

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL

PEDRO IVO CAMPANI DE CASTRO FIGUEIREDO

VERIFICAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE HIBRIDAÇÃO ENTRE TARTARUGA-TIGRE-D'ÁGUA, *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) E TARTARUGA-AMERICANA, *Trachemys scripta* (Thunberg & Schoepff, 1792) (TESTUDINES, EMYDIDAE).

IMBÉ, 2014

PEDRO IVO CAMPANI DE CASTRO FIGUEIREDO

**VERIFICAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE HIBRIDAÇÃO ENTRE *Trachemys dorbigni* E
Trachemys scripta.**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em parceria com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Jurandi Rosa Fagundes

Coorientador: Me. Cariane Campos Trigo

Este trabalho foi elaborado conforme as normas de SILVA *et al.* MANUAL DE TRABALHOS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS: **Orientações práticas à comunidade universitária da uergs**. Porto Alegre: UERGS, 2013. 149p., que segue as normas da ABNT.

Figueiredo, Pedro Ivo Campani de Castro

Verificação da ocorrência de hibridação entre tartaruga-tigre-d'água, *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) e tartaruga-americana, *Trachemys scripta* (Thunberg & Schoepff, 1762) (Testudines, Emydidae)./ Pedro Ivo Campani de Castro Figueiredo. – 2014.

33 f.

Orientador: Nelson Jurandi Rosa Fagundes

Coorientador: Cariane Campos Trigo

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Estadual do Rio Grande do Sul em parceria com Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Ciências Biológicas: Biologia Marinha e Costeira, Osório/Imbé, BR – RS, 2014.

1. Híbridos. 2. Introdução de espécies exóticas. 3. Conservação. 4. Introgessão. I. Fagundes, Nelson Jurandi Rosa, orient. II. Campos, Cariane Trigo, coorient. III. Título.

Adaptado do Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

PEDRO IVO CAMPANI DE CASTRO FIGUEIREDO

**VERIFICAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE HIBRIDAÇÃO ENTRE *Trachemys dorbigni* E
Trachemys scripta.**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em parceria com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Jurandi Rosa Fagundes

Coorientador: Me. Cariane Campos Trigo

Aprovado em:...../...../.....

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Márcio Borges Martins

Dr. Manoel Ludwig da Fontoura Rodrigues

COORDENADOR DA ATIVIDADE:

Trabalho de conclusão II - CBM

Prof. Dr. Paulo Henrique Ott

IMBÉ, 2014

RESUMO

A introdução de espécies exóticas é a segunda principal causa de perda de biodiversidade global e pode contribuir para uma mudança significativa na organização e na funcionalidade das comunidades residentes. Uma das principais causas deste impacto negativo nas populações nativas é a hibridização entre espécies nativas e exóticas que podem produzir descendentes com baixa aptidão através da introgressão, na espécie nativa, de alelos menos adaptados ao contexto ecológico local. No Rio Grande do Sul (RS), as comunidades de *Trachemys dorbigni* estão sendo afetadas pela introdução de subespécies de *T. scripta*: *T. s. elegans* e *T. s. scripta*, nativas da América do Norte. Existem também registros de hibridação entre *T. s. elegans* e outras espécies do gênero *Trachemys* na América Central e América do Norte. Este estudo visa determinar se existe variação suficiente para distinção de híbridos entre *T. dorbigni* e *T. scripta* usando o gene mitocondrial citocromo b (Cytb) e três marcadores nucleares (PRLR, PRL35 e ACA4), além de verificar se a classificação molecular é compatível com as classificações morfológicas descritas para cada espécie. Foram utilizados 40 indivíduos, os quais são provenientes de duas cidades costeiras do RS: Imbé (N = 19) - Centro de Reabilitação (CERAM) do CECLIMAR/IB/UFRGS, e Arroio do Sal (N = 11) - Parque Municipal Natural Tupancy; e de um criadouro de tartarugas no PR - Reserva Romanetto (N = 10). Com base na morfologia, 19 indivíduos foram identificados como *T. dorbigni*, 10 como *T. Scripta*, e 12 como híbridos em potencial. Um pequeno fragmento de membrana interdigital foi amostrado para análise genética, e o DNA foi extraído utilizando o método do CTAB. A técnica de PCR foi utilizada para amplificar os fragmentos de Cytb e nucleares para cada indivíduo. As amplificações foram checadas em gel de agarose, e as amplificações com boa qualidade foram purificadas enzimaticamente (ExoI e SAP) e sequenciadas pelo método de Sanger. Os cromatogramas foram verificados e a sequência de consenso para cada indivíduo foi montada no programa Genious. As sequências foram alinhadas no programa Bioedit em conjunto com outras sequências para estas espécies encontradas no GenBank. O programa MEGA5 foi utilizado para estimar as distâncias genéticas entre as diferentes espécies. Apesar das baixas distâncias genéticas entre espécies, todos os marcadores aqui estudados podem inequivocamente discrimina-las demonstrar a existência de hibridismo devido à presença de posições diagnósticas no alinhamento. A maioria dos indivíduos tiveram linhagens genéticas correspondentes à sua classificação com base na morfologia, com exceção de seis espécimes, os quais foram morfológicamente classificados como híbridos mas geneticamente apresentaram linhagens de *T. s. elegans*. Os indivíduos com problemas na classificação podem ser resultantes de retrocruzamento entre híbridos ou entre híbridos e *T. s. elegans*. Alternativamente, a variação morfológica de *T. s. elegans* pode estar sendo subestimada. A existência de híbridos mostra que pode haver introgressão do DNA na espécie nativa, o que sugere que a liberação ou a fuga de indivíduos exóticos na natureza pode ter consequências para a conservação e sobrevivência de *T. dorbigni* a longo prazo.

PALAVRAS-CHAVE: Híbridos. Introdução de espécies exóticas. Conservação. Introgressão.

