

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DA  
TARTARUGA DA AMAZÔNIA (*Podocnemis expansa*) E TRACAJÁ  
(*Podocnemis unifilis*) NOS RIOS MADEIRA E GUAPORÉ.

Bolsista: Roberta de Castro Canton, FAPEAM

MANAUS  
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**RELATÓRIO FINAL**  
**PIB-B 0022/2009 FAPEAM**  
**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DA**  
**TARTARUGA DA AMAZÔNIA (*Podocnemis expansa*) E TRACAJÁ**  
**(*Podocnemis unifilis*) NOS RIOS MADEIRA E GUAPORÉ.**

Bolsista: Roberta de Castro Canton  
Orientadora: Profa. Dra. Maria das Neves Silva Viana

Manaus  
2010

## RESUMO

No Brasil o gênero *Podocnemis* é representado por quatro espécies sendo elas *Podocnemis unifilis*, *P. erythrocephala*, *P. sextuberculata* e *P. expansa*. A Amazônia é considerada o centro da diversidade do gênero, onde constitui um recurso de fauna de grande significância para as populações ribeirinhas da região sendo utilizada, como alternativa na alimentação, as espécies *P. expansa* juntamente com *P. unifilis*, são as mais consumidas no Estado do Amazonas. Após a permissão para a criação em cativeiro destas duas espécies, através da portaria 142/92 IBAMA, houve um aumento na demanda comercial, entretanto pouco se conhece sobre a dinâmica e estrutura populacional. O presente trabalho tem como principal objetivo caracterizar a variabilidade genética intra e inter populacional e verificar a existência de populações geneticamente diferenciadas em populações naturais *P. expansa* e *P. unifilis* provenientes dos rios Madeira e Guaporé utilizando a região controle do DNA mitocondrial como marcador molecular. As análises das populações de *P. unifilis* foram realizadas com 35 indivíduos (19 do Rio Guaporé e 16 do Rio Madeira) utilizando seqüências nucleotídicas compostas por 460 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*) as quais foram agrupadas em 9 haplótipos. Para *P. expansa* foram analisados 33 indivíduos (16 do Rio Guaporé e 17 do Rio Madeira), as seqüências nucleotídicas compostas por 459 pares de bases que foram agrupadas em 14 haplótipos. Os níveis de variabilidade genética foram bastante altos para as populações de *P. expansa* e relativamente baixos para *P. unifilis*. As análises de variância molecular revelaram alto grau de subdivisão populacional para *P. unifilis* ( $\Phi_{ST} = 0.40$ ,  $P < 0,001$ ). Os resultados de indicaram que a maior parte da variação genética encontra-se dentro das populações (58,35% *P. unifilis* e 88,21% *P. expansa*). Apesar dos valores do índice de fixação  $F_{ST}$  terem sido significativos nas comparações entre as populações das duas espécies e estas também mostrarem baixo fluxo gênico, isto pode indicar que as populações se encontram isoladas pela distância geográfica. O teste de neutralidade  $F_s$  de Fu mostrou desvio significativo da expectativa neutra das mutações apenas para a população as duas populações de *P. expansa* sugerindo um excesso de mutações recentes que podem ser interpretados como evidência de que essas populações se encontram em expansão. Enquanto que as populações de *P. unifilis* se encontram em equilíbrio.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Podocnemis expansa*, *Podocnemis unifilis*, Genética de Populações, DNA mitocondrial.

## SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
2. INTRODUÇÃO .....	8
3. OBJETIVOS .....	10
3.1. Objetivo geral .....	10
3.2. Objetivos específicos .....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
4.1. Amostragem .....	11
4.2. Isolamento, Amplificação e Sequenciamento .....	11
4.3. Análises Populacionais .....	12
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	13
5.1. <i>Podocnemis unifilis</i> .....	13
5.2. <i>Podocnemis expansa</i> .....	16
6. CRONOGRAMA .....	20
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	21

## 1. Revisão Bibliográfica

A família Podocnemididae é a família de quelônios mais exploradas no comércio e subsistência da região Amazônica. Segundo Noonan (2000), esta família compreende um grupo monofilético que reúne três gêneros de quelônios de água doce: *Erymnochelis*, encontrado apenas na região de Madagascar; *Peltocephalus*, endêmico da nossa região e o gênero *Podocnemis*. Distribuído pela região setentrional cisandina da América do Sul, *Podocnemis* é o gênero mais representativo, com seis espécies viventes: *P. vogli*, *P. lewyana*, que não encontramos no Brasil, apenas nos países vizinhos. *P. sextuberculata* e *P. erythrocephala*, conhecidas como iacá e irapuca, respectivamente e *P. expansa* e *P. unifilis*, na qual se trata este trabalho.

