruga adulta, ou mortas por insolação. A recolha destes animais foi efectuada de modo a minimizar a probabilidade de seleccionar indivíduos pertencentes à mesma ninhada, tendo sido apenas recolhidos cadáveres separados por pelo menos 100 m. Foi também anotada a praia onde se colectou cada tartaruga.

Obtenção das gónadas

As gónadas de todas as crias foram obtidas por dissecação. Até à dissecação, os cadáveres foram mantidos à sombra. É essencial a rápida dissecação das gónadas para a realização do posterior exame histológico, e nesta fase não é possível separar a gónada do rim (Wibbels 2003). Os dois rins, aos quais estão aderentes as gónadas, foram colocados em *ependorfs* de 2 ml com álcool a 96°.

Trabalho laboratorial

Elaboração das preparações histológicas das gónadas

Esta tarefa decorreu na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa durante sete meses, entre 16 de Dezembro de 2013 e 14 de Julho de 2014.

Foram cortadas secções transversais dos rins com a gónada bem representada. Estas porções foram fixadas numa mistura de álcool a 96° com resina utilizada para cortes histológicos (marca Kulzer; modelo Technovit 7100; 50% de cada um destes componentes), durante 16 horas. De seguida, as peças foram colocadas em resina durante 24 horas. Para a obtenção dos blocos finais de resina, as peças foram colocadas em moldes, que foram enchidos com um preparado da resina anterior ao qual se adicionou endurecedor (mesma marca e modelo), na proporção de

1ml de endurecedor para 15ml de resina, até cobrir toda a peça. Seguidamente os moldes foram colocados sobre uma placa de aquecimento a 52 °C durante 30 minutos, para as peças polimerizarem em posição vertical e deixados a secar durante 24 horas. Depois de retirados dos moldes e colados com super-cola em paralelepípedos de madeira, os blocos ficaram a secar durante pelo menos 24 horas. As peças foram cortadas no micrótomo Leica RM 2155, com uma espessura de 3 µm. As preparações dos cortes foram deixadas a secar durante 24 horas e depois coradas com Azul de Toluidina, durante 1 minuto, retirando-se o excesso com água corrente. Depois de bem secas, colaram-se lamelas sobre as peças histológicas com cola NeoMount, após passagem por NeoClear. Deixou-se secar cerca de 4/5 dias, retirou-se o excesso de cola com a ajuda de uma lâmina de bisturi e limpou-se com NeoClear.

Identificação do sexo

As preparações foram analisadas ao microscópio, Leica DM 2000. Sempre que a gónada esteve visível e em condições para a sexagem, tirou-se uma fotografia com uma lente própria para microscópio (Leica DFC 290). As imagens foram digitalizadas com o *software* IrfanView, versão 4.27.

Para a identificação do sexo foram usados os critérios de diferenciação das gónadas e ductos paramesonérficos descritos por Miller & Limpus (2002). As fêmeas possuem um córtex bem desenvolvido e diferenciado em células alongadas e uma medula densa, mal organizada e sem túbulos seminíferos. Os machos possuem pouco ou nenhum córtex com células achatadas próximas da túnica albugínea. A medula é organizada e contém túbulos seminíferos com células germinais situadas perto da membrana interna. Em relação aos ductos paramesonérficos, na fêmea este desenvolve-se num oviducto, que é recto com lúmen aberto e o mesentério suspenso é longo e fino. Na maioria dos machos, o ducto caracteriza-se pela ausência de lúmen e o mesentério suspenso é curto e largo.

A identificação do sexo foi realizada independentemente por dois observadores, após o qual as duas sequências de identificação foram confrontadas.

Análise estatística

O número de *loggers* e/ou ninhos considerados para cada análise variou consoante a hipótese testada.

Diferenças térmicas da areia entre os três habitats

Para a caracterização térmica da areia da praia à profundidade à qual são normalmente postos os ovos foram utilizados os *loggers*-controlo e os dos ninhos, desde que se encontrassem no início do período de incubação (1º terço), de modo a não haver interferência do calor metabólico.

Parâmetros reprodutores

Os períodos de incubação, os dias na areia, os tamanhos das posturas, as profundidades dos ninhos, os sucessos de emergência e os sucessos de eclosão foram comparados entre as 3 zonas com análises de variâncias de uma entrada (ANOVAs One-Way). Estas análises também foram realizadas para 2 zonas (exposto e floresta), adicionando nesse caso os dados da zona de transição com os da zona exposta, uma vez que são as zonas termicamente mais próximas (ver Resultados). Sempre que foram encontradas diferenças foi realizado o teste *a posteriori* Tukey HSD. Para os diferentes parâmetros também foram calculados a média, desvio-padrão (SD), mínimo e máximo.

Efeito do calor metabólico

O efeito do calor metabólico foi calculado pelas diferenças das temperaturas entre os ninhos e a areia (*loggers*-controlo) no período termo-sensível, aproximadamente entre o 17º e 35º dias (média neste estudo). O dia exacto a partir do qual se começou a verificar o efeito do calor metabólico nas temperaturas de incubação foi identificado para todos os ninhos. A existência de diferenças no período que decorreu entre a postura e o início do efeito do calor metabólico entre os habitats exposto e de floresta, tendo em conta o tamanho da postura (covariável), foi testada com um modelo linear (GLM). Também foi utilizado um GLM para testar se as diferenças de temperatura no período entre o início do efeito do calor metabólico e o último dia do TSP foram influenciadas pelo tamanho da postura (covariável) e pelo habitat, exposto ou de floresta. Nestas análises o habitat de nidificação “transição” não foi considerado porque apresentava um n muito reduzido (n = 2).

Comparação das temperaturas no TSP (Thermosensitive Period) com valores publicados de TRT (Transitional Range of Temperatures) e de temperatura pivotal

Para prever o *sex-ratio* das tartarugas verdes nos ninhos monitorizados, comparámos as temperaturas registadas nos ninhos durante o TSP com valores publicados de temperatura pivotal e de TRT para esta espécie noutros locais (Suriname e Costa Rica). A temperatura pivotal utilizada foi a estimada para o Suriname, 29,2 °C (Godfrey & Mrosovsky 2006), por este ser dos estudos mais recentes em que é estimada a temperatura pivotal para *C. mydas* e a latitude deste local (5°50'N) ser semelhante à de Poilão. Para a espécie de tartaruga de água doce, *Chelydra serpentina*, foi descrito que a variação das temperaturas pivotais pode ser explicada pela latitude (Ewert *et al.* 2005), portanto as pivotais tendem a ser mais semelhantes em latitudes parecidas. Em relação ao TRT, para esta espécie de tartaruga marinha foram publicadas duas estimativas, para a Costa Rica (Standora & Spotila 1985) e Suriname (Mrosovsky *et al.* 1984). Neste trabalho calculámos a média destes 2 TRTs, resultando num TRT de 2 °C. Distribuindo este valor equitativamente acima e abaixo da temperatura pivotal, estimámos assim que temperaturas superiores a 30,2 °C produzirão apenas fêmeas e temperaturas inferiores a 28,2 °C produzirão apenas machos.

Proporção dos sexos das crias sacrificadas por habitat

A proporção de fêmeas em cada ninho foi calculada da seguinte forma:

$$\frac{\text{total de fêmeas sacrificadas no ninho}}{\text{total de crias sacrificadas no ninho}}$$

Para a estimativa dos *sex-ratios* produzidos nos diferentes habitats de nidificação de Poilão foi também calculada a média das proporções de fêmeas entre as crias sacrificadas em cada um dos ninhos, agrupados em cada um dos 3 habitats amostrados. Esta estimativa é mais precisa que a anterior, baseada nas temperaturas de incubação. No entanto, esta estimativa corresponde apenas ao período relativo às emergências das crias sacrificadas nos ninhos, entre 20 de Outubro e 17 de Novembro de 2013.

Varição da proporção dos sexos das crias com morte aleatória ao longo da época

Foi calculada a proporção de fêmeas entre as crias mortas por causas aleatórias entre 2 de Setembro e 22 de Novembro de 2013, que será representativa das tartarugas que nascem em todos os habitats de nidificação. As crias foram agrupadas por quinzena, produzindo assim 6 estimativas de proporção de fêmeas, distribuídas ao longo da estação. A proporção de fêmeas para toda a época de amostragem foi calculada com base na média das proporções quinzenais. Esta análise é útil porque o intervalo temporal para o qual foram obtidos resultados a partir de crias com morte aleatória é maior (mais de 2 meses) que o intervalo correspondente aos ninhos monitorizados (1 mês).

Modelação

As proporções de cada sexo das crias com mortes aleatórias deverão ser uma boa representação do *sex-ratio* total da ilha (Rebelo *et al.* 2011). A disponibilidade do habitat de cada tipo e os respectivos *sex-ratios* e sucessos de emergência foram estimados neste trabalho. É por isso possível fazer uma previsão da proporção de cada sexo no total da ilha e compará-la com a estimativa do que acontece na realidade. Uma vez que não se obteve dados sobre a escolha do tipo de habitat de nidificação por parte das fêmeas, assumiu-se uma escolha aleatória do local de nidificação que terá como resultado uma distribuição dos ninhos pelos habitats dependente apenas da sua disponibilidade. Foram assim usadas as proporções que cada tipo de habitat (exposto e floresta) representa no total da ilha de Poilão, os sucessos de emergência correspondentes e as proporções das fêmeas em cada habitat a partir das crias sacrificadas. Esta previsão foi comparada com o *sex-ratio* das crias mortas por causas aleatórias, que terão emergido durante a altura em que emergiram as crias dos ninhos monitorizados (20 de Outubro a 17 de Novembro). A fórmula considerada foi:

$$\begin{aligned} & \textit{Proporção de fêmeas que nascem em Poilão} \\ & = (\textit{proporção de fêmeas no exposto} \times \textit{proporção do exposto} \times 1) \\ & + (\textit{proporção de fêmeas na floresta} \times \textit{proporção da floresta} \times 0,68), \end{aligned}$$

onde 0,68 representa a proporção de crias que emergem na floresta em relação ao habitat exposto, ou seja, por cada 68 crias que emergem na floresta, 100 emergem no exposto (ver Resultados).

Para perceber o que acontecerá às proporções dos sexos nesta espécie de tartaruga marinha em Poilão em condições de redução da área actual de floresta disponível para nidificação foi

realizada uma previsão da proporção dos sexos que resultaria do desaparecimento total da zona de floresta litoral. Esta modelação foi realizada para perceber como a produção de machos pode variar em casos de inexistência de floresta (ilhas sem floresta natural) ou em casos de deflorestação por parte do Homem.

Estas análises foram realizadas com os *softwares* STATISTICA, versão 12, e Microsoft Office Excel 2013.

Resultados

Temperatura e precipitação média em Poilão entre Agosto e Novembro de 2013

A pluviosidade diminuiu com o avanço da estação, tendo cessado a partir de Novembro, contrariamente à temperatura que aumentou ao longo da estação (Figura 5).