ABSTRACT

The introduction of exotic species is the second leading cause for the loss of global biodiversity and may also contribute for a significant change in the organization and functionality of resident communities. One of the main causes for this negative impact on native populations occurs through hybridization between native and alien species, which may produce offspring with low fitness due to introgression of less adapted alleles in the native species. In Rio Grande do Sul State (RS) , Southern Brazil, the communities of *Trachemys dorbigni* may be affected by the introduction of two subspecies of *T scripta*: *T. s. elegans* and *T. s. scripta*, both native to North America. There are records of hybridization between *T. s. elegans* and other *Trachemys* species in Central and North America. This study aims to determine whether there is enough variation to identify hybrids among *T. dorbigni*, *T. s. scripta*, and *T. s. elegans* using the mitochondrial cytochrome b gene (Cytb) and three nuclear markers (PRLR, PRL35 and ACA4), and whether such molecular classification is compatible with the morphological characteristics of each species. Forty individuals, from two coastal cities in RS were surveyed: Imbé (N = 19) - Rehabilitation Center (CERAM) of CECLIMAR/IB/UFRGS, Arroio do Sal (N = 11) - Parque Natural Municipal Tupancy; and from a turtle breeder property in PR - Reserva Romanetto (N = 10). Based on morphological characteristics, 19 individuals were identified as *T. dorbigni*, 10 as *T. scripta* and 12 as putative hybrids. A small fragment of the interdigital membrane was sampled for genetic analysis, and DNA was extracted using the CTAB method. We used PCR to amplify a fragment of Cytb and the three mentioned nuclear markers for each individual. Amplifications were checked on agarose gel and good quality amplifications were purified enzymatically (ExoI and SAP) and sequenced by the Sanger method. Chromatograms were checked by eye and the consensus sequence for each individual was assembled in the program Genious. Sequences were aligned in the program Bioedit together with other sequences for these species found in the Genbank. The program MEGA 5 was used to estimate genetic distances between different species. Despite the low genetic distances between species, all markers surveyed can unambiguously discriminate them and demonstrate the existence of hybrids due to the presence of diagnostic positions in the alignment. Most individuals have genetic lineages corresponding to their morphological classification, with the exception of six specimens, which were morphologically classified as hybrids, had genetic strains of *T. s. elegans*. Individuals with classification problems may result from backcrossing between hybrids and between hybrids and *T. s. elegans*. Alternatively, morphological variation of *T. s. elegans* may be underestimated. The existence of hybrids shows that there may be DNA introgression in the native species, suggesting that the release or escape of the exotic species in the wild can have consequences for the conservation and long-term survival of *T. dorbigni*.

KEYWORDS: Hybrids. Introduction of exotic species. Conservation. Introgression.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
4. RESULTADOS.....	17
5. DISCUSSÃO.....	25
6. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

A introdução de espécies exóticas é a segunda principal causa de perda de biodiversidade global e pode contribuir para uma mudança significativa na organização e na funcionalidade das comunidades residentes. Uma das principais causas deste impacto negativo nas populações nativas é a hibridização entre espécies nativas e exóticas que podem produzir descendentes com baixa aptidão através da introgressão, na espécie nativa, de alelos menos adaptados ao contexto ecológico local. No Rio Grande do Sul (RS), as comunidades de *Trachemys dorbigni* estão sendo afetadas pela introdução de subespécies de *T. scripta*: *T. s. elegans* e *T. s. scripta*, nativas da América do Norte e existem registros de hibridação entre *T. s. elegans* e outras espécies do gênero *Trachemys* na América Central e América do Norte. *Trachemys dorbigni* trata-se de uma espécie de distribuição natural restrita no sul do Brasil, Uruguai e nordeste da Argentina, e, contudo, não existe nenhum estudo para verificar a ocorrência de hibridação entre ela e a espécie introduzida. O objetivo geral do presente estudo é verificar a existência de hibridação entre a espécie nativa e a espécie exótica. Os objetivos específicos são: verificar se existe evidência no DNA mitocondrial, Citocromo B (CytB), e em três marcadores nucleares (PRLR, PRL 35 e ACA4) de cruzamento interespecífico entre as espécies do gênero *Trachemys*, se há possibilidade de identificação morfológica dos híbridos na natureza, e, se não, qual poderia ser a forma mais rápida e viável de identificação desses indivíduos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A ordem Testudines é composta de duas subordens: Pleurodira e Cryptodira. A primeira é encontrada, atualmente, apenas no hemisfério sul, sendo restrita ao habitat de água doce e constitui-se em três famílias: Chelidae, Pelomedusidae e Podocnemidae. A subordem Cryptodira possui o maior número de espécies viventes, que podem ser encontradas em quase todos os continentes, sendo representada pelos jabutis e tartarugas límnicas e marinhas (POUGH et al., 1999). A família Emydidae, da subordem Cryptodira, é representada por 40 espécies reconhecidas atualmente, distribuídas em 10 gêneros (VANZOLINI, 1995). Na América do Norte é a família de quelônio mais abundante, com o maior número de espécies e o grupo de tartarugas mais ecologicamente diverso. Também ocorrem na América Central, oeste da Índia, América do Sul, Europa e norte da África (STEPHENS e WIENS, 2003). O gênero *Trachemys*, da família Emydidae, possui a mais ampla distribuição do que qualquer outro gênero de tartaruga na América, ocorrendo desde Michigan, nos Estados Unidos, até a Argentina, incluindo as Ilhas do Caribe, no Golfo do México (SEIDEL, 2002). Atualmente, são descritos para esse gênero um total de 17 espécies e algumas subespécies (DIJK et al., 2011).

Trachemys scripta (Thunberg & Schoepff, 1792) é uma tartaruga de água doce com uma distribuição natural no leste dos Estados Unidos e áreas adjacentes do nordeste do México (BRINGSOE, 2006). Três subespécies são reconhecidas: *T. s. elegans* (Wied, 1839), *T.s.scripta* (Thunberg & Schoepff, 1792) e *T. s. troostii* (Holbrook, 1836) (DIJK et al., 2011). Entre as três subespécies, duas têm registro de ocorrência no Brasil, devido ao comércio de animais de estimação (BUJES, 2008). *Trachemys scripta elegans*, conhecida popularmente como tartaruga-de-orelha-vermelha, tem sua distribuição natural no Vale do Rio Mississipi, ocorrendo desde o estado de Illinois até o Golfo do México (FRITZ & HAVAŠ 2006). Esta espécie foi introduzida em diversas regiões do globo, principalmente pelo comércio de animais de estimação, e tem estabelecido populações naturalizadas a partir de solturas ou escape dos cativeiros (ARESCO, 2004). Existem poucos estudos acerca da introdução de *T. s. elegans* nos ambientes aquáticos do Rio Grande do Sul que avaliem a situação e o impacto causado pela introdução dessa espécie no Estado (BUJES, 2008). Já *Trachemys scripta scripta*, ou tartaruga-de-barriga-amarela, ocorre na região sudeste dos Estados Unidos em simpatia com *T. s. elegans* (DIJK et al., 2011). Com a proibição da venda de espécimes de *T. s. elegans* como animal de estimação em vários países, houve o início da comercialização de

T. s. scripta, mas pelo valor mais elevado e a menor quantidade de animais vendidos essa subespécie ainda não se tornou uma invasora em potencial (BRINGSOE, 2006).

Trachemys dorbigni (Duméril & Bibron, 1835) é nativa da região sul da América do Sul. A área de distribuição da espécie abrange o extremo sul do Brasil, todo o Uruguai e o nordeste da Argentina (LEMA & FERREIRA 1990). No Rio Grande do Sul a espécie é um dos mais abundantes quelônios de água doce. Apesar de endêmica do Estado, muitos indivíduos já foram introduzidos em outros estados brasileiros (BUJES & VERRASTRO 2007).