### *Podocnemis unifilis*

Esta é, provavelmente, a espécie de tartaruga mais comum na América do Sul tropical e a segunda espécie mais consumida na região amazônica. A fêmea adulta pesa em média 5 a 6kg, mas pode chegar a 12kg. São quelônios de águas brancas, claras e pretas do Brasil (Vogt, 2008). Parecem ser bem sociais, pois costumam tomar sol em grandes grupos. Quanto à alimentação, é predominantemente herbívora.



Indivíduo juvenil da *P. unifilis*  
Foto de Rômulo A.

### ***Podocnemis expansa***

Conhecida como tartaruga da Amazônia, esta é a maior espécie do gênero. Ela chega a medir 82 cm e pesar 60 kg (Ernst & Barbour, 1989; Pritchard, 1979). Possui a carapaça larga, achatada e lisa, com coloração entre cinza e preto (Vogt, 2001).

Constitui importante fonte de proteína para populações que vivem ao longo de rios tropicais desde épocas pré-coloniais. Seu grande tamanho a tornava especialmente vulnerável, atraindo assim a atenção de nativos e colonizadores, tornando-se muito popular na cultura local, especialmente na culinária.



Indivíduo adulto da *P. expansa*  
Foto de Igor Fotopaulos, 2008.

### **Parâmetros genéticos como estimadores populacionais**

Devon (2006) utilizou marcadores microssatélites e mitocondriais para 293 amostras de 17 populações de *Podocnemis expansa* na Amazônia e encontrou pouca diferenciação em ambos os marcadores, sugerindo que as populações são essencialmente panmíticas. Uma observação interessante foi que populações separadas uma grande distância demográfica (maior que 3000km) não eram muito mais diferenciadas que populações quase vizinhas.

Escalona *et al* (2008) utilizou DNA microssatélite de *Podocnemis unifilis* em seis populações da Venezuela, uma da Colômbia, três do Peru e uma mais distante no Brasil. Os autores afirmam que os índices indicaram um alto nível de diversidade genética em todas as localidades.

Santos (2008) testou a hipótese de que existem populações de *P. erythrocephala* geneticamente estruturadas por um efeito da estrutura geomorfológica (isto é, cachoeiras e corredeiras) da drenagem do rio Negro e da provável atuação do rio Amazonas como barreiras geográficas. A autora demonstrou que as populações estão diferenciadas geneticamente e o fator para explicar este padrão não foi o isolamento por distância, uma vez que não houve correlação entre a variação genética e a distância geográfica. A diferenciação genética foi explicada pelas características ambientais dos locais (as cachoeiras) que funcionaram como barreira para o fluxo gênico. Viana (2005), que trabalhou com três espécies do gênero em cinco localidades da Amazônia brasileira, sustenta a argumentação das cachoeiras como barreira para o fluxo gênico para *P. erythrocephala*. Este mesmo trabalho ainda indicou baixos níveis de variabilidade genética em *P. sextuberculata* e alta variabilidade para a *P. unifilis* nas mesmas localidades.

No estudo de Pearse *et al.* (2006) com *P. expansa*, duas amostras populacionais do rio Madeira-Guaporé estão agrupadas com relação aos *loci* microssatélites e compartilham um haplótipo que não foi encontrado fora desta bacia. Todavia, estas localidades também compartilham com outras populações amostradas na região amazônica e dois haplótipos mais frequentes, sugerindo uma estruturação relativamente recente destas duas populações.