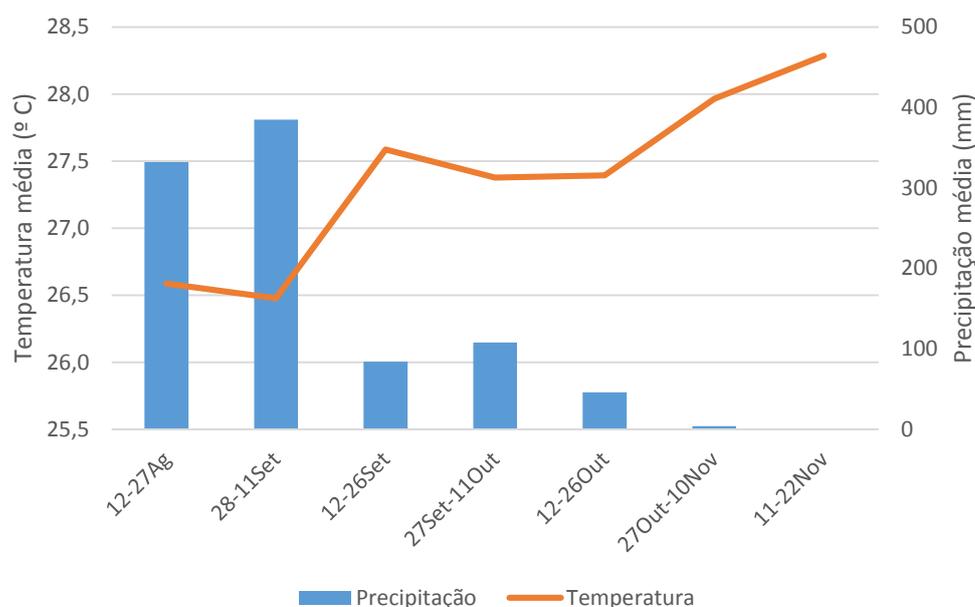


Figura 5. Temperatura e precipitação média quinzenal de Poilão entre Agosto e Novembro de 2013.

Ninhos analisados

Dos 54 *loggers* colocados no interior dos ninhos, foram perdidos 2 e em 7 a postura não sobreviveu. Houve assim resultados de 45 *loggers*: 28 na praia exposta ao sol, 11 em floresta e 6 em zonas de transição.

Em 6 ninhos não foi possível definir a data de eclosão exacta e em 7 não foram observados sinais de emergência. Nos últimos não se observaram rastos perto do ninho e/ou os recém-eclodidos não foram capturados na gaiola.

Diferenças térmicas da areia entre os três habitats

O aumento da temperatura atmosférica e a diminuição da pluviosidade resultou no consequente aumento da temperatura da areia (Figura 5 e 6).

Dois dos habitats - exposto e de transição - apresentaram tendências semelhantes de aumento gradual das temperaturas médias entre 2 de Setembro e 17 de Novembro (Figura 6). No entanto, no solo da floresta a temperatura manteve-se relativamente constante e o aumento das temperaturas ocorreu a partir de 23 de Outubro, e mais marcadamente a partir de 1 de Novembro, quando a chuva cessou completamente (Figura 6). Ao longo de todo o período, a zona exposta foi a zona mais quente ($29,88 \pm 0,82 \text{ }^\circ\text{C}$) (média \pm SD), seguida da zona de transição ($29,48 \pm 0,92 \text{ }^\circ\text{C}$) e a floresta foi sempre a zona mais fresca ($27,69 \pm 0,69 \text{ }^\circ\text{C}$).

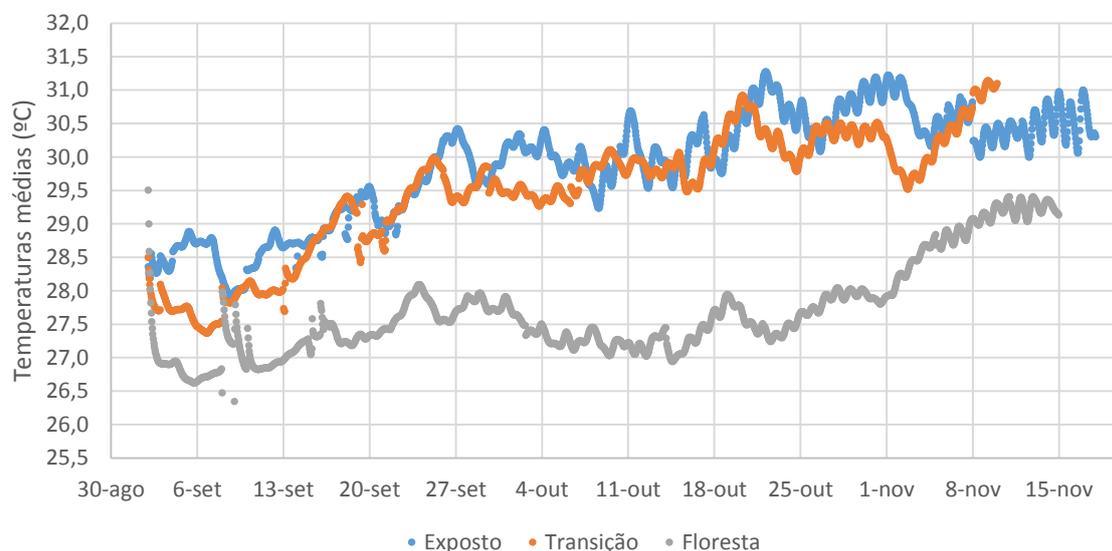


Figura 6. Temperaturas médias dos 3 habitats entre Setembro e Novembro de 2013. As linhas correspondem a valores médios de temperatura (medidos em vários *loggers*) e o número de *loggers* que contribuiu para cada linha variou ao longo da estação, com um valor máximo de 31 e médio de 17.

A diferença média das temperaturas entre a zona exposta e a floresta foi de $2,20 \text{ }^\circ\text{C}$ e esta diferença cresceu até ao início de Novembro, tendo diminuído rapidamente em Novembro. Entre a zona de transição e de floresta a diferença foi de $1,79 \text{ }^\circ\text{C}$ e esta diferença aumentou ao longo da estação. A diferença média entre as zonas expostas e de transição foi de $0,40 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo relativamente constante até ao início de Novembro (dia 6) e diminuindo a partir desta data.

A diferença média entre as temperaturas máximas e mínimas diárias na zona exposta foi de $1,65 \text{ }^\circ\text{C}$, de transição de $1,67 \text{ }^\circ\text{C}$ e em floresta de $0,78 \text{ }^\circ\text{C}$. Portanto, a temperatura variou menos no solo da floresta e mais na zona de transição.

Parâmetros reprodutores

O período de incubação variou significativamente consoante a zona ($F_{2,22} = 15,69$; $p < 0,001$), sendo mais longo na floresta do que na zona de transição (teste de Tukey; $p = 0,02$) e na zona exposta (teste de Tukey; $p < 0,001$). O tamanho da ninhada não variou entre habitats de nidificação ($F_{2,34} = 0,13$; $p = 0,88$), assim como o sucesso de eclosão ($F_{2,34} = 0,14$; $p = 0,87$) (Tabela 2). A profundidade dos ninhos também foi semelhante entre os habitats ($F_{2,34} = 1,11$; $p = 0,34$) (Tabela 2). Apesar de não ter havido diferenças significativas entre as zonas para a variável “dias na areia” ($F_{2,22} = 3,04$; $p = 0,07$), os recém-eclodidos levaram mais dias a emergir à superfície em zonas de floresta (Tabela 3). O sucesso de emergência também não variou significativamente entre os 3 habitats ($F_{2,32} = 2,34$; $p = 0,11$) mas, foi em média menor na floresta (Tabela 4). Comparando apenas a zona exposta com a floresta, foram encontradas mais diferenças para além do período de incubação ($F_{1,23} = 26,11$; $p < 0,001$), como o sucesso de emergência, menor na floresta ($F_{1,33} = 4,51$; $p = 0,04$) e os dias na areia (em maior número na floresta) ($F_{1,23} = 5,76$; $p = 0,02$).

Tabela 2. Tamanho da postura, Sucesso de eclosão e Profundidade do ninho para os 3 habitats de nidificação. N, média, desvio-padrão (SD), mínimo (Mín) e máximo (Máx) apresentados para cada parâmetro reprodutor.

Zonas	N	Tamanho da postura (N)			Sucesso de eclosão (%)			Profundidade do ninho (m)		
		Média ± SD	Mín	Máx	Média ± SD	Mín	Máx	Média ± SD	Mín	Máx
Exposto	23	128 ± 47,91	42	299	81,35 ± 18,67	28,46	100	0,88 ± 0,17	0,56	1,14
Transição	6	123 ± 25,01	92	168	85,34 ± 14,06	56,48	98,21	0,84 ± 0,09	0,65	0,9
Floresta	8	121 ± 7,19	105	128	83,51 ± 11,92	60,98	98,1	0,78 ± 0,16	0,48	1

Tabela 3. Período de incubação e Dias na areia para os 3 habitats de nidificação. N, média, desvio-padrão (SD), mínimo (Mín) e máximo (Máx) apresentados para cada parâmetro reprodutor.

Zonas	N	Período de incubação (N)			Dias na areia (N)		
		Média ± SD	Mín	Máx	Média ± SD	Mín	Máx
Exposto	17	50 ± 3,04	46	58	5 ± 1,14	2	6
Transição	4	53 ± 3,61	48	58	5 ± 1,41	3	7
Floresta	4	60 ± 1,79	57	62	6 ± 1,09	5	8

Tabela 4. Sucesso de emergência para os 3 habitats de nidificação. N, média, desvio-padrão (SD), mínimo (Mín) e máximo (Máx) apresentados para este parâmetro reprodutor.

Zonas	N	Sucesso de emergência (%)		
		Média ± SD	Mín	Máx
Exposto	22	75,75 ± 25,11	2,44	100
Transição	6	82,49 ± 14,66	56,48	98,21
Floresta	7	52,01 ± 38,89	0	96,19

Efeito do calor metabólico

O calor metabólico não aumentou as temperaturas de incubação no período termo-sensível, de forma constante. No exemplo do ninho apresentado na Figura 7, o TSP decorreu entre 7 e 24 de Outubro com diferenças de temperaturas médias de $0,48 \pm 0,41$ °C entre o interior e o exterior do ninho. No entanto, o efeito mensurável do calor metabólico nas temperaturas de incubação começou a partir do dia 13 de Outubro, o 25º dia após a postura, com diferenças de temperaturas médias de $0,69 \pm 0,34$ °C (Figura 7). Desta data até ao último dia do TSP (24 de Outubro) o aquecimento adicional da postura causado pelo calor metabólico foi de 1,21 °C.

