

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, EDUCAÇÃO E ZOOTECNIA
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES
NATIVAS DE *Podocnemis unifilis* (TROSCHER, 1848) EM REGIÕES DO
BAIXO AMAZONAS.

Bolsista: Rodrigo Rener dos Santos Martins

PARINTINS
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, EDUCAÇÃO E ZOOTECNIA
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO PARCIAL
PIB - A - 0052/2010/CNPq
AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES
NATIVAS DE *Podocnemis unifilis* (TROSCHER, 1848) EM REGIÕES DO
BAIXO AMAZONAS.

Bolsista: Rodrigo Rener dos Santos Martins
Orientadora: Prof^a Dr^a Monyka Marianna Massolini Laureano Hoshiba

PARINTINS
2011

RESUMO

O rio Amazonas é colonizado por varias espécies de organismos aquáticos, e entre os animais que fazem parte dessa rica fauna encontram-se os quelônios representados por quatro espécies do gênero *Podocnemis*, destacando-se o *P. unifilis* conhecido como tracajá. Esta espécie representa grande importância comercial para a região, pois produz carne e ovos que são produtos bastante apreciados na culinária local, visto que é um alimento de alto valor nutricional para as populações ribeirinhas. Tendo em vista a grande procura por este animal em época de reprodução, sua captura é realizada de forma intensa, desordenada e sem manejo, o que pode implicar na extinção desta espécie. Portanto, estudos genéticos, utilizando marcadores moleculares são imprescindíveis para o monitoramento da variabilidade genética dessas populações e se tornam necessárias para que, futuramente, seja proposta uma eficiente política de manejo sustentável e conservação dos estoques naturais desses animais. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a variabilidade genética de populações nativas de *P. unifilis* em diferentes regiões do Baixo Amazonas, utilizando a região controle do DNA mitocondrial (mtDNA). Os locais de coleta compreendem as localidades Máximo, Valéria e Parananema situadas próximas ao município de Parintins. As análises das populações foram realizadas com 31 indivíduos utilizando seqüências nucleotídicas compostas por 487 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*) as quais foram agrupadas em 7 diferentes haplótipos. Os níveis de variabilidade genética foram altos para as populações amostradas. Os resultados de AMOVA indicaram que a maior parte da variação genética encontra-se dentro das populações (81,61%) enquanto que entre populações a variação foi pequena (18,39%). Tais resultados também evidenciaram que existe estruturação genética entre os locais amostrados ($F_{ST}=0,1838$; $P=0,034$). Os testes de neutralidade F_s de F_u e D de Tajima não mostraram desvio significativo da expectativa neutra das mutações. Os valores do índice de fixação F_{ST} foram significativos nas comparações entre Máximo e as outras duas localidades apesar dos valores de Nm (número de migrantes por geração) terem sido maiores que 1, isso pode indicar que estas populações estão geneticamente estruturadas. Apesar de ter sido encontrada uma pequena Variabilidade genética em uma das populações estudadas, as demais podem ser consideradas uma população panmítica. Portanto a utilização da região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*) mostrou-se eficiente nos estudos com as populações de *Podocnemis unifilis*, sendo de grande relevância como marcador molecular para o monitoramento genético desta espécie. A variabilidade genética encontrada entre as localidades amostradas possivelmente podem ser provenientes da pressão antrópica ou de fatores ambientais, pois estes determinam as condições de existência para os seres vivos, bem como influenciam na sua distribuição devido a fatores adaptativos.

Palavras-chave: Variabilidade genética, DNA mitocondrial, tracajá, genética de populações.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>Podocnemis unifilis</i>	10
Figura 2. Genoma mitocondrial completo de <i>Pelomedusa</i>	13
Figura 3. Vista Aérea das localidades amostradas.....	14
Figura 4. Gel de quantificação de DNA de <i>Podocnemis unifilis</i>	19
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1,0 % dos produtos amplificados do DNA mitocondrial de <i>Podocnemis unifilis</i> , mostrando o padrão de migração do fragmento de aproximadamente 1.100 pb comparados com aqueles DNA de peso molecular conhecido (1Kb Ladder).....	20
Figura 6. Cladograma dos haplótipos identificados de <i>Podocnemis unifilis</i>	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nucleotídicas encontrada em cada população.....	21
Tabela 2. Parâmetros genéticos para <i>Podocnemis unifilis</i>	23
Tabela 3. Estimativa indireta de fluxo gênico (Nm) (acima da diagonal e à direita) e diferenciação genética (Φ_{ST}) (abaixo da diagonal e à esquerda) entre os pares de populações de <i>P. unifilis</i>	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	9
2.1. QUELÔNIOS.....	9
2.3. TRACAJÁ, <i>Podocnemis unifilis</i> (TROSCHER, 1848)	10
2.4. PREDACÃO DE QUELÔNIOS.....	11
2.6. VARIABILIDADE GENÉTICA E MARCADORES MOLECULARES.....	12
3. METODOLOGIA.....	14
3.1. AMOSTRAGEM	14
3.2. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	15
3.3. EXTRAÇÃO DE DNA	15
3.4. AMPLIFICAÇÃO <i>IN VITRO</i> VIA PCR.....	16
3.5 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	16
3.6. REAÇÃO DE SEQUÊNCIA... ..	17
3.6. ANÁLISE GENOTÍPICA.....	17
3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS POPULACIONAIS	18
3.7.1 ANÁLISES DA FREQUÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS.....	18
3.7.2 ANÁLISES DE POLIMORFISMO GENÉTICOS	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÃO	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	30

1. INTRODUÇÃO

A Bacia Amazônica é a maior bacia hidrográfica do mundo, abrangendo os estados do Amazonas, Pará, Amapá, Acre, Roraima, Rondônia e Mato Grosso. Dentre os seus principais cursos de água, está calha do Amazonas, que possui tributários de águas brancas, claras e pretas, sendo colonizado por uma enorme diversidade de plantas e animais, servindo como fonte inesgotável para estudos, principalmente aqueles relacionados à diversidade e identificação de espécies e conservação.