## 2. Introdução

A Floresta Amazônica possui 7 milhões de km<sup>2</sup> com numerosos igarapés, rios e lagos, escoando uma grande variedade de formações geológicas, solos e tipos de vegetação, oferecendo muitos nichos para a biodiversidade nela encontrada (Smith, 1979). A fauna de quelônios na Amazônia pode ser considerada pobre se considerarmos sua diversidade. No entanto, os quelônios da região sempre se destacaram por sua abundância na natureza e presença na cultura local. Pelo menos 15 espécies de quelônios de água doce têm servido o homem amazônico há muito tempo, como um importante recurso alimentar (Vogt, 2001)

A genética da conservação tem sido aplicada nos estudos relacionados conservação de espécies animais e vegetais em todo o planeta. É usada para verificar as afinidades e os limites entre as espécies, para estimar níveis de migração e dispersão nas populações, e para detectar modos de reprodução e estrutura familiar (Viana, 2005).

A utilização de marcadores genéticos que são transmitidos uniparentalmente como o DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) por exemplo, que nos animais é considerado quase exclusivamente de herança materna, é muito útil por fornecer dados sobre a evolução e dispersão dos organismos. O DNA mitocondrial, por ser pequeno, de organização simples e fácil de manusear e de ser isolado, tem sido amplamente utilizada em estudos populacionais. Outras razões para isso são seu grande número de cópias, não ser recombinante (Avisé *et al.*, 1984; Hayashi *et al.*, 1985). A região controle (alça-D ou *D-loop*) é a região não codificadora do genoma mitocondrial.

Com a liberação para criação em cativeiro e comercialização (Portaria 142/92-P), essas duas espécies passaram a ser mais visadas e mais exploradas. Na *red list* da IUCN (União Internacional pela conservação da Natureza), a tartaruga está classificada como risco baixo, mas dependente de preservação, e o tracajá como vulnerável. Hoje, há poucos estudos

para determinar a situação atual das espécies. Para realizar o manejo e a captura de forma sustentável, é necessário associar estudos ecológicos com moleculares. Uma das formas de ajudar a realizar este trabalho é demonstrando a estrutura genética dessas populações.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Comparar a variabilidade genética de populações de *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis*, provenientes dos rios Madeira e rio Guaporé, utilizando-se o DNA mitocondrial como marcador molecular.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Estimar os níveis de variabilidade genética de populações do tracajá e da tartaruga da Amazônia provenientes dos rios Madeira e Guaporé;
- Analisar e comparar a variação genética das duas espécies nos rios Madeira e Guaporé;
- Verificar a ocorrência de populações geneticamente estruturadas para cada espécie.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Amostragem

As coletas foram realizadas nos rios Madeira no estado do Amazonas, e Guaporé no estado de Rondônia, com uma amostragem aproximada de 30 indivíduos de cada espécie por localidade. Foram retiradas amostras de sangue (aproximadamente 100µL) de cada indivíduo através da punção da veia femoral, com seringas descartáveis e o material preservado em tubos eppendorf contendo álcool etílico absoluto. Após a extração de DNA, amostras de sangue foram depositadas na Coleção de Tecidos de Genética Animal (CTGA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

### 4.2. Isolamento, Amplificação e Sequenciamento do DNA

O material genético (DNA) das amostras analisadas, foi isolado através do método de CTAB (Doyle & Doyle, 1987), analisado quanto a sua qualidade através da técnica de eletroforese em gel de agarose e corado com brometo de etídeo. Posteriormente o DNA foi amplificado por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os iniciadores utilizados para a amplificação da região controle e suas sequências de bases nucleotídicas podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Seqüência nucleotídica dos iniciadores utilizados na amplificação da região controle.

Iniciadores	Seqüência Nucleotídica	Referência
PRO	5' - CCCATCACCCACTCCCAAAGC - 3'	Pearse <i>et al.</i> , 2006
12SR5	5' - GTCAGGACCATGCCTTTGTG - 3'	Tomas Hrbek com. pessoal

O produto amplificado foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para que a eficiência da reação fosse constatada.

Depois de amplificado, o DNA foi purificado pelo ExoSAP, visando eliminar dos produtos de PCR resíduos de baixo peso molecular, tais como sais, iniciadores e dNTPs. As reações de seqüenciamento foram feitas em uma placa para um volume final de 10µL utilizando o kit de reação “*Big Dye*”. Em seguida, a placa contendo o DNA foi submetida a

eletro-injeção e as seqüências nucleotídicas foram determinadas pelo seqüenciador automático ABI 3130XL (*Applied Biosystems*), seguindo instruções do fabricante.