A espécie nativa se distingue por apresentar linha pós-orbital de coloração amarela, plastrão uniformemente enegrecido a partir da linha mediana, das suturas transversais e dos escudos inframarginais. A região da ponte apresenta manchas irregulares que também acompanham as suturas entre os escudos. Por outro lado, *Trachemys scripta elegans* apresenta uma linha pós-orbital de coloração vermelha, plastrão amarelado com ocelos (manchas circulares isoladas) enegrecidos, dispostos um em cada escudo, porção superior dos escudos inframarginais com manchas circulares pretas e ocelos com uma linha difusa por baixo. A região da ponte é clara ou com manchas muito difusas (BUJES, 2008). A segunda subespécie exótica, *Trachemys scripta scripta*, apresenta faixas verticais amarelas entre os escudos vertebrais e os escudos marginais, plastrão de coloração amarela, geralmente com ocelos nos escudos gulares e humerais, além de possuir uma mancha amarela vertical visível por trás do olho (BRINGSOE, 2006) (Figura 1).

Trachemys dorbigni



Casco

Trachemys scripta elegans



Casco

Trachemys scripta scripta



Casco



Plastrão



Linha pós-orbital



Plastrão



Linha pós-orbital



Plastrão



Linha pós-orbital

Figura 1: Detalhes dos aspectos morfológicos descritos para *Trachemys dorbigni* (à direita, apresentando linha pós-orbital amarela, plastrão com mancha uniformemente enegrecida e casco com coloração verde e amarela com manchas pretas e com machas elípticas), *Trachemys scripta elegans* (no centro, apresenta linha pós-orbital vermelha, plastrão amarelado com ocelos e uma linha transversal de cor amarela dispostas uma em cada escudo do casco) e *Trachemys scripta scripta* (à esquerda, linha pós-orbital transverso de coloração amarela, plastrão uniformemente amarelo, podendo ocorrer ocelos nos escudos proximais e casco de coloração esverdeada com largas faixas verticais amarelas dispostas uma em cada escudo do casco). FONTE: Pedro Figueiredo, BUJES (2008) e BRINGSOE (2006).

O tráfico e a introdução de espécies exóticas em ambientes naturais acabam contribuindo na alteração da organização e funcionalidade das comunidades residentes por predação, transmissão de agentes parasitários, hibridação e exclusão por competitividade territorial (FERRONATO *et al.*, 2009). A comercialização clandestina da espécie *Trachemys scripta elegans* oriunda dos Estados Unidos, como animal de estimação no Brasil, trouxe uma série de problemas para a espécie nativa (ATAIDE, 2012). Desde 1970, a espécie foi criada em grande número nos EUA para o comércio como animal de estimação (CADI & JOLI, 2004). A introdução dos espécimes se dá, principalmente, pela libertação indevida ou fuga de tartarugas do cativeiro para a natureza especialmente em áreas urbanas, como parques e praças. Como consequência, essa espécie já foi introduzida em vários países pelo mundo

(FERRONATO, *et al.*, 2009). *Trachemys scripta elegans* foi a tartaruga mais popular no comércio de animais de estimação com mais de 52 milhões de indivíduos exportados dos Estados Unidos para o mundo entre os anos de 1989 e 1997 (TELECKY, 2001). Espécies exóticas invasoras são uma das principais e mais crescentes ameaças à segurança tanto alimentar, sanitária e da biodiversidade (HAHN, 2005). Uma análise recente dos dados da Lista Vermelha da IUCN ressaltou que as espécies exóticas invasoras são a quinta mais séria ameaça aos anfíbios e a terceira mais séria ameaça às aves e mamíferos, e que juntamente com as mudanças climáticas, as espécies exóticas invasoras tornaram-se uma das ameaças mais difíceis de reverter (IUCN, 2013).

O processo de hibridação é definido como o cruzamento entre indivíduos de populações geneticamente distintas, sendo que a introdução de espécies exóticas pode ainda gerar uma “extinção genética” devido à hibridação (RHYMER & SIMBERLOFF, 1996). A hibridação pode ocorrer naturalmente entre algumas espécies, como o cruzamento entre coiotes e lobos na América do Norte (MALLET, 2005). Atualmente o número de trabalhos realizados com hibridação interespecífica tem aumentado, principalmente por causa dos avanços com estudos de múltiplos genes funcionais e de marcadores neutros, mas ainda assim existem várias questões sem resposta, como por exemplo, quais são as consequências entre o cruzamento de espécies exóticas invasoras e nativas (SHWENK, BREDE & STREIT, 2008). A identificação de híbridos se torna importante também para descrever relações taxonômicas, e o caso de introgressão genética de uma espécie exótica dentro de uma população nativa tem grandes implicações para a conservação (PARHAM *et al.*, 2013).

Há registros de hibridação e introgressão ocorrendo entre espécies do gênero *Trachemys*. Segundo PARHAM *et al.* (2013) as comparações de árvores de espécies combinadas com a morfologia e a distribuição geográfica das amostras com alelos incompatíveis sugerem fortemente a ocorrência de hibridização entre as linhagens de tartarugas de água doce da América Central Insular. Dados coletados pelos autores, tanto de espécimes continentais (América Central e EUA) como insulares sugeriram que provavelmente a hibridação ocorra sempre que haja contato entre duas taxa do gênero. Casos de hibridação envolvendo a subespécie americana *Trachemys scripta elegans* foram observados em Porto Rico, e outro caso semelhante envolvendo subespécie *T. s. elegans* foi observado na América Central, nas Ilhas Cayman, onde essa espécie é invasora em relação à *Trachemys decussata angusta*. Há também registro de hibridação entre *Trachemys scripta elegans* e *Trachemys gaigeae gaigeae*, espécie classificada como vulnerável pela Lista

Vermelha da IUCN, que possui uma distribuição restrita, entre o Texas, nos EUA e norte do México. Os resultados do estudo mostram que vem ocorrendo uma forte introgressão de alelos da subespécie exótica dentro da população nativa (JACKSON, 2010; IUCN, 2013).