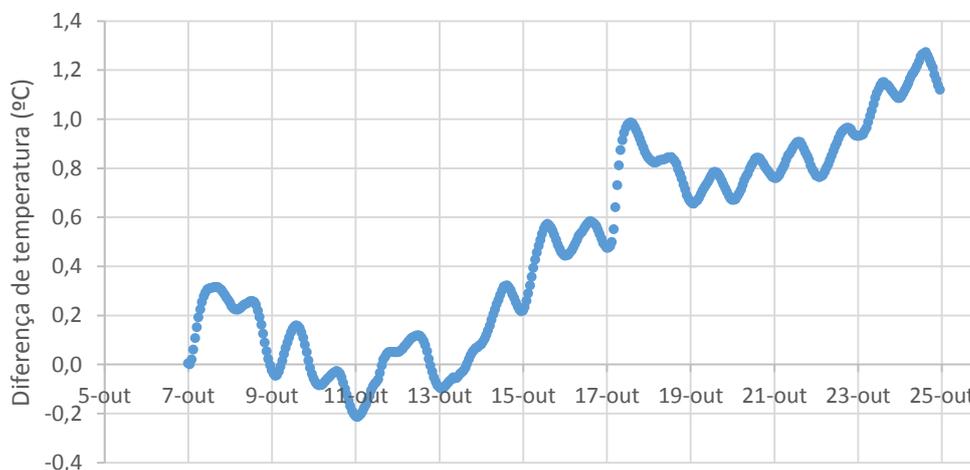


Figura 7. As diferenças nas temperaturas entre o interior da postura e a areia circundante no período termo-sensível.

O aquecimento médio causado pelo calor metabólico nos 3 habitats foi de $0,26 \pm 0,51$ °C (n = 13).

Período entre a postura e o início do efeito do calor metabólico

Nos 13 ninhos analisados este período foi em média de $25 \pm 4,37$ dias, com um mínimo de 15 e máximo de 33 dias. Este período não foi influenciado pelo tipo de habitat (exposto ou floresta) (GLM, $F_{1,8} = 0,01$; $p = 0,91$) nem pelo tamanho da postura (GLM, $F_{1,8} = 0,29$; $p = 0,61$).

Diferenças de temperatura no período entre o início do efeito do calor metabólico e o último dia do TSP

As diferenças de temperatura neste período não foram influenciadas pelo tipo de habitat (exposto ou floresta) (GLM, $F_{1,8} = 4,72$; $p = 0,06$) nem pelo tamanho da postura (GLM, $F_{1,8} = 2,89$; $p = 0,13$).

Temperaturas médias de incubação e no período termo-sensível (TSP) em cada habitat

Nos 3 habitats de nidificação a temperatura média no período de incubação total foi sempre mais elevada em comparação com a do TSP (diferença média de $0,33$ °C). Na floresta a diferença entre estes períodos foi maior ($0,66$ °C) que nos outros dois habitats (Tabela 5).

Tabela 5. Temperatura média e desvio-padrão dos ninhos monitorizados nos 3 habitats no período de incubação e no período termo-sensível (TSP). A diferença de temperaturas entre estes períodos é também apresentada.

	(°C) Média \pm SD		
	Exposto	Transição	Floresta
Período de incubação	$30,79 \pm 0,68$	$29,92 \pm 0,65$	$28,73 \pm 0,31$
Período termo-sensível	$30,65 \pm 0,74$	$29,72 \pm 0,60$	$28,07 \pm 0,38$
Diferença entre períodos	0,14	0,2	0,66

Comparação das temperaturas no TSP (Thermosensitive Period) com valores publicados de TRT (Transitional Range of Temperatures) e de temperatura pivotal

Dos 24 ninhos colocados em zonas expostas e monitorizados com *loggers*, previmos que em 4 (17%) se tenham desenvolvido apenas fêmeas, uma vez que as temperaturas foram sempre superiores a $30,2$ °C (Figura 8). Dos restantes ninhos, 17 (71%) terão produzido um *sex-ratio*

desproporcionado no sentido das fêmeas, visto que as temperaturas estiveram sempre acima da temperatura pivotal para o Suriname, 29,2 °C (Godfrey & Mrosovsky 2006) (Figura 8). Dos 24 ninhos em zonas expostas, em nenhum foi previsível que o *sex-ratio* tenha sido desviado para um excesso de machos (Figura 8).



Figura 8. Variação das temperaturas de incubação no TSP dos ninhos em habitats de nidificação expostos ao sol (n = 24) e comparação destas com a temperatura pivotal no Suriname (29,2 °C) e TRT médio no Suriname e Costa Rica (28,2 - 30,2 °C). Ninhos nos quais todas as crias sacrificadas foram do mesmo sexo indicados com os símbolos ♀ e ♂.

Foram sacrificadas crias em 13 destes 24 ninhos localizados em zonas expostas. Em 92% destes ninhos foram encontradas apenas fêmeas (Figura 8). O ninho 62 produziu uma ninhada com pelo menos 5 machos (todos os animais sacrificados nesse ninho), apesar de estar localizado em zona exposta (Figura 8).

Dos 6 ninhos analisados em zonas de transição previmos que em nenhum se tenham desenvolvido apenas fêmeas, mas 3 (50%) terão produzido um *sex-ratio* desproporcionado no sentido das fêmeas (Figura 9). Do total de ninhos em zonas de transição, em nenhum foi previsível que o *sex-ratio* tenha sido desviado para um excesso de machos (Figura 9).

Foram sacrificadas crias em 2 destes 6 ninhos e em ambos foram encontradas apenas fêmeas (Figura 9).

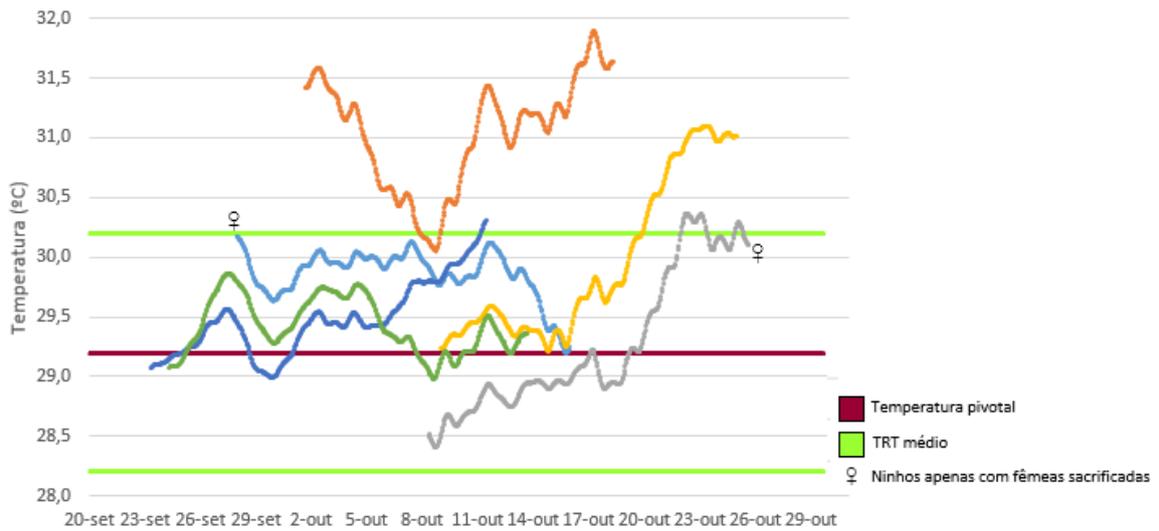


Figura 9. Variação das temperaturas de incubação no TSP dos ninhos em habitats de nidificação de transição (n = 6) e comparação destas com a temperatura pivotal no Suriname (29,2 °C) e TRT médio no Suriname e Costa Rica (28,2 - 30,2 °C). Ninhos nos quais todas as crias sacrificadas foram do mesmo sexo indicados com o símbolo ♀.

Dos 8 ninhos analisados em zonas de floresta previmos que em nenhum se tenham desenvolvido apenas machos e que 5 (63%) terão produzido um *sex-ratio* desproporcionado no sentido dos machos (Figura 10). Do total de ninhos em floresta, em nenhum foi previsível que o *sex-ratio* tenha sido desproporcionado no sentido das fêmeas (Figura 10).

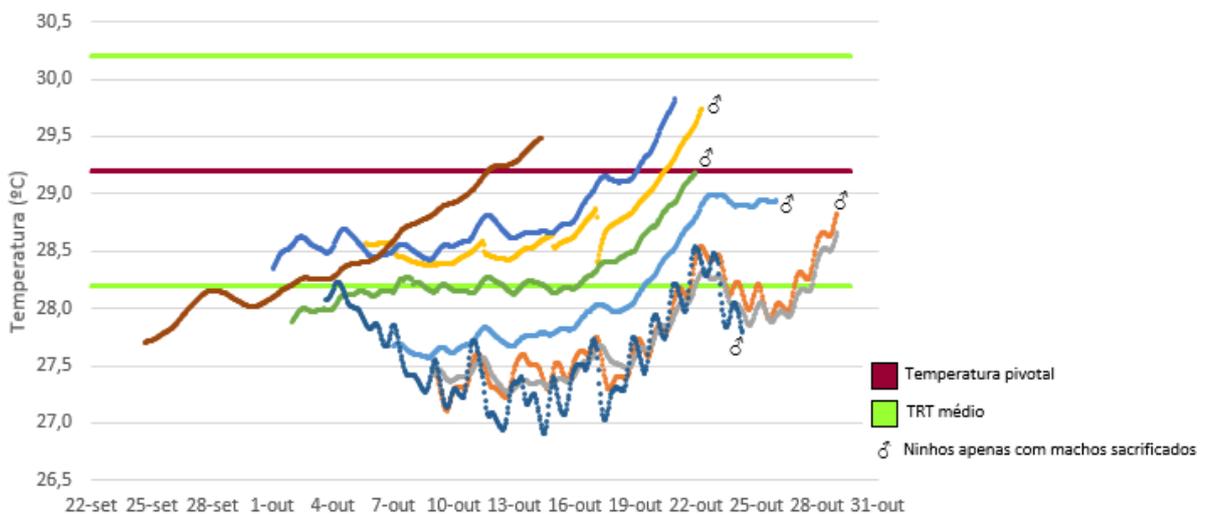


Figura 10. Variação das temperaturas de incubação no TSP dos ninhos em habitats de nidificação de floresta (n = 8) e comparação destas com a temperatura pivotal no Suriname (29,2 °C) e TRT médio no Suriname e Costa Rica (28,2 - 30,2 °C). Ninhos nos quais todas as crias sacrificadas foram do mesmo sexo indicados com o símbolo ♂.

Destes 8 ninhos foram sacrificadas crias em 5 e em todos foram encontrados apenas machos (Figura 10).

Identificação do sexo a partir de cortes histológicos

Os cortes histológicos mostraram uma estrutura semelhante à descrita na bibliografia, não oferecendo grandes dificuldades de identificação. Tal como observado por Miller & Limpus (2002), as fêmeas têm a porção medular da gónada pouco organizada e um córtex bem desenvolvido, enquanto os machos têm pouco ou nenhum córtex e mostram uma medula organizada (Figura 11). O ducto paramesonéfrico nas fêmeas é recto com lúmen aberto e mesentério longo e fino e nos machos caracteriza-se pela ausência de lúmen com mesentério curto e largo (Figura 11).