A etapa de seqüenciamento consistiu na determinação exata da ordem dos nucleotídeos de cada amostra estudada, e no alinhamento manual através do programa BioEdit (Hall, 1999), com a aplicação da ferramenta Clustal W (Thompson *et al.*, 1994).

### 4.3 Análises Populacionais

As medidas estatísticas de genética populacional foram feitas através das análises das freqüências e distribuição dos haplótipos utilizando o programa TCS (CLEMENT *et al.*, 2000). Este *software* agrupou as seqüências de pares de bases que diferem entre si, em passos mutacionais, dentro de haplótipos

Para determinar a diferenciação e variabilidade genética entre as populações, foi realizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER *et al.*, 1992) -que é uma estimativa de estrutura genética populacional similar a outras abordagens que levam em conta a variação na freqüência gênica, entretanto a AMOVA considera o número de mutações entre os haplótipos.

Os níveis de estrutura de população foram inferidos a partir de análises dos *F statistics* ( $F_{ST}$ ), onde foi possível determinar o fluxo gênico através do número de migrantes.

Para testar se as mutações encontradas ao longo das seqüências de DNA realmente são neutras, foram aplicados os testes de neutralidade seletiva de Tajima e Fu. O teste *D* de Tajima, baseado no modelo dos sítios infinitos sem recombinação (KIMURA, 1969) é apropriado para seqüências curtas de DNA. Este modelo assume que os sítios ao longo de uma seqüência de DNA sofrem mutações independentes e irregulares e que a probabilidade de um mesmo sítio sofrer mutações duas vezes é infinitamente pequena (EPPERSON, 2003).

Todos estes testes de variabilidade genética estão disponíveis no programa Arlequin 2000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

## 5. Resultados

### 5.1. *Podocnemis unifilis*

As análises das populações de *P. unifilis* foram realizadas com 35 indivíduos (19 do Rio Guaporé e 16 do Rio Madeira) utilizando seqüências nucleotídicas compostas por 460 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*). As sequências foram plotadas em uma matriz de dados que foi utilizada para estimar cladogramas intra-específicos de haplótipos no programa TCS (CLEMENT *et al.*, 2000). Este *software* agrupa seqüências de pares de bases que diferem entre si em passos mutacionais dentro de haplótipos e calcula a freqüência desses haplótipos, estimando relações genealógicas entre eles, usando um algoritmo descrito por (TEMPLETON, CRANDALL E SING , 1992).

As 35 amostras seqüenciadas foram submetidas ao programa TCS, gerando um cladograma intraespecífico com 9 haplótipos (Figura 3). Observa-se a predominância de um haplótipo comum (u53M) com representantes de todas as populações além de haplótipos raros ou *singletons*. As circunferências menores, que ligam os haplótipos identificados, correspondem aos haplótipos que não existem mais na população (*missing haplotypes*) ou que simplesmente não foram encontrados nas amostras populacionais examinadas, e dessa maneira este programa os assume os como haplótipos intermediários. O número de *missing haplotypes* observado na árvore dos haplótipos foi pequeno e sua existência pode ser atribuída à possibilidade de terem se perdido ao longo de milhões de anos através das mutações. Outra hipótese seria o baixo número amostral, isso poderia ser confirmado aumentando o número amostral, possibilitando encontrar estes haplótipos não revelados.