O rio Amazonas abriga várias espécies de organismos aquáticos as quais têm destaque na economia local, além de serem importante fonte de proteína de alto valor nutricional para populações ribeirinhas. Dentre os animais que fazem parte dessa rica fauna, destacam-se os quelônios do gênero *Podocnemis*, principalmente as espécies *P. expansa* (SCHWEIGGER, 1812), *P. unifilis* (TROSCHER, 1848), *P. sextuberculata* (CORNALIA, 1844) e *P. erythrocephala* (SPIX, 1824).

O *Podocnemis unifilis*, também conhecido como tracajá, é uma espécie nativa e vastamente distribuída na drenagem do Rio Amazonas (IVERSON, 1992). É uma espécie de menor porte em relação à tartaruga, possuindo em torno de 8 kg e até 68 centímetros de comprimento de carapaça. Apresenta casco levemente convexo com manchas amareladas bem evidentes na parte dorsal da cabeça e nas bordas das placas marginais da carapaça, melhor observadas em filhotes, que desaparecem em fêmeas adultas. Este quelônio apresenta potencial para o comércio na região amazônica, pois produz carne e ovos que são produtos bastante apreciados no cardápio das populações locais, sendo considerada a segunda espécie mais consumida na região.

Atualmente, devido à captura desta espécie ser realizada de forma intensa e sem manejo adequado, este animal apresenta-se como vulnerável na lista vermelha da IUCN. Uma das causas que podem ser citadas como consequência da captura desordenada destes

animais, ou sobreexploração, é a redução dos estoques naturais de exemplares na natureza que pode implicar, futuramente, na extinção desta espécie.

A perda acentuada de indivíduos das populações ou o desaparecimento de espécies resulta em redução da variabilidade genética. A variabilidade genética é um fator de evolução de extrema importância à adaptação do animal no ambiente. Alguns dos problemas causados pela falta de variabilidade genética são: menor adaptação às condições ambientais, que influencia o processo de reprodução; redução do crescimento e desenvolvimento dos animais; menor resistência a endo e ectoparasitas, entre outros.

Assim, o conhecimento e monitoramento da variabilidade genética das populações de *Podocnemis unifilis* se tornam importantes e fundamentais para viabilizar pesquisas relacionadas com conservação e produção dessa espécie.

Existem numerosas técnicas moleculares disponíveis para avaliar a diversidade genética entre indivíduos e entre populações, dentre estas, destacam-se os marcadores moleculares, utilizados para estimar o número de modificações dos nucleotídeos entre alelomorfos. As informações provenientes dessa análise são, em seguida, empregadas em estudos de genética de populações ou de diversidade genética, que contribuem em pesquisas relacionadas à preservação, manutenção e produção de espécies.

Em quelônios, os marcadores moleculares têm sido muito empregados na avaliação de polimorfismos de DNA genômico e mitocondrial. Particularmente, o DNA mitocondrial constitui-se de uma molécula de DNA circular, de fita dupla, pequena e que se apresenta em múltiplas cópias na mitocôndria. Este DNA apresenta altas taxas de mutação quando comparado ao DNA genômico, pois possui uma região não codificadora chamada de região controle, característica que o torna importante nos estudos de variação genética entre populações, assim como outros relacionados à evolução entre indivíduos, espécies e populações.

Nesse contexto, as informações provenientes do estudo de polimorfismos no DNA mitocondrial se tornam importantes e necessários para o monitoramento da variabilidade genética do *Podocnemis unifilis*, e assim obter informações que possam ser aplicadas em estudos de conservação genética e produção comercial, e ainda contribuir em tomadas de decisões relacionadas à preservação dos ambientes de captura desses quelônios. Além disso, gera informações necessárias para a recuperação e manutenção da diversidade genética dos estoques naturais do tracajá que apresentarem sinais de esgotamento, evitando a possível extinção desta espécie.

Assim, este trabalho tem como objetivo geral caracterizar a variabilidade genética de populações nativas de *Podocnemis unifilis* em diferentes regiões do Baixo Amazonas, utilizando a região controle do DNA mitocondrial.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. QUELÔNIOS

Os quelônios existem, aproximadamente, desde o Jurássico (250 milhões de anos) até hoje, e possuem cerca de 211 a 335 espécies de água doce, salgada (8) ou terrestre (34) (GARSCHAGEN, 1995). É o grupo de animais que compõem as tartarugas, os jabutis e os tracajás como seus representantes mais conhecidos (ANDRADE *et al*, 2005).

Os quelônios possuem o corpo envolvido por uma carapaça ou casco, formada por placas ósseas e coberta por placas córneas. A parte que cobre o dorso é a carapaça propriamente dita, e a parte que cobre o ventre é denominada plastrão. Quando lesada, a carapaça pode se regenerar devido à formação de novo tecido ósseo córneo (IBAMA, 1989). Além desta característica pré-histórica, os representantes desta ordem também se caracterizam por mandíbulas desenvolvidas formando bico córneo, língua não extensível, ausência de dentes e pescoço retrátil (ORR, 1986).