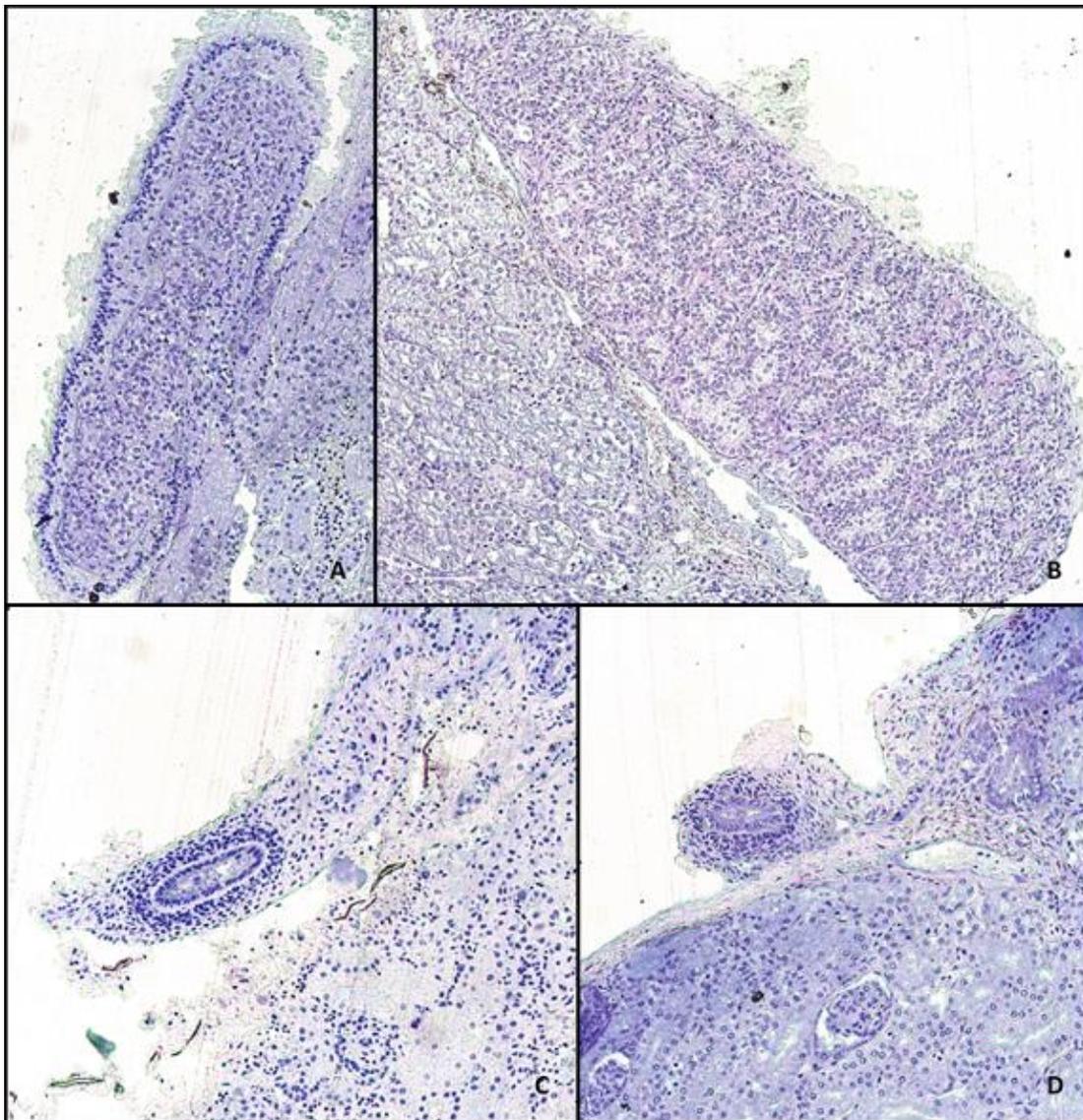


Figura 11. Gónadas e ductos paramesonéfricos de recém-eclodidos de *C. mydas*: ovário (A), testículo (B), ducto feminino (C) e ducto masculino (D).

Recém-eclodidos de *C. mydas* sacrificados

Foi identificado o sexo em 98% dos casos. Não foi possível identificar o sexo em 3 exemplares devido à ausência da gónada ou má condição desta (decomposta ou destruída). O sexo foi identificado pela gónada ou gónada e ductos paramesonéfricos em 92% dos cortes e em 8% foi identificado apenas pelos ductos (Tabela 6).

Tabela 6. Números totais de gónadas analisadas provenientes de animais sacrificados. Para a identificação do sexo recorreu-se à observação da gónada e/ou dos ductos paramesonéfricos.

	Gónada ou Gónada e Ductos	Ductos	Total identificado
Fêmeas	90	12	102
Machos	76	2	78
Total identificado	166	14	180

A concordância da identificação do sexo realizada pelos dois observadores foi de 95%; 9 em 180 identificações não coincidiram.

Recém-eclodidos de *C. mydas* com morte acidental

Foi identificado o sexo em 87% dos casos. Não foi possível identificar o sexo em 24 exemplares devido à ausência da gónada ou má condição desta (decomposta ou destruída). O sexo foi identificado pela gónada ou gónada e ductos paramesonéfricos em 93% dos cortes e em 7% foi identificado apenas pelos ductos (Tabela 7).

Tabela 7. Números de gónadas analisadas provenientes de animais mortos por causas aleatórias. Para a identificação do sexo recorreu-se à observação da gónada e/ou dos ductos paramesonéfricos.

	Gónada ou Gónada e Ductos	Ductos	Total identificado
Fêmeas	60	6	66
Machos	93	5	98
Total identificado	153	11	164

A concordância da identificação do sexo realizada pelos dois observadores foi de 90%; 16 em 164 identificações não coincidiram.

As possíveis razões para as discordâncias deveram-se à presença de gónadas com um desenvolvimento muito atrasado, pouco coradas, em mau estado, devido a problemas no micrótomo ou na elaboração das preparações histológicas e/ou gónadas com um desenvolvimento anormal (podendo existir casos de intersexo). Do total de gónadas analisadas identificaram-se 3 possíveis casos de hermafroditismo (exemplos na Figura 12). A concordância entre observadores para as crias com morte acidental foi menor, devido principalmente à maior degradação a que estão sujeitas antes da recolha, comparadas com as crias sacrificadas.

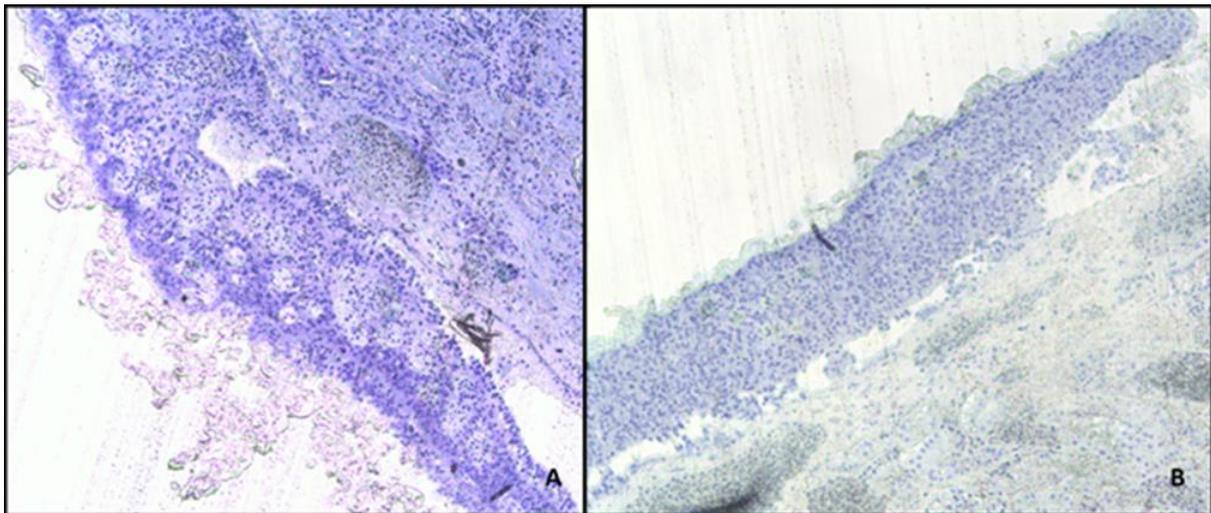


Figura 12. Gónadas anormais e de difícil classificação: (A) medula com canais que parecem túbulos seminíferos numa gónada com córtex bem diferenciado e (B) córtex e medula não coincidentes com nenhum dos sexos.

Proporção dos sexos das crias sacrificadas em cada habitat

De 20 de Outubro a 17 de Novembro de 2013 (datas de eclosão) a proporção média de fêmeas em posturas realizadas nas zonas expostas foi de 85%, em zonas de transição de 75% e em zonas de floresta de 17% (Figura 13).

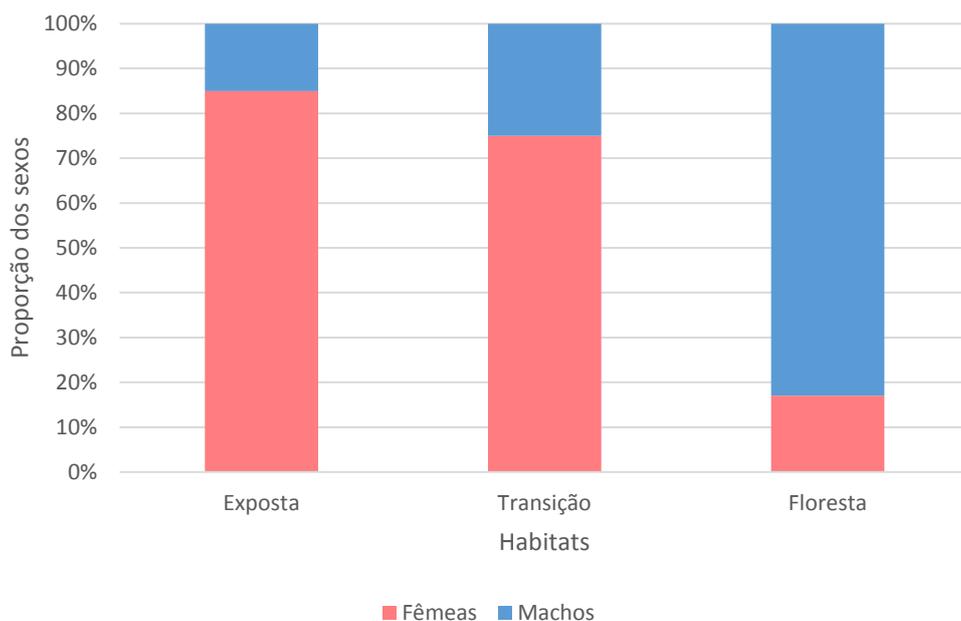


Figura 13. Proporção dos sexos correspondentes às crias sacrificadas por habitats de nidificação. N = 30 (18 em zonas expostas, 5 em transição e 7 em floresta).

As crias sacrificadas que nasceram em ninhos de zonas expostas foram maioritariamente fêmeas, sendo que na maioria destes ninhos (67%) encontrámos apenas fêmeas e em 28% dos ninhos uma mistura dos dois sexos. Nestas zonas, apenas num ninho encontrámos 5 machos (Tabela 8). Em 71% dos ninhos da floresta com crias sacrificadas foram encontrados apenas machos e em 29% machos e fêmeas (Tabela 8). A produção de machos nesta época deve-se assim principalmente aos ninhos localizados em zonas de floresta.

Tabela 8. Crias sacrificadas nos ninhos ($4,86 \pm 0,58$) dos 3 habitats de nidificação.