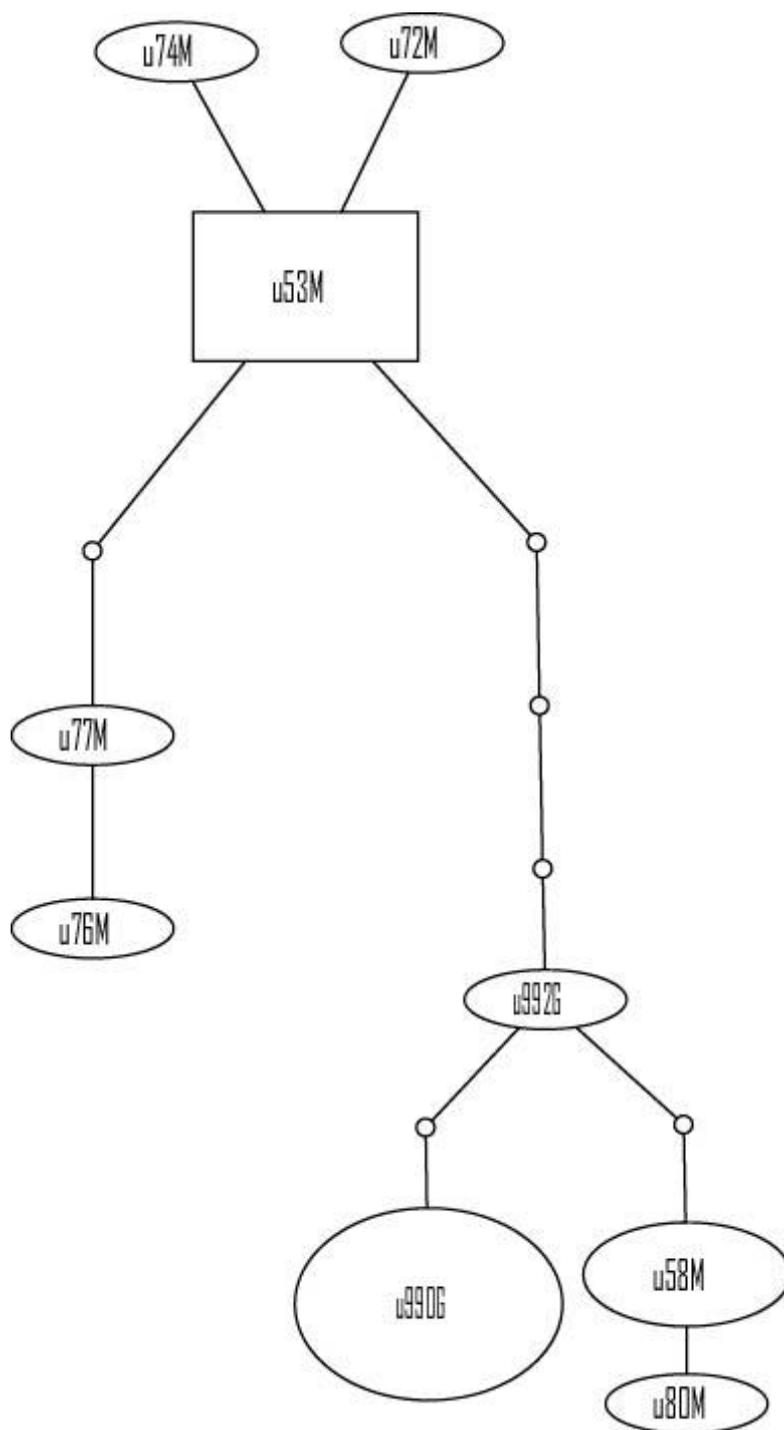


Figura 3. A árvore de haplótipos de *P. unifilis*

Os resultados dos parâmetros genéticos evidenciam bons níveis de diversidade gênica para a população do rio Madeira, já a população do rio Guaporé apresentou um nível menor

que 50% o que é considerado baixo para este parâmetro (tab 2). Estas análises comparam dois indivíduos da mesma população analisando suas diferenças.

Tabela 2. Parâmetros genéticos para *Podocnemis unifilis*.

Populações	N	S	NH	$\hat{H}$	$\Pi$	D de Tajima	$F_s$ de Fu
Madeira	16	12	7	$0.7750 \pm 0.0876$	$0.00808 \pm 0.00482$	0,10593	0,08084
Guapore	19	6	3	$0.4327 \pm 0.1167$	$0.00483 \pm 0.00311$	0,95327	3,50430

NOTA: \* Nível de significância  $P < 0,005$ ; N = Número de Indivíduos; S = Número de Sítios Polimórficos; NH = Número de Haplótipos;  $\hat{H}$  = Diversidade Gênica;  $\Pi$  = Diversidade Nucleotídica (por sítio); MAD = Rio Madeira; GUAP = Rio Guaporé.

As análises de expansão populacional e polimorfismo do DNA foram realizados no programa Arlequin (SCHNEIDER *et al.*, 2001). Análises de variância molecular (AMOVA) revelaram alto grau de subdivisão populacional para *P. unifilis* ( $\Phi_{ST} = 0.40$ ,  $P < 0,001$ ). Os resultados de indicaram que a maior parte da variação genética encontra-se dentro das populações (58,35%), e também resultados revelaram uma taxa de diversidade genética baixa para todas as amostras populacionais.