O objetivo geral do presente estudo é verificar a existência de hibridação entre a espécie *Trachemys dorbigni* e a espécie *Trachemys scripta*. Os objetivos específicos são: verificar se existe evidência no DNA mitocondrial, Citocromo B (CytB), e em três marcadores nucleares (PRLR, PRL 35 e ACA4) de cruzamento interespecífico entre as espécies do gênero *Trachemys*, verificar se a classificação molecular é compatível com as classificações morfológicas descritas para cada espécie, se há possibilidade de identificação morfológica dos híbridos na natureza, e, se não, qual poderia ser a forma mais rápida e viável de identificação desses indivíduos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado principalmente ao longo do Litoral Norte do Rio Grande do Sul. As amostras foram coletadas de espécimes provenientes de corpos d'água localizados no município de Arroio do Sal. As amostras oriundas de Arroio do Sal foram coletadas no Parque Natural Municipal Tupancy ($29^{\circ}29'25''S$, $49^{\circ}50'36''W$). Além disso, espécimes recebidos no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres e Marinhos (CERAM), do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CECLIMAR/IB/UFRGS) localizado no município de Imbé também foram utilizados, por se tratar de um antigo centro de referência no Litoral Norte do RS para recebimento de animais silvestres algumas tartarugas recebidas não foram devidamente registradas, não sendo possível determinar a procedência exata dessas, e, as quais tinham registros completos, eram todas provenientes da criação como animais de estimação e foram deixadas lá por proprietários que não as queriam mais (Figura 2). Também foram utilizadas amostras provenientes da Reserva Romanetto, um criadouro de tartarugas localizado no Paraná, no município de Morretes (Figura 3). Esse criadouro tem como finalidade a comercialização de indivíduos de *Trachemys dorbigni* como animais de estimação, mas também recebe animais da espécie exótica *Trachemys scripta* e, por causa da fuga de alguns desses indivíduos exóticos para os tanques de criação da *T. dorbigni*, haviam relatos de possíveis casos de hibridação entre os indivíduos das duas espécies em cativeiro.

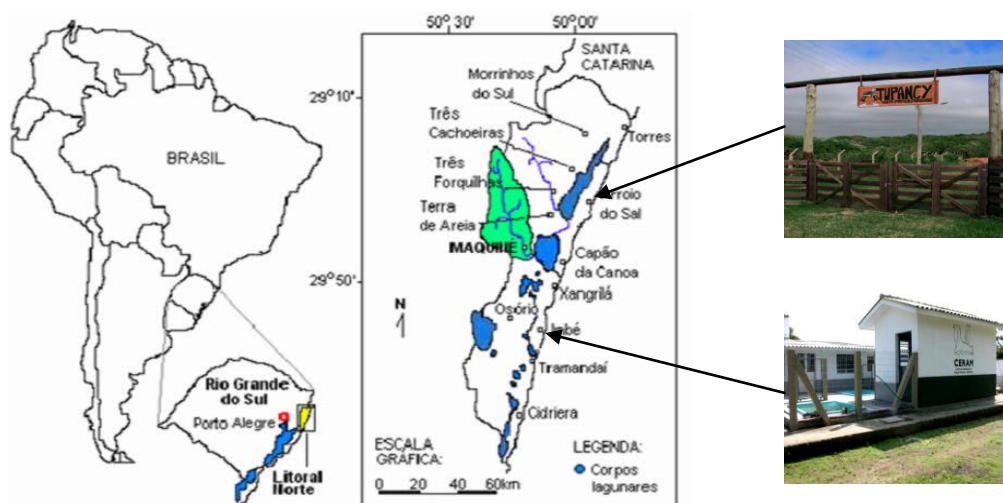


Figura 2: Locais de coleta de *Trachemys spp.* no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, em destaque o Parque Natural Municipal Tupancy no município de Arroio do Sal e o Centro de Reabilitação de Animais Silvestres e Marinhos (CERAM) no município de Imbé.



Figura 3: Destaque do local de coleta no Litoral do Paraná, na Cidade de Morretes.

Os espécimes foram medidos (comprimento total = CT; largura curvilínea do casco = LCC), pesados, sexados quando possível e marcados para evitar recaptura. Para a análise genética foi utilizado um fragmento de tecido da membrana interdigital. Foram utilizadas amostras de 40 animais, em Imbé foram amostrados 19 indivíduos, em Arroio do Sal foram 11 e no criadouro de tartarugas no PR - Reserva Romanetto, um total de 10. Com base na morfologia, 19 espécimes foram identificados como sendo da espécie nativa (*Trachemys dorbigni*), nove espécimes da subespécie exótica (*Trachemys scripta elegans*), um espécime da subespécie *Trachemys scripta scripta* e 12 espécimes identificados morfologicamente como híbridos em potencial. A identificação das espécies foi feita em campo, levando em consideração as características morfológicas, como coloração da linha pós-orbital, manchas no plastrão, sutura dos escudos inframarginais e coloração da região da ponte, conforme descrito em BUJES (2008) e em BRINGSOE (2006).

As amostras de tecido foram levadas ao Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde foi realizada a extração do DNA utilizando o método “CTAB”. Quatro marcadores moleculares, sendo um mitocondrial (citocromo b - Cytb) e três nucleares (PRLR, PRL35 e ACA4) foram selecionados para amplificação por PCR usando os *primers* e condições específicas para os genes amplificados. Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 1% com DNA corado com 1µl de GelRed em 1ml de BFB 10%. Após, os produtos de PCR foram purificados enzimaticamente com exonuclease I e *shrimp alkaline phosphatase* (ExoI e SAP) e enviados para sequenciamento em uma empresa terceirizada. Os cromatogramas foram conferidos visualmente, e as sequências consenso foram geradas, para cada indivíduo, utilizando-se o programa Geneious (BIOMATTERS, 2005). As sequências foram alinhadas e editadas no programa BioEdit (HALL, 1999). O alinhamento também contou com sequências disponíveis no GenBank para o gene CytB (n =

9, sendo três de *T. dorbigni*, três de *T. s. scripta* e três de *T. s. elegans*). Para todos os genes, a distância genética entre as diferentes sequências foi estimada a partir do modelo de Kimura-2 parâmetros (KIMURA, 1980), e uma árvore de neighbor-joining (SAITOU & NEI, 1980) foi estimada para avaliar a posição das linhagens dos indivíduos de morfologia intermediária em relação aos indivíduos de morfologia “típica” parental. Todas as análises evolutivas foram realizadas no programa MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011).

4. RESULTADOS

Para a identificação genética das espécies a partir dos marcadores utilizados foram usados como base sítios diagnósticos encontrados em cada gene estudado. Esses sítios se mostraram eficientes na diferenciação das espécies e na identificação dos híbridos. O fragmento de 705bp do Cytb apresentou uma distância média de 5,2% entre *T. dorbigni* e *T. scripta*, e de 0,68% entre as subespécies de *T. scripta*. Mesmo a baixa distância genética entre *T. s. scripta* e *T. s. elegans*, permite uma boa discriminação entre as duas, devido à presença de três nucleotídeos diagnósticos no alinhamento, e a diferença entre a espécie nativa e a espécie exótica é de 27 sítios diagnósticos (Tabela 1).

Tabela 1: Sítios diagnósticos do citocromo B (CytB) analisados para a identificação das espécies: *Trachemys dorbigni*, *Trachemys scripta elegans* e *Trachemys scripta scripta*.