As espécies mais conhecidas dos ribeirinhos são a tartaruga-verdadeira ou tartaruga-amazônica (*Podocnemis expansa*), o tracajá (*Podocnemis unifilis*), o iacá ou pitiú (*Podocnemis sextuberculata*), o calalumã ou irapuca (*Podocnemis erythrocephala*) e o cabeçudo (*Peltocephalus dumerilianus*) (ANDRADE *et al*, 2005).

2.2. TRACAJÁ, *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848)

Na Taxonomia se encontra no Filo: Cordado, Sub-Filo: Vertebrado, Super-Classe: Tetrápodo, Sub-Classe: Anapsida, Classe: Répteis, Ordem: Quelônio, Família: Podocnemidae
Espécie: *Podocnemis unifilis*.

A *Podocnemis unifilis* (TROSCHER, 1848) (Figura 01), também conhecida como tracajá, é uma espécie nativa e vastamente distribuída na drenagem do Rio Amazonas (IVERSON, 1992), sendo encontrada em águas brancas, pretas e claras, assim como em lagos e reservatórios, constituindo como importante fonte de alimento para diversas populações no estado do Amazonas (ANDRADE, 2004; CANTARELLI & HERDE, 1989).



Figura 1 - Exemplar de *Podocnemis unifilis*

FONTE: Retirado de <<http://www.tracaja-e.net/9902.htm>> Acesso em: 03 janeiro 2011

Este quelônio apresenta patas curtas e cobertas com pele rugosa, cabeça achatada e cônica, de pequeno tamanho em relação ao corpo. Possui manchas amareladas na cabeça, na parte dorsal, e olhos bastante juntos, separados por um sulco (ANDRADE, 2007). As manchas amarelas desaparecem em fêmeas adultas persistindo nos machos adultos.

As fêmeas são maiores que os machos e chegam a medir cerca de 50 cm de comprimento de carapaça e pesar até 12 kg (SOINI, 1995). Supõe-se estar maduro sexualmente após os sete anos. Alimentam-se de frutas, sementes, raízes, folhas, e ocasionalmente de insetos, crustáceos e moluscos (REIS, 1994).

Esta é uma espécie que pode ser manejada em cativeiro para fins de repovoamento, ou para fins comerciais. Possui um grande potencial devido algumas vantagens como: fácil adaptação às condições bióticas e abióticas de cativeiro, resistência à manipulação, elevada taxa reprodutiva em cativeiro, fácil adaptação aos alimentos de origem animal e vegetal, rápido crescimento inicial (ACOSTA et al., 1995).

2.3. PREDACÃO DE QUELÔNIOS

Os quelônios possuem grande valor para os moradores da várzea: sua carne e seus ovos fazem parte da alimentação das famílias nortistas. A carapaça serve para produzir objetos artesanais. A banha e os ovos são usados nas indústrias de medicamentos e de cosméticos. Mas isso significa também uma constante ameaça para esses animais (ANDRADE *et al*, 2005).

As principais causas que ameaçam esses animais é a caça comercial ilegal, aumento do numero de pescadores nos lagos e nos rios, destruição da casa dos animais por ação antrópica ou por animais como gado que invadem a várzea e destrói os ninhos dos quelônios e a alta taxa de mortalidade de filhotes e embriões ocasionados pela predação de uma grande diversidade de animais, assim, geralmente, os animais jovens não conseguem chegar á reprodução e gerar descendentes. De acordo com SALERA JUNIOR *et al* (2009), fêmeas adultas de *P. unifilis* apresentam um maior número de predadores que *P. expansa*, isso pode ser atribuído, possivelmente, ao seu menor porte e massa corpórea.

Atualmente o tracajá, é a espécie de quelônio mais procurado e consumido na Amazônia. Após 300 anos, já não se produz mais óleo, apenas carne e ovos ao longo de toda a cadeia de consumo (REBÊLO & PEZZUTI, 2000).

Em decorrência destes fatores o *P. unifilis* apresenta-se como vulnerável na lista vermelha da IUCN (International Union for Conservation of Nature) de 2009 e está listado no Apêndice II da CITES (Convention on International Trade in Endangered Species). A criação comercial, permitida pelo IBAMA, pela Portaria N ° 142/92, ainda não consegue atender o mercado e seus preços, ainda são elevados (ANDRADE *et al*, 2007). Ainda assim CANTO *et al* (1999), ao realizarem um levantamento preliminar da comercialização ilegal de produtos da fauna no Estado do Amazonas, registram que as classes mais apreendidas são répteis (principalmente, quelônios) com 52,2%, mamíferos 30% e aves 17,8%.

2.4. VARIABILIDADE GENÉTICA E MARCADORES MOLECULARES

A variabilidade genética é o princípio básico para estudos genéticos e de melhoramento, permitindo selecionar e estudar a herança de caracteres (MEDEIROS-GALVÃO, 1998). Para que haja evolução adaptativa é fundamental a existência da variação genética, devido à atuação da seleção natural sobre estas variações (SILVA, 2002). A perda acentuada de indivíduos das populações ou o desaparecimento de espécies resulta em redução da variabilidade genética. A perda dessa variabilidade proporciona aumento dos níveis de homozigose nas populações, o que permite a expressão de genes deletérios que causam injúrias nos processos de produção e reprodução dos animais (FALCONER & MACKAY, 1992), podendo levar espécies à extinção.

O monitoramento da variabilidade genética das populações pode ser realizado utilizando-se metodologias de análise molecular, como os marcadores moleculares, sendo que estes têm se mostrado bastante eficientes no estudo de populações de organismos aquáticos

A região controle (alça-D ou *D-loop*) é a região não codificadora do genoma mitocondrial. Apresenta em torno de 1100 pares de bases e localiza-se entre as regiões codificadoras de dois RNAs transportadores (tRNA), o tRNA da prolina, e o tRNA da fenilalanina. Esta região é chamada *D-loop* (*displacement loop structure*) ou alça-D porque nela estão contidos os sítios de iniciação da replicação da fita pesada (H) e os promotores de transcrição das fitas leve e pesada (BROWN *et al.*, 1986; HONEYCUTT & WHEELER, 1990; STRACHAN & READ, 1996).