Os valores obtidos das comparações múltiplas entre os pares de populações através do índice  $\Phi_{ST}$  foram utilizados para estimar o fluxo gênico das fêmeas. Os resultados foram usados para fazer uma estimativa do número efetivo de fêmeas migrantes de tracajá por geração entre as localidades estudadas. O número de migrantes estimado entre as duas populações foi de 0,67. Valores menores que um (1,00) indicam que as populações podem estar geneticamente estruturadas ou que elas estejam isoladas por longas distancias geográficas. Considerando que *P. unifilis* não é uma espécie que se desloca por longas

distancias comparada com *P. expansa* que chega a se deslocar por 200 Km (VON HIDELBRAND *et al.* 1997) também podemos sugerir que está ocorrendo um isolamento por distância entre estas duas populações.

O teste de neutralidade seletiva *D* de Tajima se baseia no modelo dos sítios infinitos sem recombinação (KIMURA, 1969), apropriado para seqüências de DNA. Este teste correlaciona o número de sítios segregantes e o número médio de diferenças nucleotídicas, estimado pela comparação em pares de bases (TAJIMA, 1989). O teste de *F<sub>s</sub>* também utiliza o modelo dos sítios infinitos sem recombinação e tende a ser negativo quando existe um excesso de alelos raros, ou seja, um excesso de mutações recentes, este valor negativo fornece evidências contra a neutralidade das mutações e indica crescimento populacional (FU, 1997).

Os valores obtidos nos testes Teste *D* de Tajima e *F<sub>s</sub>* de Fu não foram significativos (*P* > 0,05) indicado que as populações estão em equilíbrio genético em relação aos haplótipos do DNA mitocondrial, ou seja, as mutações são neutras (Tabela 2). Estes testes estatísticos foram desenvolvidos sob as premissas da teoria neutra de mutações e baseiam-se no modelo de sítios infinitos sem recombinação (KIMURA, 1969), apropriado para seqüências de DNA.

## **5.2. *Podocnemis expansa***

As análises das populações de *P. expansa* foram realizadas com 33 indivíduos (16 do Rio Guaporé e 17 do Rio Madeira) utilizando seqüências nucleotídicas compostas por 459 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*).

O cladograma intraespecífico apresentou 14 haplótipos espalhados ao longo da distribuição das duas populações (Figura 4). Observa-se a predominância de um haplótipo comum (e238M) com representantes das duas populações além de haplótipos raros ou *singletons* e alguns *missing haplotype*.