Habitat	# Ninhos	Sacrificadas-100% fêmeas	Sacrificadas-100% machos
Exposto	18	12	1
Transição	5	2	0
Floresta	7	0	5

Variação da proporção dos sexos das crias com morte aleatória ao longo da época

A proporção de fêmeas aumentou ao longo da estação, de 11% para os animais que emergiram a 2 de Setembro (n = 47) até 74% para os animais que emergiram no final, 22 de Novembro (n = 19), chegando a atingir os 90% na quinzena de 28 de Outubro a 10 de Novembro (n = 10) (Figura 14). Em toda a época de amostragem a proporção de fêmeas com morte aleatória foi de 53% (n = 164). Esta época de amostragem corresponderá às posturas realizadas entre 7 de Julho e 27 de Setembro de 2013 (considerando uma média de 57 dias entre postura e emergência das crias).

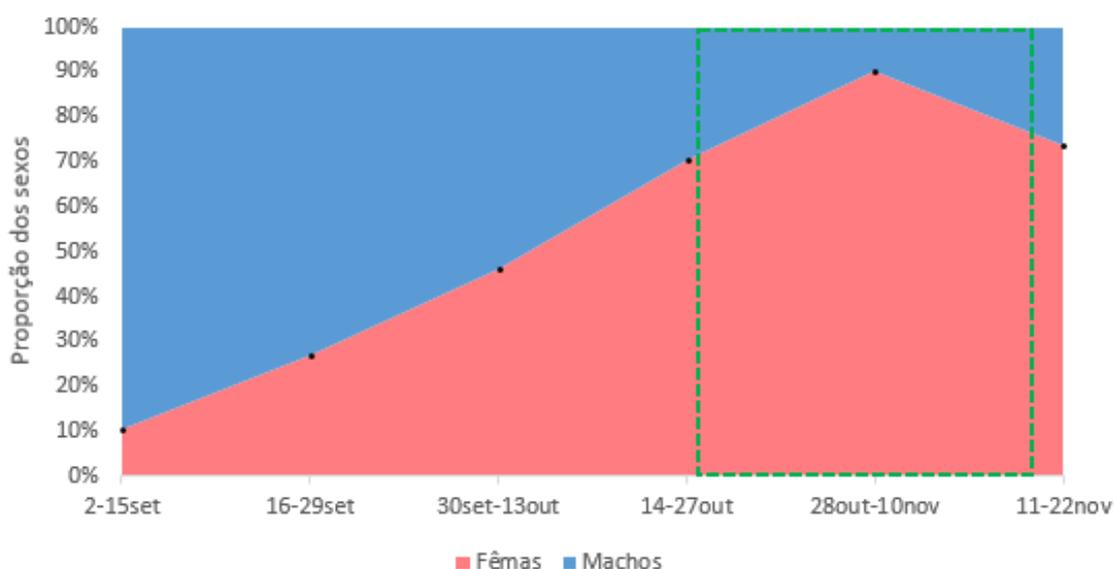


Figura 14. Proporção dos sexos das crias mortas por causas aleatórias ao longo de Poilão agrupados por quinzena, de 2 de Setembro a 22 de Novembro de 2013 (n = 164). A zona em destaque a tracejado representa as crias mortas aleatoriamente entre 20 de Outubro e 17 de Novembro (n = 27).

Modelação

A zona em destaque da figura 14 representa as datas de emergência das crias sacrificadas nos ninhos monitorizados com *loggers* (20 de Outubro a 17 de Novembro). A proporção de fêmeas entre as crias com morte aleatória neste período foi sempre superior à dos machos, em média 85% (n = 27).

As áreas que cada tipo de habitat representa em Poilão são de 2,88 ha (78% do total) para o habitat exposto e 0,82 ha (22% do total) para a floresta. Os sucessos de emergência em cada um destes habitats foram de 76% e 52%, respectivamente. A proporção de fêmeas entre as crias sacrificadas que emergiram em cada um destes habitats foi de 85% para o exposto e de 17%

para a floresta. A previsão da proporção de fêmeas para o total da ilha foi assim de 69%. Este valor é relativamente próximo do valor encontrado entre as crias mortas por causas aleatórias - 85%.

Se a floresta litoral desaparecer totalmente, ainda assim prevemos que exista produção de machos mas de apenas 15% do total, equivalendo a 60% da produção de machos que é estimada ocorrer actualmente durante este período.

Discussão

Esta tese demonstrou que o local do ninho influencia o *sex-ratio* das posturas de tartaruga-verde na ilha de Poilão, uma vez que diferentes ambientes térmicos produziram diferentes *sex-ratios*. Os habitats expostos produziram a maioria das fêmeas, enquanto a produção de machos foi dependente das zonas protegidas da exposição solar directa, como a floresta. Portanto, a produção dos dois sexos nesta ilha está dependente da manutenção da floresta litoral. O período de incubação, o sucesso de emergência e os “dias na areia” também variaram entre os habitats de nidificação. Foi demonstrado também que a estimativa do *sex-ratio* através da medição de temperaturas de incubação e a estimativa efectuada pela dissecação das gónadas dos recém-eclodidos foi semelhante, demonstrando a validade do método indirecto.

Em Poilão, os ninhos colocados em zonas de vegetação densa estiveram expostos a temperaturas mais baixas e produziram mais machos do que os ninhos de zonas abertas. Outros autores, como Hamann *et al.* (2001) demonstraram na Malásia que os ninhos protegidos da radiação solar (com lonas que reduzem a radiação em 70%) tiveram uma redução nas temperaturas de incubação e produziram mais machos que ninhos sem protecção. Os efeitos da sombra foram também descritos noutros trabalhos (Mrosovsky & Provancha 1992; Wibbels 2003; Kamel 2013). A proporção média de fêmeas em posturas realizadas nas zonas expostas foi de 85% e em zonas de floresta de 17%. As crias sacrificadas que nasceram em ninhos de zonas expostas foram maioritariamente fêmeas, sendo que na maioria destes ninhos (67%) encontrámos apenas fêmeas. Nestas zonas, apenas um ninho produziu uma ninhada que tinha pelo menos 5 machos. Isto pode dever-se à influência das marés a que esteve sujeito, uma vez que foi o ninho monitorizado no habitat exposto localizado mais próximo da linha de maré alta (a 1 m desta). Em 71% dos ninhos da floresta com crias sacrificadas foram encontrados apenas machos. A produção de machos nesta época deve-se assim principalmente aos ninhos localizados em zonas de floresta, estando dependente da sombra das árvores.

No entanto, os ninhos monitorizados na floresta foram sobre-representados; a distribuição dos *loggers* não foi proporcional às áreas de cada tipo de habitat disponível para a nidificação em Poilão. A estimativa da proporção de fêmeas mais próxima da realidade terá sido a obtida a partir das crias mortas por causas aleatórias (53% para o período total de permanência na ilha), porque a falta de proporcionalidade não se reflecte nestas crias, uma vez que foram recolhidas ao longo da ilha e eclodiram a partir de todos os habitats de nidificação disponíveis.

O período de incubação variou significativamente entre os três habitats, sendo mais longo em zonas de floresta. Este resultado foi de acordo com o esperado, uma vez que ninhos mais quentes tipicamente incubam mais rápido, enquanto ninhos com temperaturas mais baixas (em zonas protegidas da exposição solar directa) têm um período de incubação mais longo (Godfrey *et al.* 1999; Broderick *et al.* 2000). Na Guiné-Bissau, Catry *et al.* (2010) demonstraram que posturas efectuadas mais tarde na estação das chuvas têm um desenvolvimento mais rápido, pois desenvolvem-se parcialmente durante o início da época seca, quando a ausência de chuva leva ao aumento da temperatura da areia.

Os parâmetros sucesso de eclosão, sucesso de emergência, dias na areia e profundidade do ninho não variaram significativamente consoante os três diferentes locais da postura. Era esperado que estes parâmetros variassem em relação ao local de nidificação. Por exemplo, o sucesso de eclosão é influenciado pelo local e profundidade do ninho, uma vez que os ovos em incubação são extremamente sensíveis às condições térmicas e hídricas do ninho (Mrosovsky 1994; Broderick *et al.* 2000). O tamanho da amostra relativamente reduzido pode explicar a falta de variância significativa destes parâmetros entre os locais. No entanto, quando se compararam os dois habitats, exposto e de floresta, para além do período de incubação, a variável “dias na areia” e o sucesso de emergência diferiram significativamente. O sucesso de emergência apresentou valores mais baixos em zonas de floresta e o “dias na areia” valores mais elevados nestas zonas. Está descrito que o sucesso de emergência pode ser influenciado pela composição da areia, raízes, profundidade do ninho, entre outros factores (Mortimer 1990). A praia da Cabaceira inclui a maioria do habitat de floresta e nesta praia a areia de facto contém muitas raízes e pedras. Neste habitat, as crias de tartaruga-verde eclodiram sem problema, mas a emergência foi mais dificultada. O parâmetro “dias na areia” está relacionado com a dificuldade que os recém-eclodidos têm a emergir.

A profundidade dos ninhos foi em média menor na floresta (0,78 metros), apesar de esta diferença não ter sido significativa. Este factor não justifica o menor sucesso de emergência das crias nestas zonas (média de 52,01 metros), uma vez que é mais frequente que sejam os ninhos mais profundos a apresentar uma redução no sucesso de emergência (Godfrey & Mrosovsky 1997). Existe portanto, um custo das fêmeas escolherem o solo da floresta para as posturas, uma vez que o sucesso de emergência é menor nestas zonas.

A temperatura da areia variou ao longo da estação e entre os habitats de nidificação, principalmente entre as zonas expostas (exposição solar máxima) e a floresta (zonas sem exposição solar constante) - as diferenças nas temperaturas da areia das 3 zonas aumentaram

ao longo da estação, com a redução da precipitação e o aumento das temperaturas atmosféricas, sendo mais acentuadas na época seca (Figura 5). Do mesmo modo, todos os habitats de nidificação de Poilão serão menos quentes na época das chuvas.

As zonas expostas e de transição foram as mais semelhantes termicamente, com uma diferença média de apenas 0,40 °C, uma vez que a zona de transição durante o dia podia apresentar uma exposição solar semelhante à zona exposta, devido à orientação da praia. Conforme esperado, as temperaturas diárias dos ninhos foram menos variáveis em zonas de floresta em comparação com as outras duas zonas, isto porque a areia de zonas ensombradas foi sujeita a menor exposição solar, tendo assim temperaturas mais constantes (Mrosovsky *et al.* 1992; Kamel 2013).

As temperaturas médias de incubação dos ninhos monitorizados neste estudo variaram entre 28,73 °C e 30,79 °C, estando dentro do intervalo óptimo de temperatura de incubação para a espécie *C. mydas* (Merwe *et al.* 2005).

As previsões de *sex-ratio* resultantes das comparações das temperaturas no TSP dos ninhos analisados com valores publicados de TRT e de temperatura pivotal estiveram de acordo com as proporções dos sexos das crias sacrificadas em cada habitat e com o esperado - ninhos com temperaturas mais quentes (zonas expostas) produziram maioritariamente fêmeas e ninhos mais frios (floresta) produziram a grande quantidade de machos (Yntema & Mrosovsky 1980; Godfrey *et al.* 1999; Broderick *et al.* 2000; Godley *et al.* 2002). A zona de transição é termicamente semelhante à zona exposta e portanto, é também esperado que estas zonas produzam mais fêmeas que machos, o que se verificou. A temperatura pivotal para Poilão ainda está por apurar e assim, estas previsões têm de ser analisadas com precaução, uma vez que pequenas mudanças de décimas de grau podem alterar o sexo de macho para fêmea e vice-versa (Kamel & Mrosovsky 2006).