3. METODOLOGIA

3.1. AMOSTRAGEM

Foram coletadas amostras de sangue de 60 indivíduos provenientes de três localidades próximas ao município de Parintins, na Região do Baixo Amazonas, conhecidas como Lago Máximo, Lago da Valéria e Lago do Paranema (Figura 3), sendo amostrados 20 indivíduos por localidade.

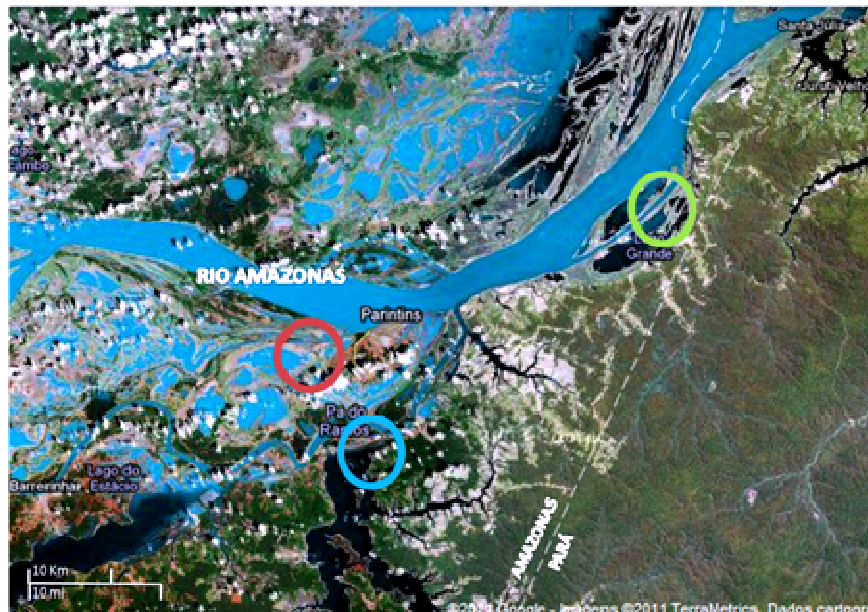


Figura 3 - Vista Aérea das localidades amostradas : azul - Máximo; verde - Valéria e; vermelha - Paranema.

FONTE: Retirado de <http://www.google.maps.com.br>. Acesso em 29 de junho de 2011.

3.2. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a obtenção das amostras de sangue utilizou-se indivíduos jovens e recém eclodidos, coletando-se 50 µL de sangue de cada indivíduo através de punção da veia femural. O material foi preservado em microtubos tipo *eppendorf* contendo 500 µL de etanol absoluto e conservado em temperatura ambiente. Em seguida, os animais foram devolvidos para a natureza no mesmo local de onde foram amostrados, sendo que nenhum animal foi sacrificado. Realizaram-se as coletas com o apoio do Projeto Pé de Pincha. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Genética da Universidade Federal do Amazonas – UFAM/MANAUS, sob supervisão da professora Maria das Neves Silva Viana e no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM/PARINTINS.

3.3. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se a metodologia proposta por Doyle & Doyle (1987). Este protocolo utiliza o CTAB, que é um detergente catiônico (*cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) que solubiliza as membranas celulares, juntamente com a Proteinase K, formando um complexo com o DNA, que é posteriormente precipitado com etanol.

Verificou-se a eficácia da extração e a concentração do DNA através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, e após o término da corrida eletroforética visualizou-se os resultados em um transluminador de luz ultravioleta VDS. Após a quantificação o DNA foi diluído na concentração de 20 ng e estocado a -5°C.

3.4. AMPLIFICAÇÃO *IN VITRO* VIA PCR

O DNA foi amplificado empregando a técnica PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando-se iniciadores específicos para a região controle do DNA mitocondrial, com as seguintes seqüências: PRO (5'-CCCATCACCCACTCCCAAAGC-3') (SITES *et al.*, 1999), e 12SR5 (5'-GTCAGGACCATGCCTTTGTG-3') (KOCHER *et al.*, 1989).

A reação de PCR foi realizada em microtubos tipo *ependorff* de 0,2mL, sendo as quantidades dos componentes padronizados iguais a 6,3µL de Água MilliQ, 1,0µL de DNA, 1,5µL de cada iniciador (PRO e 12SR5), 1,2µL de MgCl₂ (50mM), 0,5µL da enzima Taq polimerase (5 U/µL), 1,5µL de dNTP e 1,5µL de tampão de PCR [10 mM Tris-HCl (pH 9,0) e 50 mM KCl], completando em um volume final de 15 µL de reação.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador cujo programa foi ajustado para os seguintes perfis de temperatura: 92°C por um minuto para a desnaturação das fitas complementares do DNA; seguidos por 35 ciclos de 92°C (1 minuto), 55 °C (35 segundos), 72°C (1minuto e meio) para o anelamento dos *primers*; e 72°C por 5 minutos para a extensão final à dos segmentos amplificados de DNA.

A eficiência da amplificação foi verificada por meio de corridas eletroforéticas, por aproximadamente 45 min., aplicando-se 2 µL do produto amplificado de cada reação em gel de agarose 1,0 %, . Por comparação com o marcador 1 Kb DNA Ladder, foi determinado o tamanho do fragmento amplificado. Após o término da corrida, o gel foi corado com gel RED e observado em um transluminador de luz ultravioleta VDS.