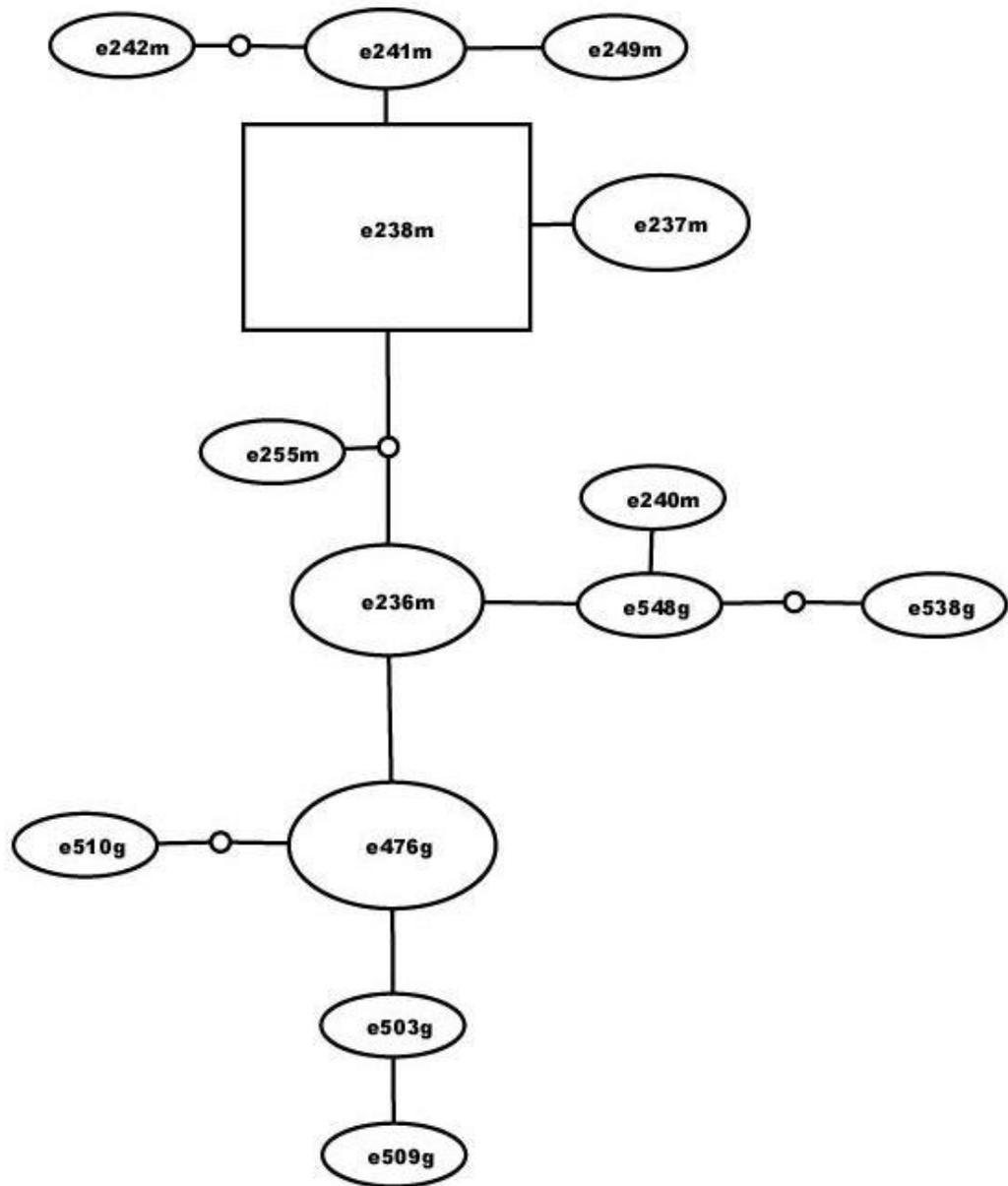


Figura 4: A árvore de haplótipos de *P. expansa*

Os resultados dos parâmetros genéticos evidenciam níveis de diversidade gênica ( $\hat{H}$ ) bastante alto para as duas populações (Tabela 03). Estas análises comparam dois indivíduos da mesma população analisando suas diferenças.

Tabela 03. Parâmetros genéticos para *Podocnemis expansa*.

Populações	N	S	NH	$\hat{H}$	$\Pi$	D de Tajima	$F_s$ de Fu
Madeira	17	6	8	1.0000 ± 0.0202	0.0042 ± 0.0028	0,3422	-24,7989*
Guapore	16	7	9	1.0000 ± 0.0221	0.0056 ± 0.0035	0,8331	-19,5503*

NOTA: \* Nível de significância  $P < 0,005$ ; N = Número de Indivíduos; S = Número de Sítios Polimórficos; NH = Número de Haplótipos;  $\hat{H}$  = Diversidade Gênica;  $\Pi$  = Diversidade Nucleotídica (por sítio); MAD = Rio Madeira; GUAP = Rio Guaporé.

As Análises de Variância Molecular (AMOVA) mostraram que a maior variação genética foi verificada dentro das populações (88,21%)

O fluxo gênico para a espécie foi estimado pelo número efetivo de fêmeas migrantes por geração entre as duas localidades estudadas, o valor para este parâmetro foi de 3,74. Este número é baixo para este parâmetro considerando que *P. expansa* é uma espécie migradora chegando a se deslocar por cerca de 200 Km entre as praias de desova (VON HIDELBRAND *et al.* 1997). Este pequeno número de migrantes por geração pode ser atribuído ao fato de as duas localidades analisadas serem geograficamente distantes e isso caracteriza um isolamento por distância.

Os valores resultantes dos testes de neutralidade seletiva de mutações indicam que as duas populações não estão em equilíbrio genético com relação aos haplótipos do DNA mitocondrial. O Teste D de Tajima não foi significativo ( $P > 0,05$ ), mas o  $F_s$  de Fu mostrou desvio significativo da expectativa neutra das mutações para a população as duas populações

(Tabela 03). Os valores negativos e significativos como os encontrados para  $F_s$  de  $F_u$  neste estudo representam um padrão frequentemente observado em populações onde há um excesso de mutações recentes e podem ser interpretados como evidência de que essas populações de *P. expansa* se encontram em expansão (TAJIMA, 1989; FU, 1997).