Para a determinação mais precisa do *sex-ratio* das tartarugas verdes recém-eclodidas seria importante determinar a temperatura pivotal e o TRT para a população de *C. mydas* em Poilão, em vez de extrapolar a partir de dados de outra população, visto que estes parâmetros podem variar entre espécies e entre populações (Godley *et al.* 2002). Este conhecimento tem grandes implicações ao nível da ecologia e conservação das tartarugas marinhas e permite também, uma potencial manipulação do *sex-ratio* das crias no esforço de mudar o *output* reprodutivo de uma população (Mrosovsky & Godfrey 1995).

O período entre a postura e o início do efeito do calor metabólico e as diferenças de temperatura no período entre o início do efeito real do calor metabólico e o último dia do TSP não variaram significativamente consoante o tipo de habitat (exposto e floresta) e o tamanho da postura. O calor metabólico é dos factores que influencia sempre a temperatura dos ninhos. A diferença média entre as temperaturas da areia da floresta e as temperaturas da areia da zona exposta foi de 2,20 °C, enquanto o aquecimento médio causado pelo metabolismo dos embriões foi de 0,26 °C; portanto neste caso a exposição solar foi a que teve mais importância na temperatura dos ninhos. Este aquecimento não está de acordo com o aumento médio das temperaturas de incubação entre 3-6 °C, provocado pelo calor metabólico registado por outros autores (Godfrey *et al.* 1997). Os *loggers* usados neste estudo para o registo das temperaturas de incubação dos ninhos foram colocados no meio da massa de ovos, que será o local da postura onde o efeito do calor metabólico é maior. Apesar disto, o efeito médio do calor metabólico estimado foi muito reduzido, o que pode dever-se à reduzida profundidade dos ninhos (média de 0,83 metros), levando a que a diferença entre o efeito da temperatura atmosférica e o do calor metabólico seja menos evidente.

A fiabilidade do método histológico foi bastante importante para a realização deste trabalho, dadas as taxas de sucesso de identificação mais elevadas deste método, em comparação com os outros, para a determinação do sexo em tartarugas marinhas (Miller & Limpus 2002). O mesmo se pode dizer das nossas amostras, para as quais obtivemos uma taxa de sucesso de identificação do sexo de 98% para as crias sacrificadas e 87% para as crias com morte acidental. A grande maioria das peças não levantou grandes dúvidas para atribuição do sexo, porém, o método histológico não é infalível e estão descritos alguns casos estranhos, como a existência de gónadas intersexo, ou seja, com características dos dois sexos. Noutros casos, a gónada permanece indiferenciada e não há nenhum desenvolvimento claro no sentido de um dos sexos. Devido à extrema importância da temperatura ambiente no desenvolvimento das gónadas, estas variações são provavelmente causadas por mudanças bruscas de temperatura durante o período sensível (Eckert *et al.* 1999). A identificação do sexo dos recém-eclodidos é mais precisa quando se analisa a gónada ou gónada e ductos paramesonéfricos em comparação com a identificação do sexo apenas pela análise destes ductos (Miller & Limpus 2002).

A concordância de identificação do sexo das crias com morte acidental entre observadores foi menor, devido possivelmente à maior degradação a que estão sujeitas antes da recolha, ficando expostas às condições ambientais externas e/ou à predação por parte de outros animais.

Segundo Wibbels (2003), a utilização do método histológico para determinação do sexo exige que as crias sejam sacrificadas ou que sejam encontradas mortas nos ninhos. No caso das crias sacrificadas, podemos afirmar que se tratam efectivamente de amostras aleatórias. As crias que tiveram morte acidental podem constituir um problema à aleatoriedade, no sentido em que é possível que estes casos de morte acidental possam estar relacionados com uma má condição das crias. No entanto, um trabalho anterior (Rebelo *et al.* 2011) mostrou que nesta ilha as crias com morte acidental podem ser usadas para estimar o *sex-ratio* das crias nascidas em toda a ilha.

Em Poilão, o pico de nidificação da tartaruga-verde ocorre entre Agosto e Setembro (Catry *et al.* 2010), com a maioria das eclosões a ocorrer no final de Outubro/início de Novembro. Este estudo decorreu entre 18 de Agosto e 22 de Novembro. A variação da proporção dos sexos nas crias com morte aleatória ao longo da época pode dar a impressão que o *sex-ratio* em Poilão é equilibrado (uma proporção de fêmeas de 53%), mas analisando apenas o período onde a maioria das eclosões ocorreram (zona com destaque a tracejado na Figura 14), verifica-se que a proporção de fêmeas é bastante maior nesta altura (85%).

Embora as regiões tropicais tenham condições ambientais relativamente constantes durante todo o ano, em comparação com as regiões temperadas e polares, estas demonstram também algum nível de sazonalidade (Godley *et al.* 2002), principalmente no que diz respeito à precipitação. São já conhecidos os efeitos que os episódios de chuva extrema podem causar para a determinação de sexo em ninhos naturais. Por exemplo, em climas tropicais as posturas são sujeitas a frequentes períodos de chuva durante a temporada de desova (Houghton *et al.* 2007), como é o caso da ilha de Poilão. Para além da presença de floresta, serão estes episódios de chuva que contribuirão em grande parte para o *sex-ratio* das crias. Uma alteração à época das chuvas, principalmente se as temperaturas de incubação estiverem próximas da temperatura pivotal, pode desequilibrar consideravelmente o *sex-ratio*. Na Guiné-Bissau, os meses de Agosto e Setembro são os mais chuvosos durante a época das chuvas (Catry *et al.* 2010), e deverão estar na origem da quantidade elevada de machos encontrados entre as crias com morte aleatória mais cedo na estação (Figura 14).

Considerações finais

As tartarugas marinhas estão ameaçadas de extinção, e as alterações climáticas em curso provocam variações de temperatura que podem determinar a sustentabilidade das suas

populações. É portanto de extrema importância a existência de estudos que alertem para a necessidade de adequar os planos de conservação às diferentes praias de nidificação.

Até ao momento existem poucos estudos sobre a influência do habitat de nidificação no *sex-ratio* das tartarugas marinhas, sendo importante perceber no futuro se com as alterações climáticas as fêmeas poderão alterar: 1) os comportamentos de nidificação, optando por nidificar em zonas mais frias para assegurar a produção de machos ou 2) a época de nidificação para períodos do ano mais frios (Godley *et al.* 2002). Até à data sabe-se que o local seleccionado pelas tartarugas para a postura não é aleatório, uma vez que este local pode afetar a sobrevivência e o desenvolvimento da prole. Ninhos colocados perto da linha de maré podem ser inundados ou erodidos e ninhos afastados destas zonas aumentam o risco de predação e desorientação das crias. Apesar das zonas de floresta serem importantes para a produção de machos, também podem provocar a desorientação dos recém-eclodidos através da sombra resultante das árvores e arbustos altos (Kamel & Mrosovsky 2006).

Ao longo da sua evolução as tartarugas marinhas conseguiram adaptar-se a alterações climáticas, provavelmente através: 1) alterações no comportamento de nidificação, como a colocação das posturas a maior profundidade e/ou a antecipação das datas para períodos mais frescos; 2) selecção dos locais de postura para locais mais ensombrados ou 3) modulação gradual dos mecanismos fisiológicos que regulam a diferenciação sexual em resposta à temperatura (Mazaris *et al.* 2008; Fuentes *et al.* 2010). Estes mecanismos podem tamponizar o *sex-ratio* das crias dos efeitos do aquecimento global (Telemeco *et al.* 2009). No entanto, os dados genéticos e comportamentais sugerem que as tartarugas marinhas podem não possuir uma capacidade de adaptação suficientemente rápida de modo a que possam compensar os efeitos negativos do aquecimento global (Fuentes *et al.* 2010), uma vez que a velocidade das alterações actuais é muito superior à das alterações do passado geológico (Wibbels 2003).

Os impactos do aquecimento global são mais facilmente observados durante a reprodução, através de alterações no período de incubação, no sucesso de eclosão e na *fitness* dos recém-eclodidos (Hawkes *et al.* 2009). Nas praias de nidificação, o aumento da temperatura, mesmo considerando os valores mais conservadores previstos pelo *Intergovernmental Panel on Climate Change* (2007) de 1,1 - 2,9 °C para 2099, poderá provocar grandes mudanças nos *sex-ratios* dos recém-eclodidos no sentido de uma produção desequilibrada de fêmeas (Parry 2007; Hawkes *et al.* 2009). É necessário uma melhor compreensão de como o *sex-ratio* desequilibrado das tartarugas poderá está a afectar a sua dinâmica populacional (Godfrey *et al.* 1999; Zbinden *et al.* 2006).

Este estudo reforça a importância do papel que a nidificação no solo da floresta terá para a produção de machos, e portanto da existência de diferentes zonas térmicas em Poilão para a produção equilibrada de sexos. Uma vez que Poilão é dos lugares mais importantes para a nidificação de *C. mydas* (Catry *et al.* 2009), seria importante manter/preservar os diferentes habitats de nidificação que compõem esta ilha para a conservação desta espécie de tartaruga marinha. Noutras praias de nidificação importantes para a tartaruga-verde na Guiné, por exemplo no Parque Nacional de Orango, quase todos os ninhos são colocados em zonas expostas. Poilão, por ter floresta, ao contrário de outras ilhas/praias de desova, é assim um local prioritário para a conservação desta espécie.

Para assegurar a produção de um *sex-ratio* mais equilibrado, os planos de conservação mais utilizados passam por aumentar as zonas ensombradas nas praias ou realocar ninhos para locais com temperaturas mais frias, dentro da mesma praia ou em praias diferentes. As vantagens e desvantagens destas técnicas variam entre espécies e locais. Também é importante identificar novas áreas de nidificação, especialmente se as actuais se tornarem insustentáveis devido às alterações climáticas.

Este trabalho foi relevante, visto que se realizou num dos locais mais importantes para a nidificação da tartaruga-verde e por Poilão possuir pelo menos duas zonas de nidificação termicamente distintas (zona exposta e floresta) que podem possibilitar uma produção de sexos mais equilibrada, em comparação com locais que não possuem zonas ensombradas. Se a floresta litoral desaparecer totalmente no futuro, ainda assim haverá produção de machos mas, de apenas 15% do total (60% da produção de machos que é estimado ocorrer actualmente). A conservação da floresta litoral é assim essencial para o equilíbrio do *sex-ratio* desta população de tartarugas marinhas.

Referências bibliográficas*

Ackerman, R. A. 1980. Physiological and ecological aspects of gas exchange by sea turtle eggs. *American Zoologist* **20**:575–583.

Arthur, K. E., M. C. Boyle, and C. J. Limpus. 2008. Ontogenetic changes in diet and habitat use in green sea turtle (*Chelonia mydas*) life history. *Marine Ecology Progress Series* **362**:303–311.