3.5. PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

A purificação foi realizada com PEG 8000 e NaCl (20% w/v PEG, 2,5 M NaCl) específico para purificação. Esse processo consiste na eliminação dos vários tipos de produtos

não incorporados na reação de amplificação como primers, dntps, sais e outras moléculas de peso molecular baixo. Este DNA purificado foi utilizado na reação de seqüenciamento.

3.6. REAÇÃO DE SEQUÊNCIA

A reação de seqüência também foi realizada através da técnica de PCR na qual o volume final de cada reação foi ajustado pra 10 µl. A reação foi preparada em placas com 96 poços, em seguida levada ao termociclador por 25 ciclos com o seguinte perfil de temperatura: 20 segundos a 95 °C a fim de desnaturar as fitas complementares, 15 segundos à 50 °C para o anelamento dos *primers* e 1 minuto à 60 °C para a extensão da região a ser seqüenciada.

Após o término da PCR de seqüenciamento, o produto foi precipitado utilizando método EtOH/EDTA *precipitation - Cycle sequencing*. O produto purificado foi submetido à uma reação de genotipagem que foi seqüenciada em seqüenciador automático MegaBACE 1000 Amersham Biosciences, seguindo a metodologia padrão do fabricante, que gerou uma seqüência nucleotídica de cada amostra.

O alinhamento e edição das seqüências foi realizado no programa BioEdit (HALL, 1999). Com o auxílio da ferramenta ClustalW (THOMPSON *et al*, 1994) foi feito o alinhamento automático, e em seguida as seqüências foram editadas manualmente.

3.6. ANÁLISE GENOTÍPICA

Realizou-se a análise genotípica utilizando-se os programas *Genetic Profiler* e *Fragment Profiler*, a fim de identificar o genótipo de cada loco para os indivíduos amostrados. Em seguida, construiu-se uma matriz com as informações dos genótipos dos indivíduos para as análises estatísticas.

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS POPULACIONAIS

3.7.1. ANÁLISES DA FREQUÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS

As medidas estatísticas de genética populacional foram realizadas através das análises das frequências e distribuição dos haplótipos utilizando o programa TCS (CLEMENT et al., 2000). O cladograma dos haplótipos obtido com o auxílio do programa TCS foi utilizado para realizar a *Nested Clade Analysis* (NCA). Esta análise converte o cladograma em uma série de ramos ou clados hierarquicamente agrupados e, juntamente com as informações sobre a distribuição geográfica dos haplótipos foram utilizadas para as análises de associações geográficas no programa GeoDis versão 2.0 (POSADA et al., 2000).

3.7.2. ANÁLISES DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

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 que considera o número de mutações entre os haplótipos.

Estimativas sobre a existência de polimorfismo intra-específico e divergências genéticas entre populações foram obtidas através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992), utilizando-se o programa Arlequin versão 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005), e aplicando-se o F_{ST} de WRIGHT (1969), o qual descreve a quantidade de diferenciação e fluxo gênico entre as populações (NEIGEL, 2002). Este modelo estatístico (AMOVA) é baseado em análises de variação de frequência gênica levando em consideração o número de mutações entre os alelos.

Para testar se as mutações encontradas ao longo das seqüências de DNA realmente eram neutras, foram aplicados os testes de neutralidade seletiva de Tajima e Fu, estes testes são muito utilizados em análises genéticas de populações. 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 foram estimados no programa Arlequin versão 3.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizou-se a extração de DNA de 60 amostras de sangue de *Podocnemis unifilis*. O DNA extraído foi avaliado e quantificado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, como pode ser observado na Figura 4. De modo geral, o DNA mostrou-se íntegro sem quaisquer sinais de degradação, que quando presente é representado por um arraste no gel de agarose.

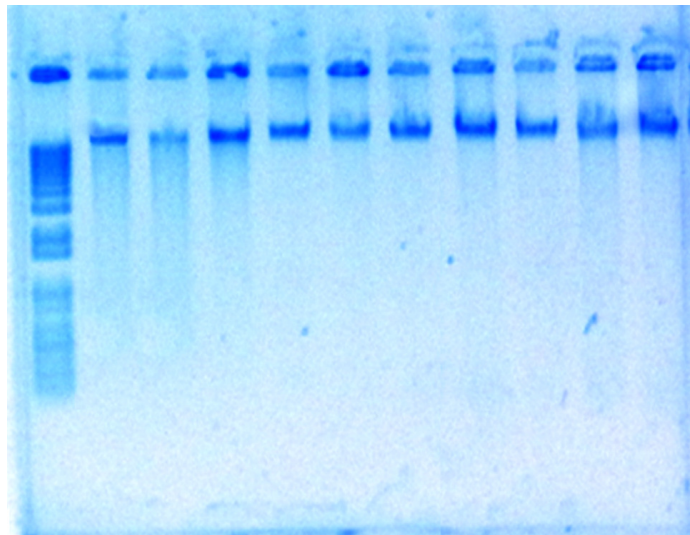


Figura 4 - Gel de quantificação de DNA de *Podocnemis unifilis*

O padrão de amplificação das amostras podem ser visualizados na Figura 5, onde é possível observar que o tamanho do fragmento de DNA amplificado é de aproximadamente 1.100 pb.