### 3. Cronograma

Nº	Descrição	Ago 2009	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2010	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
01	Extração de DNA das Amostras	X	X	X									
02	Quantificação do DNA extraído			X	X	X							
03	Amplificação do material através de PCR					X	X	X					
04	Purificação da PCR					X	X	X					
05	Seqüenciamento do produto de PCR					X	X	X	X				
06	Análise dos dados						X	X	X	X	X		
07	Levantamento Bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
08	Elaboração do Resumo e Relatório Final										X	X	
09	Preparação da Apresentação Final para o Congresso											X	X

## 4. Referências Bibliográficas

AVISE, J.C.; NIEGEL J.E.; ARNOLD, J. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, 20: 99-105.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9:16567-1659.

CRANDALL, K.A.; BININDA-EMONDS, O.R.P.; MACE, G.M.; WAYNE, R.K. 2000. Considering evolutionary process in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 15:290-295.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13 – 15.

ERNST, C.H.; BARBOUR, R.W. 1989. *Turtles of the World*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. and London. 313pp.

ESCALONA, T; VALENZUELA, N. 2008. Population genetics of the endangered South American freshwater turtle, *Podocnemis unifilis*, inferred from microsatellite DNA data. *Conserv Genet*. 132 – 146.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

FU, Y-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 1447:915-925.

HALL, J. P. W. 1999. A revision of the genus *Theope*: its systematics and biology (Lepidoptera: Riodinidae: Nymphidiini). *Scientific Publishers*, Gainesville, FL.

HAYASHI, J.L.; TAGASHIRA, Y.; YOSHIDA, M.C. 1985. Absence of extensive recombination between Inter and intraespecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Exp. Cell. Res.*, 160: 387-395.

VON HILDEBRAND P, BERMUDEZ N, PEÑUELA MMC (1997) La Tortuga Charapa *Podocnemis expansa*) en el Río Caquetá, Amazonas, Colombia. Aspectos de la Biología reproductiva y Técnicas para su Manejo. Bogotá, Colombia, Disloque.

KIMURA, M. 1969 The number of heterozygous nucleotide sites maintained in a finite population due to steady flux of mutations. *Genetics* 61:893-903.

NOONAN, B.P. 2000. Does the phylogeny turtles reflect vicariance due to continental drift? *Journal of Biogeography* 27:1245-1249.

PEARSE, D.E.; ARNDT, A.D.; VALENZUELA, N.; MILLER, B.A.; CANTARELLI, V. AND SITES, J. W. 2006 Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Molecular Ecology* 15, 985–1006.

PRITCHARD, P.C.H. E TREBBAU, P. 1979. *The Turtles of Venezuela*. Society for the studies of amphibians and reptiles. *Contributions to Herpetology*. 2: VIII + 403.

SANTOS, R. C. 2008 “Estrutura Genética das populações de irapuca (*P. erythrocephala*, Podocnemididae) da Amazonia Brasileira: implicações para a conservação”

SCHNEIDER, D.; DUPERCHY, E.; COURSANGE, E.; LENSKI, R.E.; BLOT, M. 2000. "Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IX. Characterization of Insertion Sequence-mediated mutations and rearrangements" *Genetics* 156: 477-488.

SMITH, N. 1979. Destructive exploitation of the south american river turtle *Podocnemis expansa*. *Yearb. assoc. pacific coast geog.* 36: 85-100.

TAJIMA, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585-595.

TEMPLETON, A.R.; BOERWINKLE, E.; SING, C.F. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol deshydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* 117:343-351.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. 1994 Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.

VIANA, M. N. S. 2005. *Ecologia molecular de quelônios do gênero Podocnemis (Pleurodira: Pelomedusidae) da Amazônia brasileira*. Tese de Doutorado. Universidade Federal Do Pará. Belém, Pará. 159pp.

VOGT, R.C. 2001. Turtles of the Rio Negro. In: *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazônia, Brazil*. Chao, N.L. (ed). Manaus: Editora da Universidade do Amazonas. 245-262pp.