Bell, C. D., J. Parsons, T. J. Austin, A. C. Broderick, G. Ebanks-Petrie, and B. J. Godley. 2005. Some of them came home: the Cayman Turtle Farm headstarting project for the green turtle *Chelonia mydas*. *Oryx* **39**:137–148.

Bjorndal, K. A., A. B. Bolten, and M. Y. Chaloupka. 2000. Green turtle somatic growth model: evidence for density dependence. *Ecological Applications* **10**:269–282.

Bjorndal, K. A., P. L. Lutz, and J. A. Musick. 1997. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. *The biology of sea turtles* **1**:199–231.

Bjorndal, K. A., J. A. Wetherall, A. B. Bolten, and J. A. Mortimer. 1999. Twenty-Six Years of Green Turtle Nesting at Tortuguero, Costa Rica: An Encouraging Trend. *Conservation Biology* **13**:126–134.

Broderick, A. C., R. Frauenstein, F. Glen, G. C. Hays, A. L. Jackson, T. Pelembe, G. D. Ruxton, and B. J. Godley. 2006. Are green turtles globally endangered? *Global Ecology and Biogeography* **15**:21–26.

Broderick, A. C., F. Glen, B. J. Godley, and G. C. Hays. 2003. Variation in reproductive output of marine turtles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **288**:95–109.

Broderick, A. C., B. J. Godley, and G. C. Hays. 2001. Metabolic heating and the prediction of sex ratios for green turtles (*Chelonia mydas*). *Physiological and Biochemical Zoology* **74**:161–170.

Broderick, A. C., B. J. Godley, S. Reece, and J. R. Downie. 2000. Incubation periods and sex ratios of green turtles : highly female biased hatchling production in the eastern Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series* **202**:273–281.

Bull, J. J. 1980. Sex determination in reptiles. *Quarterly Review of Biology* **55**:3–21.

Catry, P., C. Barbosa, and B. Indjai. 2010. Tartarugas marinhas da Guiné-Bissau. Estudo, biologia e conservação. Instituto da Biodiversidade e das Áreas Protegidas, Bissau.

Catry, P., C. Barbosa, B. Indjai, A. Almeida, B. J. Godley, and J. C. Vié. 2002. First census of the green turtle at Poilão, Bijagós Archipelago, Guinea-Bissau: the most important nesting colony on the Atlantic coast of Africa. *Oryx* **36**:400–403.

Catry, P., C. Barbosa, B. Paris, B. Indjai, A. Almeida, B. Limoges, C. Silva, and H. Pereira. 2009. Status, ecology, and conservation of sea turtles in Guinea-Bissau. *Chelonian Conservation and Biology* **8**:150-160.

* Referências bibliográficas de acordo com o modelo da revista científica *Conservation Biology*.

- Ceriani, S. A., and J. Wyneken. 2008. Comparative morphology and sex identification of the reproductive system in formalin-preserved sea turtle specimens. *Zoology* **111**:179–87.
- Chaloupka, M., K. A. Bjorndal, G. H. Balazs, A. B. Bolten, L. M. Ehrhart, C. J. Limpus, H. Suganuma, S. Troëng, and M. Yamaguchi. 2008. Encouraging outlook for recovery of a once severely exploited marine megaherbivore. *Global Ecology and Biogeography* **17**:297–304.
- Chaloupka, M., and C. Limpus. 2005. Estimates of sex-and age-class-specific survival probabilities for a southern Great Barrier Reef green sea turtle population. *Marine Biology* **146**:1251–1261.
- Chaloupka, M., C. Limpus, and J. Miller. 2004. Green turtle somatic growth dynamics in a spatially disjunct Great Barrier Reef metapopulation. *Coral Reefs* **23**:325–335.
- Charnier, M. 1966. Action of temperature on the sex ratio in the *Agama agama* (Agamidae, Lacertilia) embryo. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales* **160**:620.
- Chevalier, J., M. H. Godfrey, and M. Girondot. 1999. Significant difference of temperature-dependent sex determination between French Guiana (Atlantic) and Playa Grande (Costa-Rica, Pacific) leatherbacks (*Dermochelys coriacea*). *Annales des Sciences Naturelles-Zoologie et Biologie Animale* **20**:147–152.
- Cree, A., M. B. Thompson, and C. H. Daugherty. 1995. Tuatara sex determination. *Nature* **375**:543.
- Dizon, A. E., and G. H. Balazs. 1982. Radio Telemetry of Hawaiian Green Turtles at Their Breeding Colony. *Marine Fisheries Review* **44**:13–20.
- Dobbs, K. A., J. D. Miller, C. J. Limpus, and A. M. Landry Jr. 1999. Hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, nesting at Milman Island, northern Great Barrier Reef, Australia. *Chelonian Conservation and Biology* **3**:344–361.
- Eckert, K. L., K. A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois, and M. Donnelly. 1999. Research and management techniques for the conservation of sea turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Washington, DC.
- Ewert, M. A., D. R. Jackson, and C. E. Nelson. 1994. Patterns of temperature-dependent sex determination in turtles. *Journal of Experimental Zoology* **270**:3–15.
- Ewert, M. A., J. W. Lang, and C. E. Nelson. 2005. Geographic variation in the pattern of temperature-dependent sex determination in the American snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Journal of Zoology* **265**:81–95.
- Fortes, O., A. J. Pires, and C. Bellini. 1998. Green turtle, *Chelonia mydas* in the island of Poilão, Bolama-Bijagos Archipelago, Guinea-Bissau, West Africa. *Marine Turtle Newsletter* **80**:8–10.
- Fuentes, M., M. Hamann, and C. J. Limpus. 2010. Past, current and future thermal profiles of green turtle nesting grounds: implications from climate change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **383**:56–64.
- Georges, A., C. Limpus, and R. Stoutjesdijk. 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**:432–444.

- Girondot, M., and C. Pieau. 1999. A fifth hypothesis for the evolution of TSD in reptiles. *Trends in ecology & evolution* **14**:359–360.
- Glen, F., and N. Mrosovsky. 2004. Antigua revisited: the impact of climate change on sand and nest temperatures at a hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting beach. *Global Change Biology* **10**:2036–2045.
- Godfrey, M. H. 1997. Sex ratios of sea turtle hatchlings: direct and indirect estimates. Doctoral dissertation. University of Toronto.
- Godfrey, M. H., R. Barreto, and N. Mrosovsky. 1997. Metabolically-generated heat of developing eggs and its potential effect on sex ratio of sea turtle hatchlings. *Journal of Herpetology* **31**:616–619.
- Godfrey, M. H., A. F. D'Amato, M. Â. Marcovaldi, and N. Mrosovsky. 1999. Pivotal temperature and predicted sex ratios for hatchling hawksbill turtles from Brazil. *Canadian Journal of Zoology* **77**:1465–1473.
- Godfrey, M. H., and N. Mrosovsky. 1997. Estimating the time between hatching of sea turtles and their emergence from the nest. *Chelonian Conservation and Biology* **2**:581–584.
- Godfrey, M. H., and N. Mrosovsky. 2006. Pivotal temperature for green sea turtles, *Chelonia mydas*, nesting in Suriname. *The Herpetological Journal* **16**:55–61.
- Godfrey, M. H., N. Mrosovsky, and R. Barreto. 1996. Estimating past and present sex ratios of sea turtles in Suriname. *Canadian Journal of Zoology* **74**:267–277.
- Godley, B. J., A. C. Broderick, F. Glen, and G. C. Hays. 2002. Temperature-dependent sex determination of Ascension Island green turtles. *Marine Ecology Progress Series* **226**:115–124.
- Godley, B. J., A. C. Broderick, and G. C. Hays. 2001. Nesting of green turtles (*Chelonia mydas*) at Ascension Island, South Atlantic. *Biological Conservation* **97**:151–158.
- Gross, T. S., D. A. Crain, K. A. Bjorndal, A. B. Bolten, and R. R. Carthy. 1995. Identification of sex in hatchling loggerhead turtles (*Caretta caretta*) by analysis of steroid concentrations in chorioallantoic/amniotic fluid. *General and comparative endocrinology* **99**:204–210.
- Hamann, M., M. H. Godfrey, J. A. Seminoff, K. Arthur, P. C. Barata, K. A. Bjorndal, A. B. Bolten, A. C. Broderick, L. M. Campbell, and C. Carreras. 2010. Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endangered Species Research* **11**:245–269.
- Hamann, M., K. Ibrahim, C. Schäuble, A. R. Kassim, and J. M. Whittier. 2001. An integrated approach to hatchery management: data from Peninsula Malaysia. *Proceedings of the 21st Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. Philadelphia, USA.
- Hanson, J., T. Wibbels, and R. E. Martin. 1998. Predicted female bias in sex ratios of hatchling loggerhead sea turtles from a Florida nesting beach. *Canadian Journal of Zoology* **76**:1850–1861.
- Hawkes, L. A., A. C. Broderick, M. H. Godfrey, and B. J. Godley. 2007. Investigating the potential impacts of climate change on a marine turtle population. *Global Change Biology* **13**:923–932.

- Hawkes, L. A., A. C. Broderick, M. H. Godfrey, and B. J. Godley. 2009. Climate change and marine turtles. *Endangered Species Research* **7**:137–154.
- Hays, G. C., J. Ashworth, and M. Barnsley. 2001. The importance of sand albedo for the thermal conditions on sea turtle nesting beaches. *Oikos* **93**:87–94.
- Hays, G. C., B. J. Godley, and A. C. Broderick. 1999. Long-term thermal conditions on the nesting beaches of green turtles on Ascension Island. *Marine Ecology Progress Series* **185**:297–299.
- Hays, G. C., A. Mackay, C. R. Adams, J. A. Mortimer, J. R. Speakman, and M. Boerema. 1995. Nest site selection by sea turtles. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **75**:667–674.
- Hirth, H. F. 1980. Some aspects of the nesting behavior and reproductive biology of sea turtles. *American Zoologist* **20**:507–523.
- Houghton, J. D. R., A. E. Myers, C. Lloyd, R. S. King, C. Isaacs, and G. C. Hays. 2007. Protracted rainfall decreases temperature within leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) clutches in Grenada, West Indies: Ecological implications for a species displaying temperature dependent sex determination. *Journal of experimental marine biology and ecology* **345**:71–77.
- IUCN. 2012. IUCN red list of threatened species. Version 2012.2. International Union for the Conservation of Nature Gland, Switzerland.
- Kamel, S. 2013. Vegetation cover predicts temperature in nests of the hawksbill sea turtle: implications for beach management and offspring sex ratios. *Endangered Species Research* **20**:41–48.
- Kamel, S., and N. Mrosovsky. 2006. Deforestation: risk of sex ratio distortion in hawksbill sea turtles. *Ecological Applications* **16**:923–931.
- Kaska, Y., R. Downie, R. Tippett, and R. W. Furness. 1998. Natural temperature regimes for loggerhead and green turtle nests in the eastern Mediterranean. *Canadian Journal of Zoology* **76**:723–729.
- Kaska, Y., C. Ilgaz, A. Ozdemir, E. Başkale, O. Türkozan, I. Baran, and M. Stachowitsch. 2006. Sex ratio estimations of loggerhead sea turtle hatchlings by histological examination and nest temperatures at Fethiye beach, Turkey. *Die Naturwissenschaften* **93**:338–43.
- Limpus, C. J., and J. D. Miller. 1993. Family cheloniidae. *Fauna of Australia* **2**:133–138.
- Limpus, C. J., P. C. Reed, and J. D. Miller. 1985. Temperature dependent sex determination in Queensland sea turtles: intraspecific variation in *Caretta caretta*. Pages 343–351 in *Biology of Australasian frogs and reptiles*.
- Limpus, C. J., P. C. Reed, and J. D. Miller. 1983. Islands and turtles. The influence of choice of nesting beach on sex ratio. Pages 397–402 in *Proceedings: inaugural Great Barrier Reef conference*. James Cook University Press, Townsville.
- Marcovaldi, M. Â., M. H. Godfrey, and N. Mrosovsky. 1997. Estimating sex ratios of loggerhead turtles in Brazil from pivotal incubation durations. *Canadian Journal of Zoology* **75**:755–770.