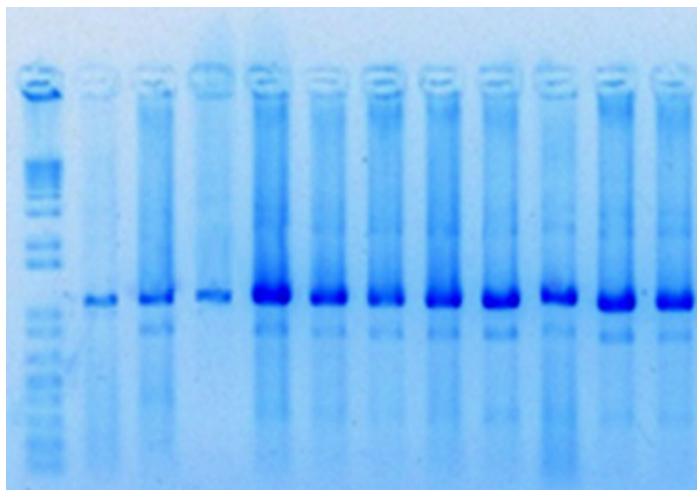


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose a 1,0 % dos produtos amplificados do DNA mitocondrial de *Podocnemis unifilis*, mostrando o padrão de migração do fragmento de aproximadamente 1.100 pb comparados com aqueles DNA de peso molecular conhecido (1Kb Ladder).

Purificou-se o produto da PCR para que produtos indesejáveis não viessem acarretar em falhas no processo de seqüenciamento.

O seqüenciamento gerou seqüências de DNA que foram alinhadas no programa BioEdit (HALL, 1999) obtido pela ferramenta Custal W sendo então editadas manualmente.

O banco de dados para análises de populações foi composto por 32 seqüências de DNA da região mitocondrial, sendo 22 pertencentes a localidade do Paranema, 06 da localidade da Valéria e 04 da localidade do Máximo. A obtenção desse número de amostras foi resultado da ineficácia no processo de purificação de DNA, onde resíduos de reações que são prejudiciais ao seqüenciamento persistiram e impossibilitaram a leitura das seqüências de DNA.

As seqüências formaram um seguimento de nucleotídeos com um total de 487 pares de bases cada. A composição média de bases nucleotídicas deste fragmento parcial da região controle do DNA mitocondrial foi de: 24,17% para Adenina, 33,22% para Timina, 30,75% para Citosina e 11,86% para Guanina para uma dispersão (Desvio Padrão) de 9,56. A partir de todas as seqüências analisadas verificou-se que 466 sítios foram monomórficos e 21 foram

polimórficos. Dentre os sítios variáveis, 17 corresponderam a mutações do tipo transição e 4 do tipo transversão. A Tabela 1 mostra a composição nucleotídica encontrada em cada população e sua dispersão. SILVA (2002) analisando a região ND1 do DNA mitocondrial de *Podocnemis sextuberculata* de três regiões do Amazonas encontrou 9 mutação do tipo transição e 14 do tipo transversão de 23 sítios polimórficos.

Tabela 1 - Composição nucleotídica encontrada em cada população.

Composição nucleotídicas	Máximo	Parananema	Valéria
C%	30,63	30,82	30,80
T%	33,23	33,16	33,26
A%	24,26	24,13	24,13
G%	11,88	11,89	11,81
Desvio Padrão	9,52	9,54	9,60

Considerando os 32 indivíduos obtidos de três amostras populacionais situadas na região de Parintins, foram definidos 7 haplótipos, e destes, 3 foram únicos os *singletons*, e apenas um haplótipo (134P) está presente em todas as localidades representado por 11 indivíduos (Figura 6). Além deste foi observado que o haplótipo 131P também representado por 11 indivíduos se encontra distribuído em igual proporção, mas, neste não foram observados representantes da localidade Valéria. Estes dois haplótipos juntos equivalem a aproximadamente 69% do total de haplótipos identificados e constituem os haplótipos de maior distribuição geográfica quando comparados a outras populações próximas a Parintins. Tais características estão de acordo com o critério de origem baseado na frequência descrito por Templeton (1987) e segundo o qual um destes seria o haplótipo ancestral dos indivíduos de tracajá estudados.

Observou-se também a presença de elipses menores, que ligam os haplótipos identificados, estes correspondem aos haplótipos não amostrados (*missing haplotypes*) ou que não foram encontrados nas amostras populacionais examinadas, sendo necessário aumentar o número de amostras para que sejam identificados ou sua existência pode ser atribuída a sua extinção ao longo de milhões de anos (SANTOS, 2004).

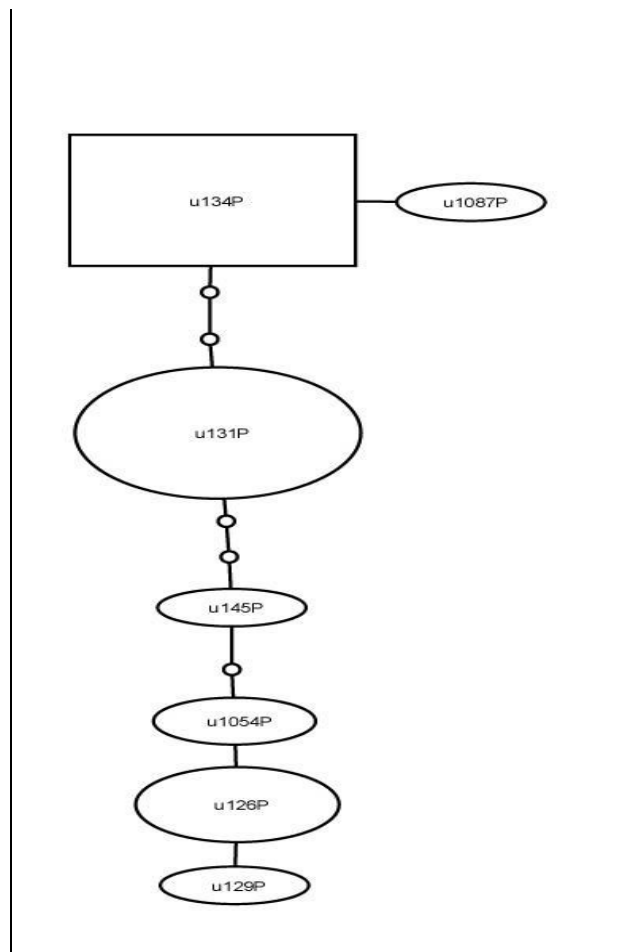


Figura 6. Cladograma dos haplótipos identificados de *Podocnemis unifilis*.