ESPÉCIE	POSIÇÃO														
	19	27	30	39	47	54	69	82	119	150	153	210	235	357	365
<i>T. dorbigni</i>	C	C	C	T	C	T	C	C	T	C	C	G	C	C	A
<i>T. s. elegans</i>	T	T	T	C	T	C	T	C	C	T	T	A	T	T	G
<i>T. s. scripta</i>	T	T	T	C	T	C	T	T	C	T	T	A	T	T	G
Híbridos de <i>T. d. X</i> <i>T. s. e.</i>	C	C	C	T	C	T	C	C	T	C	C	G	C	C	A

ESPÉCIE	POSIÇÃO														
	391	438	462	463	474	475	544	576	582	600	633	651	657	660	711
<i>T. dorbigni</i>	C	A	C	C	C	A	G	T	C	A	C	C	C	T	A
<i>T. s. elegans</i>	T	G	T	A	T	G	A	C	C	C	T	T	T	C	G
<i>T. s. scripta</i>	T	G	T	A	T	G	G	C	T	C	T	T	T	C	G
Híbridos de <i>T. d. X</i> <i>T. s. e.</i>	C	A	C	C	C	A	G	T	C	A	C	C	C	T	A

Para os marcadores nucleares foram observados poucos sítios diagnósticos, apenas quatro no marcador PRL35, um no PRLR e quatro no ACA4 (Tabela 2-4). Porém, mesmo com poucos marcadores diferenciais foi possível a discriminação das espécies e subespécies a partir desses sítios, pois cada espécie apresenta um alelo exclusivo nessas posições. Os híbridos também foram identificados a partir dos mesmos sítios, que apresentam evidências de heterozigose entre as linhagens de *T. dorbigni* e *T. s. elegans*.

A distância média observada entre *T. dorbigni* e *T. scripta* no fragmento de 515pb do PRL35 foi de aproximadamente 0,4% e entre as subespécies de *T. scripta* foi de apenas 0,2%. No fragmento de 561pb do PRLR, a maior distância foi verificada entre as duas subespécies da espécie exótica (0,4%) em comparação à distância entre a espécie nativa e a exótica (0,2%). O fragmento de 200pb do ACA4 apresentou uma distância de aproximadamente 2,5% entre *T. dorbigni* e *T. scripta* e não apresentou nenhum sítio diagnóstico entre as subespécies de *T. scripta*.

Tabela 2: Sítios diagnósticos do marcador nuclear PRL 35 analisados para a identificação das espécies: *Trachemys dorbigni*, *Trachemys scripta elegans* e *Trachemys scripta scripta*.

ESPÉCIE	POSIÇÃO				
	83	273	372	435	509
<i>T. dorbigni</i>	A	C	G	G	T
<i>T. s. elegans</i>	G	A	C	G	C
<i>T. s. scripta</i>	G	A	C	T	C
Híbridos de <i>T. d.</i> X <i>T. s. e</i>	A/G	C/A	G/C	G	T/C

Tabela 3: Sítios diagnósticos do marcador nuclear PRLR analisados para a identificação das espécies: *Trachemys dorbigni*, *Trachemys scripta elegans* e *Trachemys scripta scripta*.









ESPÉCIE	POSIÇÃO	
	85	228
T. dorbigni	C	T
T. s. elegans	C	C
T. s. scripta	T	C
Híbridos de T. d. X T. s. e	C	T/C

Tabela 4: Sítios diagnósticos do marcador nuclear ACA 4 analisados para a identificação das espécies: *Trachemys dorbigni*, *Trachemys scripta elegans* e *Trachemys scripta scripta*.

ESPÉCIE	POSIÇÃO			
	20	152	166	172
T. dorbigni	G	A	G	G
T. s. elegans	A	T	T	T
T. s. scripta	A	T	T	T
Híbridos de T. d. X T. s. e	G/A	A/T	G/T	G/T

Para a maioria dos 40 indivíduos amostrados, a classificação morfológica se mostrou eficiente, com exceção de seis indivíduos classificados morfológicamente como híbridos, sendo quatro provenientes do CERAM e outros dois da Reserva Romanetto. Nos demais indivíduos classificados como híbridos, a morfologia observada se mostrou diagnóstica para a classificação dos espécimes provenientes do criadouro no Paraná, pois apresentavam características de ambas as espécies. Estes possuíam ocelos no plastrão, característicos de *T. s. elegans*, contudo, agrupando-se na linha mediana do plastrão, como se fossem formar uma mancha uniforme e enegrecida, conforme observado em *T. dorbigni*. Outra característica é a linha pós-orbital fortemente alaranjada, além do casco, que também apresenta uma mistura de características da espécie nativa e da subespécie exótica *T. s. elegans*. O casco exibe linhas amarelas em cada um de seus escudos epidérmicos, como na subespécie exótica, mas essas

linhas em vez de serem verticais, tendem a uma forma elíptica, que é característica descrita para *T. dorbigni* (CABRERA, 1998).