- Marshall Graves, J. A., and S. Shetty. 2001. Sex from W to Z: evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *Journal of Experimental Zoology* **290**:449–462.
- Matsuzawa, Y., K. Sato, W. Sakamoto, and K. Bjorndal. 2002. Seasonal fluctuations in sand temperature: effects on the incubation period and mortality of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) pre-emergent hatchlings in Minabe, Japan. *Marine Biology* **140**:639–646.
- Mazaris, A. D., A. S. Kallimanis, S. P. Sgardelis, and J. D. Pantis. 2008. Do long-term changes in sea surface temperature at the breeding areas affect the breeding dates and reproduction performance of Mediterranean loggerhead turtles? Implications for climate change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **367**:219–226.
- McCoy, C. J., R. C. Vogt, and E. J. Censky. 1983. Temperature-controlled sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Journal of Herpetology* **17**:404–406.
- Mendonca, V. M., S. A. Saady, A. A. Kiyumi, and K. Erzini. 2010. Interactions between Green Turtles (*Chelonia mydas*) and Foxes (*Vulpes vulpes arabica*, *V. rueppellii sabaea*, and *V. cana*) on Turtle Nesting Grounds in the Northwestern Indian Ocean: Impacts of the Fox Community on the Behavior of Nesting Sea Turtles at the Ras Al Hadd Turtle Reserve, Oman. *Zoological studies* **49**:437–452.
- Merchant-Larios, H., S. Ruiz-Ramirez, N. Moreno-Mendoza, and A. Marmolejo-Valencia. 1997. Correlation among Thermosensitive Period, Estradiol Response, and Gonad Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and comparative endocrinology* **107**:373–385.
- Merwe, J. Van De, K. Ibrahim, and J. Whittier. 2005. Effects of hatchery shading and nest depth on the development and quality of *Chelonia mydas* hatchlings: implications for hatchery management in Peninsular, Malaysia. *Australian Journal of Zoology* **53**:205–211.
- Miller, J. D. 1999. Determining clutch size and hatching success. *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. KL Eckert, KA Bjorndal, FA Abreu-Grobois, and M. Donnelly (Editors). IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication **4**:124–129.
- Miller, J. D., and C. J. Limpus. 1981. Incubation period and sexual differentiation in the green turtle *Chelonia mydas* L. Pages 66–73 in *Proceedings of the Melbourne Herpetological Symposium*. Zoological Board of Victoria, Parkville, Victoria, Australia.
- Miller, J. D., and C. J. Limpus. 2002. Ontogeny of Marine Turtle Gonads. *The biology of sea turtles* **2**:199.
- Mitchell, N. J., F. W. Allendorf, S. N. Keall, C. H. Daugherty, and N. J. Nelson. 2010. Demographic effects of temperature-dependent sex determination: will tuatara survive global warming? *Global Change Biology* **16**:60–72.
- Mortimer, J. A. 1990. The influence of beach sand characteristics on the nesting behavior and clutch survival of green turtles (*Chelonia mydas*). *Copeia* **3**:802–817.
- Mrosovsky, N. 1988. Pivotal temperatures for loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from northern and southern nesting beaches. *Canadian Journal of Zoology* **66**:661–669.
- Mrosovsky, N. 1994. Sex ratios of sea turtles. *Journal of Experimental Zoology* **27**:16–27.

- Mrosovsky, N., C. Baptistotte, and M. H. Godfrey. 1999. Validation of incubation duration as an index of the sex ratio of hatchling sea turtles. *Canadian Journal of Zoology* **77**:831–835.
- Mrosovsky, N., A. Bass, L. A. Corliss, J. I. Richardson, and T. H. Richardson. 1992. Pivotal and beach temperatures for hawksbill turtles nesting in Antigua. *Canadian Journal of Zoology* **70**:1920–1925.
- Mrosovsky, N., and M. Benabib. 1990. An assessment of two methods of sexing hatchling sea turtles. *Copeia* **2**:589–591.
- Mrosovsky, N., P. H. Dutton, and C. P. Whitmore. 1984. Sex ratios of two species of sea turtle nesting in Suriname. *Canadian Journal of Zoology* **62**:2227–2239.
- Mrosovsky, N., and M. H. Godfrey. 1995. Manipulating sex ratios: turtle speed ahead. *Chelonian conservation and biology* **1**:238–240.
- Mrosovsky, N., and J. Provanca. 1992. Sex ratio of hatchling loggerhead sea turtles: data and estimates from a 5-year study. *Canadian Journal of Zoology* **70**:530–538.
- Owens, D. W., J. R. Hendrickson, V. Lance, and I. P. Callard. 1978. A technique for determining sex of immature *Chelonia mydas* using a radioimmunoassay. *Herpetologica* **34**:270–273.
- Parry, M. L. 2007. *Climate Change 2007: impacts, adaptation and vulnerability: contribution of Working Group II to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.
- Patrício, R., C. Diez, and R. van Dam. 2014. Spatial and temporal variability of immature green turtle abundance and somatic growth in Puerto Rico. *Endangered Species Research* **23**:51–62.
- Pritchard, P. C. 1999. Status of the black turtle. *Conservation Biology* **13**:1000–1003.
- Raynaud, A., and C. Pieau. 1985. Embryonic development of the genital system. *Smith VII*.
- Rebelo, R., C. Barbosa, J. P. Granadeiro, B. Indjai, B. Novais, G. M. Rosa, and P. Catry. 2011. Can leftovers from predators be reliably used to monitor marine turtle hatchling sex-ratios? The implications of prey selection by ghost crabs. *Marine Biology* **159**:613–620.
- Seminoff, J. A. 2004. *Chelonia mydas*. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2009.1.
- Spencer, R. J. 2002. Experimentally testing nest site selection: fitness trade-offs and predation risk in turtles. *Ecology* **83**:2136–2144.
- Spotila, J. R. 2004. *Sea turtles: A complete guide to their biology, behavior, and conservation*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Spotila, J. R., E. A. Standora, S. J. Morreale, and G. J. Ruiz. 1987. Temperature dependent sex determination in the green turtle (*Chelonia mydas*): effects on the sex ratio on a natural nesting beach. *Herpetologica* **43**:74–81.
- Standora, E. A., and J. R. Spotila. 1985. Temperature dependent sex determination in sea turtles. *Copeia* **1985**:711–722.

- Telemeco, R. S., M. J. Elphick, and R. Shine. 2009. Nesting lizards (*Bassiana duperreyi*) compensate partly, but not completely, for climate change. *Ecology* **90**:17–22.
- Tiwol, C. M., and A. S. Cabanban. 2000. All female hatchlings from the open-beach hatchery at Gulisaan Island, Turtle Islands Park, Sabah. Sea turtles of the Indo-Pacific: Research, management, and conservation. Pages 218–227 in ASEAN academic press, London.
- Toland, B. 1991. Great horned owl predation of Atlantic loggerhead turtle hatchlings. *Fla Field Nat* **19**:117–119.
- Tomillo, P. S., F. V. Paladino, J. S. Suss, and J. R. Spotila. 2010. Predation of leatherback turtle hatchlings during the crawl to the water. *Chelonian Conservation and Biology* **9**:18–25.
- Turkozan, O., K. Yamamoto, and C. Yilmaz. 2011. Nest site preference and hatching success of green (*Chelonia mydas*) and loggerhead (*Caretta caretta*) sea turtles at Akyatan Beach, Turkey. *Chelonian Conservation and Biology* **10**:270–275.
- Varghese, S. P., S. Varghese, and V. S. Somvanshi. 2010. Impact of tuna longline fishery on the sea turtles of Indian seas. *Current Science* **98**:1378–1384.
- Wang, H. C., and I. J. Cheng. 1999. Breeding biology of the green turtle, *Chelonia mydas* (Reptilia: Cheloniidae), on Wan-An Island, PengHu archipelago. II. Nest site selection. *Marine Biology* **133**:603–609.
- Warner, D. A., and R. Shine. 2008. The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile. *Nature* **451**:566–568.
- Weisrock, D. W., and F. J. Janzen. 1999. Thermal and fitness-related consequences of nest location in painted turtles (*Chrysemys picta*). *Functional Ecology* **13**:94–101.
- Whitmore, C. P., and P. H. Dutton. 1985. Infertility, embryonic mortality and nest-site selection in leatherback and green sea turtles in Suriname. *Biological Conservation* **34**:251–272.
- Wibbels, T. 2003. Critical approaches to sex determination in sea turtles. *The biology of sea turtles* **2**:103–134.
- Wibbels, T., D. Rostal, and R. Byles. 1998. High pivotal temperature in the sex determination of the olive ridley sea turtle, *Lepidochelys olivacea*, from Playa Nancite, Costa Rica. *Copeia* **1998**:1086–1088.
- Wood, D. W., K. A. Bjorndal, and S. T. Ross. 2000. Relation of temperature, moisture, salinity, and slope to nest site selection in loggerhead sea turtles. *Copeia* **2000**:119.
- Work, T. M., and G. H. Balazs. 2013. A Simple Humane Method to Euthanize a Sea Turtle. *Marine Turtle Newsletter* **136**:5–6.
- Wyneken, J., and D. Witherington. 2001. The anatomy of sea turtles. Southeast Fisheries Science Center, National Marine Fisheries Service, National Oceanic and Atmospheric Administration, US Department of Commerce.
- Yntema, C. L., and N. Mrosovsky. 1980. Sexual differentiation in hatchling loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. *Herpetologica* **36**:33–36.

Yntema, C. L., and N. Mrosovsky. 1982. Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. *Canadian Journal of Zoology* **60**:1012–1016.

Zbinden, J. A., C. Davy, D. Margaritoulis, and R. Arlettaz. 2007. Large spatial variation and female bias in the estimated sex ratio of loggerhead sea turtle hatchlings of a Mediterranean rookery. *Endangered Species Research* **3**:305–312.

Zbinden, J. A., D. Margaritoulis, and R. Arlettaz. 2006. Metabolic heating in Mediterranean loggerhead sea turtle clutches. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **334**:151–157.

Anexos



Figura 1. Dissecação das gónadas de tartaruga-verde recém-eclodida. A seta indica a gónada, estrutura esbranquiçada na superfície ventral do rim.



Figura 2. Registador automático de temperatura (*data logger*), *Tinytag Plus 2 TGP-4017*, usado para o registo das temperaturas de incubação.