Os níveis de variabilidade genética, estimados com base nos parâmetros genéticos e na análise de polimorfismo de DNA, estão sumariados na Tabela 2. A diversidade gênica (\hat{H}) total foi estimada em 0,662. Este valor indica que as populações apresentam bons níveis de diversidade. A diversidade nucleotídica (II) observada quando reunidas todas as localidades

amostradas foi de 0,0063 (0,63%) e variou de 0,007 em Parananema, 0,002 no Máximo e 0,01 em Valéria. Estas estimativas de polimorfismo genético indicam diferentes níveis de variabilidade genética ao longo da área estudada.

Os valores resultantes dos testes de neutralidade seletiva de mutações indicam que as localidades estão em equilíbrio genético com relação aos haplótipos do DNA mitocondrial (Tabela 2). O Teste D de Tajima não foi significativo ($P < 0,05$) para as localidades. O F_s de Fu também não mostrou desvio significativo da expectativa neutra das mutações. 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), apropriados para seqüências de DNA. Portanto, como não foram encontrados desvios significativos, os dois testes estatísticos indicam que as populações estudadas estão em equilíbrio genético.

Tabela 2. Parâmetros genéticos estimados para *Podocnemis unifilis*

Populações	N	S	NH	\hat{H}	Π	D de Tajima	F_s de Fu
PAR	22	9	5	$0,718 \pm 0,064$	0,00754	1,6385	2,907
MAX	6	4	3	$0,600 \pm 0,215$	0,00273	1,2950	0,297
VAL	4	6	2	$0,667 \pm 0,204$	0,01095	2,1975	4,151

NOTA: $P < 0,05$; N = Número de Indivíduos; S = Número de Sítios Polimórficos; NH = Número de Haplótipos; \hat{H} = Diversidade Gênica; Π = Diversidade Nucleotídica (por sítio); PAR = Parananema; MAX = Lago Máximo; VAL = Comunidade Valéria.

Análises de variância molecular (AMOVA), e análises de expansão populacional e polimorfismo do DNA foram realizados no programa Arlequin (SCHNEIDER *et al.*, 2001). Os resultados revelaram uma alta taxa de diversidade genética para as amostras populacionais estudadas. Os valores de F_{ST} revelaram um baixo grau de subdivisão populacional ($\Phi_{ST} = 0,1838$, $P < 0,034$). Os resultados mostraram que 18,39% da variância total ocorrem entre as populações, entretanto a maior variação genética foi atribuída à variância dentro das amostras

populacionais (81,61%). Tais resultados também evidenciaram que existe estruturação genética entre os locais amostrados ($F_{ST}=0,1838$; $P=0,034$).

Os valores obtidos das comparações múltiplas entre os pares de populações através do índice Φ_{ST} foram utilizados para estimar o fluxo gênico das fêmeas. Os resultados indicam o número efetivo de fêmeas de tracajá migrantes por geração entre as localidades (Tabela 3). Todas as comparações entre o Máximo e as outras duas localidades foram significativas apesar dos valores de Nm (número de migrantes por geração) terem sido maiores que 1. O fluxo gênico dado pelo equivalente ao número de migrantes por geração Nm é uma força contrária e impõe um limite à diferenciação genética. Valores de Nm maior do que um é indicativo de que a divergência genética está sendo refreada (HARTL & CLARK, 1989). Este resultado indica que existe estrutura genética entre as populações, mas devemos levar em consideração o pequeno número amostral para as localidades do Máximo e Valéria o que pode estar interferindo nas comparações. Para confirmar estes resultados é necessário aumentar o número de indivíduos analisados para estas duas localidades.

Tabela 3. Estimativa indireta de fluxo gênico (Nm) (acima da diagonal e à direita) e diferenciação genética (Φ_{ST}) (abaixo da diagonal e à esquerda) entre os pares de populações de *P. unifilis*.

Populações	Parananema	Máximo	Valéria
Parananema	–	1,2522	inf
Máximo	0,3992*	–	1,3877
Valéria	0,0000	0,3603*	–

NOTA: * Nível de significância $P < 0,008$ (após a correção de Bonferroni); inf= infinito.

Na tabela 3 os valores encontrados para o F_{ST} são inversamente proporcionais aos valores de Nm , ou seja, quanto maior o número de migrantes, os valores de F_{ST} são menores. Logo com o numero alto de Nm pode-se sugerir uma baixa taxa de migração. Segundo

GIBBONS (1986) muitas espécies de quelônios se movimentam a grandes distancias em respostas a mudanças sazonais, mas a resposta para condições adversas pode variar dentro e entre espécies. Forner (2001) também encontrou esta característica para a espécie de *P. unifilis* utilizando RAPD como marcador molecular onde os resultados também sugerem baixa migração.

Os resultados da análise de variância molecular mostraram que grande parte da variação genética ocorre dentro das localidades amostradas. Contudo, os significantes valores de Φ_{ST} de algumas comparações entre localidades e o grau de estrutura observada pelos resultados de AMOVA sugerem que a localidade do Máximo (Tabela 3) encontra-se geneticamente diferenciada.