Indivíduo	Casco	Plastrão	Linha pós-orbital
TD 34			
TD 37			
TD38			
TD 39			

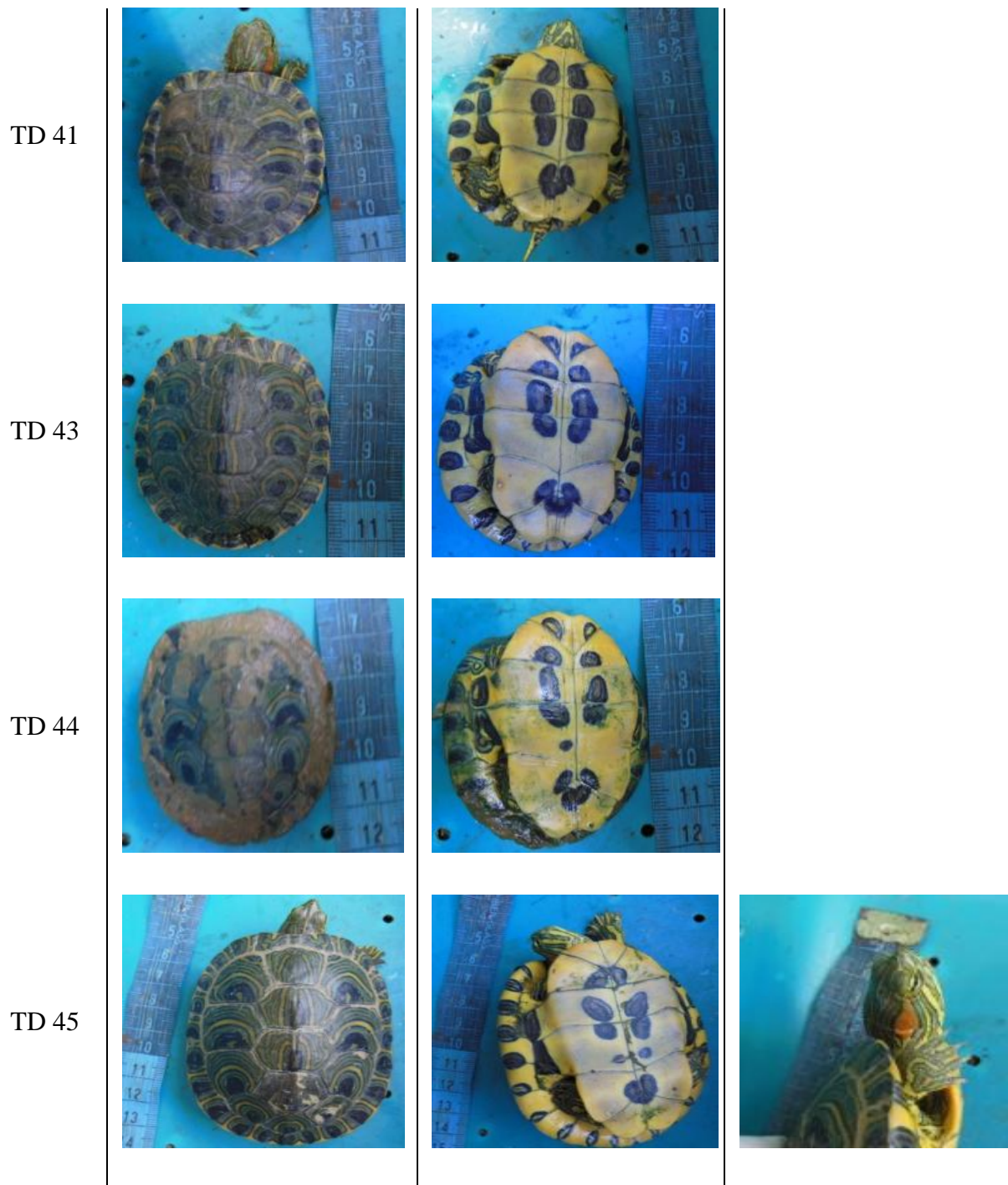


Figura 4: Híbridos entre *T. dorbigni* e *T. s. elegans* utilizados no presente estudo. Detalhe das características morfológicas descritas, a direita a morfologia do casco linhas amarelas em cada um de seus escudos epidérmicos que tendem a uma forma elíptica, no centro o plastrão com ocelos que se agrupam na linha mediana tendendo a formar uma mancha enegrecida uniforme e a esquerda o detalhe da linha pós-obital fortemente alaranjada.

Dentre todos os indivíduos das subespécies exóticas analisados, apenas um foi capturado em ambiente natural, no Parque Municipal Natural Tupancy. Todos os híbridos analisados foram provenientes de cativeiro, já os outros indivíduos de *T. s. elegans* e o

espécime de *T. s. scripta* foram coletados no Museu do CECLIMAR, esses geralmente são animais recebidos pelo Centro de Reabilitação (CERAM) de proprietários que querem desfazer-se do animal ou são encontrados na natureza, mas por falta de registro, não é possível determinar sua origem. Entre os indivíduos nativos utilizados no presente estudo, todos foram amostrados no CERAM e no Parque Municipal Natural Tupancy.

Todos os híbridos amostrados mostraram linhagens de mtDNA de *Trachemys dorbigni*, mostrando assim uma descendência de cruzamento entre macho de *T. s. elegans* e fêmea de *T. dorbigni*. Além disso, todos os indivíduos classificados como híbridos apresentaram heterozigose nos sítios diagnósticos, com exceção de dois indivíduos (TD 37 e TD 38), que morfologicamente foram classificados como híbridos, mas que apresentaram apenas a linhagem correspondente a *T. scripta* no marcador ACA4, não apresentando heterozigose nos sítios diagnósticos desse loco. Esses dois espécimes foram coletados na Reserva Romanetto, no Paraná (Tabela 5).

Tabela 5: Detalhe da comparação entre a classificação morfológica e a classificação genética encontrada para cada indivíduo utilizado no estudo, demonstrando a discordância de classificação em alguns indivíduos e a confirmação da classificação morfológica com a genética nos demais. As células em branco indicam que os sequenciamentos para os marcadores não resultaram em cromatogramas de boa qualidade, impedindo assim a sua leitura, as em amarelo indicam os indivíduos classificados como *T. dorbigni*, as de coloração vermelha as *T. s. elegans*, as verdes os indivíduos classificados como *T. s. scripta* e as laranjas os classificados como híbridos.

Indivíduo	Classificação Morfológica	CytB	PRLR	PRL 35	ACA 4
TD 01	T. dorbigni				
TD 02	T. dorbigni				
TD 03	T. dorbigni				
TD 07	T. dorbigni				
TD 08	T. dorbigni				
TD 26	T. dorbigni				
TD 27	T. dorbigni				
TD 28	T. dorbigni				
TD 29	T. dorbigni				

TD 30	T. dorbigni				
TD 31	T. dorbigni				
TD 35	T. dorbigni				
TD 36	T. dorbigni				
TD 46	T. dorbigni				
TD 48	T. dorbigni				
TD 49	T. dorbigni				
TD 50	T. dorbigni				
TD 51	T. dorbigni				
TD 11	T. s. elegans				
TD 15	T. s. elegans				
TD 18	T. s. elegans				
TD 19	T. s. elegans				
TD 21	T. s. elegans				
TD 22	T. s. elegans				
TD 23	T. s. elegans				
TD 32	T. s. elegans				
TD 47	T. s. elegans				
TD 13	T. s. scripta				
TD 12	Híbrido				
TD 14	Híbrido				
TD 17	Híbrido				
TD 33	Híbrido				
TD 34	Híbrido				
TD 37	Híbrido				
TD 38	Híbrido				

TD 39	Híbrido				
TD 41	Híbrido				
TD 43	Híbrido				
TD 44	Híbrido				
TD 45	Híbrido				

5. DISCUSSÃO

Os métodos utilizados no presente estudo confirmam a possibilidade de hibridação entre *Trachemys dorbigni* e *Trachemys scripta elegans*. Também demonstraram que a classificação morfológica foi eficiente para a identificação da maioria dos espécimes utilizados, com apenas poucos indivíduos não se enquadrando nesta classificação. Isto demonstra que a análise morfológica é bastante viável para ser utilizada em campo e permite, na maioria dos casos, uma correta identificação das espécies e subespécies. Entretanto, os resultados mostram que não se deve levar em consideração apenas uma forma de identificação, pois os indivíduos classificados morfolologicamente como possíveis híbridos apresentaram genótipo de *T. s. elegans*, demonstrando que podem ocorrer erros ao se usar apenas um método de identificação (Figura 5). Os caracteres morfológicos se mostraram uniformes em todos os indivíduos nativos e na maioria dos espécimes exóticos analisados neste estudo, confirmando a descrição feita por BUJES (2008) para *Trachemys dorbigni* e *Trachemys scripta elegans* e para *Trachemys scripta scripta*, feita por BRINGSOE (2006).



Figura 5: Indivíduo (TD 17) classificado morfolologicamente como híbrido em potencial, mas que apresentou genótipo de *Trachemys scripta elegans* nos marcadores avaliados.

A classificação para os híbridos, sugerida no presente estudo, foi realizada avaliando apenas os espécimes amostrados no criadouro do Paraná, não indicando que essa possa ser uma classificação morfológica adotada para a identificação destes de maneira geral, pois todos os indivíduos de cativeiro que foram analisados descendem de cruzamento entre fêmeas de *T. dorbigni* e machos e *T. s. elegans*. Entretanto, este resultado não impede que exista a possibilidade deste cruzamento ser bidirecional, pois há registros realizados por proprietários de tartarugas em cativeiro, onde um macho da espécie nativa foi visto copulando com uma fêmea de *T. s. elegans* (A. NUSS, com. pess.) (Figura 6).



Figura 6: Registro da cópula entre uma fêmea de *Trachemys scripta elegans* e um macho de *Trachemys dorbigni* em cativeiro. Foto: Andressa Nuss.

O encontro de apenas um espécime exótico *in situ*, registrado no município de Arroio do Sal, demonstra uma baixa ocorrência desses espécimes no ambiente natural de *T. dorbigni*, mas mesmo com uma baixa frequência de registro esse resultado não é isolado. QUINTELA *et al.* (2006) fizeram observações de espécimes de *T. s. elegans* em ambientes naturais no município de Rio Grande e BUJES (2008) verificou a ocorrência de três espécimes desta subespécie dentro da APA Delta do Jacuí, localizada em Porto Alegre. Também existem registros em outros ambientes naturais do Rio Grande do Sul, como na Laguna dos Patos e no município de Pelotas, contudo, em outras regiões do Estado, *T. s. elegans* foi registrada apenas em ambientes aquáticos urbanos, como lagos em praças e parques (INSTITUTO HÓRUS, 2014). Este reduzido número de espécimes exóticos em ambientes naturais, somado à ausência de híbridos nestes ambientes, como foi observada no presente estudo, é, de certa forma, animadora, pois apresenta um cenário ainda passível de recuperação, visto que o impacto causado nas populações naturais de *T. dorbigni* pela introdução das subespécies de *T. scripta* parece ainda não estar afetando diretamente as populações naturais. Entretanto, a grande quantidade de tartarugas exóticas nos ambientes urbanos deve ser controlada, para que estes indivíduos não venham ter oportunidade de colonizar os ambientes naturais.

Os resultados obtidos em outros trabalhos envolvendo hibridação entre espécies do gênero *Trachemys*, apresentam, assim como observado neste, um baixo número de híbridos amostrados, mas, diferentemente do que observado no presente estudo, os híbridos foram amostrados em ambientes naturais. Em Porto Rico *T. s. elegans* vem cruzando com *Trachemys stejnegeri stejnegeri*, espécie endêmica da região e nas Ilhas Cayman. Foram amostrados híbridos entre a subespécie americana e *Trachemys dessucata angusta* (PARHAM *et al.* 2013). Outros estudos, realizados no continente, mais precisamente na região do Rio Grande entre o México e o estado do Texas, nos Estados Unidos, apresentaram evidências de hibridação entre *T. s. elegans* e *Trachemys gaigeae gaigeae*, espécie endêmica

da região do Rio Grande e classificada como vulnerável pela IUCN (JACKSON, 2010; SEIDEL *et al.* 1999). Todos os trabalhos indicam que a subespécie americana *T. s. elegans* é uma invasora em potencial, pois todos os estudos relatam a existência de hibridação e introgressão de alelos exóticos da subespécie americana dentro das populações nativas estudadas, assim como observado neste estudo.

Os híbridos analisados podem ser todos classificados como de primeira geração, pois apresentam heterozigose nos sítios diagnósticos, tornando mais fácil a sua identificação genética. Caso os híbridos sejam férteis, uma explicação alternativa para o fato de que alguns indivíduos apresentaram discordância entre a classificação genética e morfológica, e a de que esses indivíduos seriam híbridos de segunda geração ou descendentes de retrocruzamento entre híbridos e uma das subespécies exóticas, pois apresentaram linhagem de mtDNA e nuDNA semelhante a subespécie americana. Isso se torna possível, pois caso haja o cruzamento entre dois híbridos heterozigotos existe a probabilidade, para cada marcador, de que 25% da prole tenha o genótipo de *T. s. elegans*. No caso de cruzamento entre um híbrido de *T. dorbigni* e *T. s. elegans* com um espécime da subespécie americana *T. s. elegans* essa proporção aumenta para 50%. Levando em conta os três locos simultaneamente, a chance de um indivíduo com genótipos de *T. scripta* para todos os locos ser um híbrido de segunda geração ou resultante do retrocruzamento detalhado acima, é de 1,56% e 12,5%, respectivamente. Entretanto, os dois indivíduos identificados como híbridos que mostraram genótipos de *T. scripta*, foram caracterizados apenas para o marcador ACA4, uma vez que os sequenciamentos para os outros marcadores não resultaram em cromatogramas de boa qualidade. Caso essa hipótese se confirme, é possível prever um cenário onde os riscos para a conservação de *T. dorbigni* aumentariam.

Alternativamente, a variação morfológica de *T. s. elegans* pode estar sendo subestimada, pois os indivíduos que apresentaram problemas na classificação morfológica podem, apenas, significar que há uma variação morfológica maior do que as descritas para a subespécie *T. s. elegans*.

Mesmo as baixas distâncias genéticas observadas entre as espécies do gênero *Trachemys* permitem uma boa diferenciação entre as duas e entre as subespécies de *Trachemys scripta*. A existência de sítios diagnósticos possibilitaria a confecção de ensaios genéticos simples baseados na detecção dos sítios diagnósticos através de PCR-RFLP (com

enzimas de restrição) ou PCR-SNP (com sondas específicas) para um *screening* rápido e eficiente durante projetos de monitoramento de populações nativas.

6. CONCLUSÃO

Este estudo confirma a possibilidade de hibridação entre *Trachemys dorbigni* e *Trachemys scripta elegans*. A existência de híbridos mostra que pode haver introgressão do DNA na espécie nativa, o que sugere que a liberação ou a fuga de indivíduos exóticos na natureza pode ter consequências para a conservação e sobrevivência de *T. dorbigni* a longo prazo. Os métodos de identificação morfológica se mostraram eficientes na maioria dos casos, mas não é aconselhável que se use isoladamente esse método para identificação das espécies, pois pode apresentar problemas como observados ao longo do estudo, sendo mais seguro confirmar a classificação com outros métodos de identificação, como a utilização de enzimas de restrição ou sondas específicas. Os resultados, de certa forma, são positivos quando comparados com outros estudos relacionados à hibridação de espécies do gênero *Trachemys* com a subespécie americana *T. s. elegans*, pois, diferente do que foi amostrado no presente estudo, os híbridos foram capturados em ambiente natural, mostrando um maior impacto causado pela introdução de *T. s. elegans*. A baixa ocorrência de espécimes exóticos e a falta de registro de híbridos na natureza apresenta um cenário ainda passível de recuperação, mas a grande quantidade de indivíduos introduzidos em ambientes urbanos pode vir a afetar as populações nativas de *T. dorbigni*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARESCO, M. J. Reproductive Ecology of *Pseudemys floridana* and *Trachemys scripta* (Testudines: Emydidae) in Northwestern Florida. **Journal of Herpetology**. Florida, US, v. 38, n. 2, p. 249-256, 2004.

ATAIDE, M. W.. **Ovariosalpingectomia videoassistida via acesso pré- femoral em tigre-d'água-de-orelha-vermelha (*Trachemys scripta elegans*)**. 54 f. Tese (Mestrado em Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

BIOMATTERS. Geneious version (R6) created by Biomatters. Available from <http://www.geneious.com/>. 2005 – 2013. Acesso em: 01/12/2013

BRINGSNOE, H. NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet: *Trachemys scripta*. **Online Database of the North European and Baltic Network on Invasive Alien Species**. Dinamarca. 2006. Disponível em: <www.nobanis.org>. Acesso em: 15 jun 2014.

BUJES, C. S.. **Biologia e conservação de quelônios no Delta do Rio Jacuí – RS: aspectos da história natural de espécies em ambientes alterados pelo homem**. 248 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, 2008.

BUJES, C.S.; VERRASTRO, L. Supernumerary epidermal shields and carapace variation in Orbigny's slider turtles, *Trachemys dorbigni* (Testudines, Emydidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 24, n. 3, p. 666 – 572, 2007.

CABRERA, M.A. Las Tortugas Continentales da Sudamérica Austral. Córdoba, Argentina, BR Cópias, 1998.

CADI, J.; JOLY, P. Impact of the introduction of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) on survival rates of the European pond turtle (*Emys orbicularis*). **Biodiversity and Conservation**. London, GB, v. 13, n. 1 – 14, p. 2511 – 2518, 2004.

DIJK, P. P. V., *et al.* Turtles of the world, 2011 update: Annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. **Chelonian Research Monographs**. Virginia, US, n. 5, v. 4, p. 165 – 242, 2011.

FERRONATO, B. O., *et al.* The turtle *Trachemys scripta elegans* (Testudines, Emydidae) as an invasive species in a polluted stream of southeastern Brazil. **Herpetological Bulletin**, London, GB, v. 109, p. 29 – 34, 2009.

FRITZ, U.; HAVAŠ, P.(Comp.) **Checklist of chelonians of the world**. [S.L.: S. N.]. 2006. Disponível em: <http://www.cites.org/common/docs/Res/12_11/Chelonians_Checklist_2006.pdf>. Acesso em: 14/11/2012.

HAHN, A. T. Análise da dieta de *Trachemys Dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) no sul do Rio Grande do Sul, Brasil (TESTUDINES: EMYDIDAE). 2005. 53f. Dissertação (Mestre em Biologia Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis Program for Windows 95/98/Nt. **Nucleic Acids Symposium Series**, North Caroline, USA., v. 41, p. 95 – 98, 1999.

INSTITUTO HÓRUS DE DESENVOLVIMENTO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL. Base de dados nacional de espécies exóticas invasoras: I3N Brasil. Florianópolis. Disponível em: <<http://i3n.institutohorus.org.br>>. Acesso em: 10 jun 2014.

JACKSON, J. T. DEMOGRAPHY AND POPULATION STRUCTURE OF A RIO GRANDE ENDEMIC EMYDID THE BIG BEND SLIDER. San Marcos, Texas, 2010. 82 p. Dissertation (Doutorado) – Texas State University, San Marcos, US, 2010.

KIMURA, M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. **Journal of Molecular Evolution**. New York, US, v. 16, n. 3-4, p. 111 – 120, 1980.

LEMA, T.; FERREIRA, M.T.S. **Contribuição ao conhecimento dos Testudines do Rio Grande do Sul (Brasil) – lista sistemática comentada (Reptilia)**. Acta Biológica Leopoldensia, São Leopoldo, v. 12, n. 1, p. 125 – 164, 1990.

MALLET, J. Hybridization as an invasion of the genome. **Ecology and Evolution**, Amsterdam, NL., v. 20, n. 5, p. 229 – 237, 2005.

PARHAM, J. F. *et al.* Genetic introgression and hybridization in Antillean freshwater turtles (*Trachemys*) revealed by coalescent analyses of mitochondrial and cloned nuclear markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Califórnia, v. 67, p. 176 – 187, 2013.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4. ed. São Paulo. Atheneu, 2008.

QUINTELA, F.M.; LEOBMANN, D.; GIANUCA, N. M. Répteis continentais do município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biociências**, Porto Alegre, RS, v. 14, n. 2, p. 180-188, 2006.

Red List of Threatened Species. Version 2013.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 03 jun 2014.

RHYMER, J.M.; SIMBERLOFF, D. Extinction by hybridization and introgression. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, Calif., v. 27, p. 83 – 109, 1996.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, US., v. 4, p. 406 – 425, 1987.

SEIDEL, M. E. Taxonomic observations on extant species and subspecies of slider turtles, genus *Trachemys*. **Journal of Herpetology**, Athens, OH, v. 36, n. 2, p. 285 – 292, 2002.

SEIDEL, M. E., *et al.* Variation and species status of slider turtles (EMYDIDAE: *TRACHEMYS*) in the southwestern United States and adjacent Mexico. **Journal of Herpetology**, Athens, OH, v. 55, n. 4, p. 470 – 487, 1999.

SHWENK, S.; BREDE, N.; STREIT, B. Introduction: Extent, processes and evolutionary impact of interspecific hybridization in animals. **Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Science**, London, GB., v. 363, p. 2805 – 2811, 2008.

STEPHENS, P. R.; WIENS, J. J. Ecological diversification and phylogeny of emydid turtles. **Biological Journal of the Linnean Society**. London, GB, n. 1-4, v. 79, p. 577 – 610, 2003.

TAMURA, K. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, US, v. 28, n. 10, p. 2731 – 2739, 2011.

TELECKY, T. M. United States Import and Export of Live Turtles and Tortoises. **Turtle and Tortoise Newsletter**. Massachusetts, US, issue, n. 4, p. 8 – 13, 2001

VANZOLINI, P. E. A new species of turtle, genus *Trachemys*, from the state of Maranhão, Brazil (Testudines, Emydidae). **Revista Brasileira de Biologia**. Rio de Janeiro, RJ, v. 55, n. 1, p. 111-125, 1995.