A distribuição geográfica desses animais nos afluentes do rio Amazonas possivelmente pode explicar o porquê da população da localidade do Máximo se encontrar geneticamente diferenciada, quando comparada com as localidades da Valéria e Parananema, pois está localizada em uma região de águas claras, ao contrario das demais. Por outro lado, as localidades da Valéria e do Parananema estão conectadas diretamente pelo rio Amazonas o que estabelece fluxo contínuo de genes entre as regiões que é confirmada na Tabela 3, onde observamos que existe o fluxo gênico infinito. De acordo com Castro *et al* (2008), para as tartarugas de água doce do gênero *Podocnemis*, as características morfológicas dos rios afetam o seu ciclo biológico e conseqüente sua migração. O rio Amazonas possui tributos de águas brancas, claras e pretas, sendo este um fator que influencia a distribuição e a sobrevivência de muitos organismos aquáticos (SANTO *et al*, 2003).

Contudo, considerando o pequeno número amostral para duas das três localidades estudadas, faz-se necessário ampliar o numero de indivíduos para que possamos chegar a uma conclusão definitiva.

5. CONCLUSÃO

A utilização da região controle do DNA mitocondrial (*D – loop*), mostrou-se eficiente para estimar a variabilidade genética das populações da *Podocnemis unifilis*, sendo de grande relevância como marcador molecular para o monitoramento genético desta espécie.

Apesar de ter sido encontrada uma pequena variabilidade genética em uma das populações estudadas nesse caso a localidade de Máximo, as localidades de Valeria e Parananema podem ser consideradas uma única e grande população panmítica.

A variabilidade genética encontrada entre as localidades amostradas possivelmente podem ser provenientes da pressão antrópica ou de fatores ambientais que podem determinar as condições de existência para os seres vivos, bem como influenciar na sua distribuição.

Estudos como este podem servir como referência para futuros projetos de manejos com tracajá. Caso seja necessário repovoar uma área (tabuleiro) com a espécie, pode-se capturar animais em qualquer umas das localidades estudadas. Ou se ocorrer uma apreensão de uma grande quantidade desses animais provenientes dessa região, essas informações possibilitam que os órgãos responsáveis possam fazer a soltura em um ponto mais acessível, podendo assim ser devolvida a natureza, poupando despesas com transportes e não correndo risco de colocar esses animais em um ambiente ao qual não está adaptado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ANDRADE, P. C. M. **Criação e manejo de quelônios no Amazonas: Projeto Diagnóstico da Criação de Animais Silvestres no Estado do Amazonas.** IBAMA/UFAM/SDS/Manaus/AM, 2004. 492 p.

_____. **Criação e Manejo de Quelônios no Amazonas: Projeto Diagnóstico da Criação de Animais Silvestres no Estado do Amazonas.** (I Seminário de Criação e Manejo de Quelônios da Amazônia Ocidental). 2. ed. ProVárzea/FAPEAM/SDS/Manaus/AM, 2008. 528 p.

_____. **Criação e Manejo de Quelônios no Amazonas: Projeto Diagnóstico da Criação de Animais Silvestres no Estado do Amazonas.** (I Seminário de Criação e Manejo de Quelônios da Amazônia Ocidental). 2. ed., ProVárzea/FAPEAM/SDS/Manaus/AM, 2007.447 p.

_____. *et al.* **Projeto Pé-de-pincha, Parceria de futuro para conservar quelônios na várzea amazônica.** Coleção Iniciativas Promissoras. Vol. 1. IBAMA/Provárzea, 2005. 27 p.

AVISE, J. C.; HELFMAN, G. S.; SAUNDERS, N. C.; STANTON, L. H. **Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population Genetic consequence of an unusual History Pattern.** Proc. Nat. Acad. Sci., 1986.

_____. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution.** Chapman and Hall, New York, NY, 1994.

BROWN, W. M. **Mechanisms of Evolution in Animal Mitochondrial DNA.** Ann. N.Y. Acad. Sci, (361): 119-134, 1981.

_____. GADALETA, G.; PEPE, G.; SACCONI, C.; SBIZA, E. **Structural conservation and variation in the D-Loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA.** *J. Mol. Biol.*, 192: 503-511, 1986.

_____. **O genoma mitocondrial dos animais.** In: Macintyre, RJ. *Molecular Evolutionary Genetics.* Plenum Press, New York, p 95-130, 1985.

BUSO, G. L. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. O. S. **Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites.** Circular Técnica Embrapa, Brasília-DF, n. 20, p.1-11, 2003.

CANTARELLI, V.H.; HERDE, L.C. **Projeto quelônios da Amazônia 10 anos. Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.** Ministério do Interior, Brasília, 1989. 122p.

CANTO, S. L. O.; OLIVEIRA, M. da S. de; RODRIGUES, E. C. P. de G.; DUARTE, J. A. da M.; ANDRADE, P. C. M. **Consumo de produtos da fauna silvestre no estado do Amazonas.** In: CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE FAUNA SILVESTRE EN AMAZONIA Y LATINOAMERICA. 4. Assuncion – Paraguay, 1999.

CASTRO, P. T. A.; FERREIRA JR, P. D. **Caracterização ecogeomorfológica das áreas de desova de quelônios de água doce (gênero podocnemis) no entorno da ilha do bananal, rio Araguaia.** Geografias Artigos Científicos. Belo Horizonte. janeiro-junho de 2008.

CHAND, V.; BRUYN, M.; MATHER, P. B. **Microsatellite loci in the eastern form of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*).** *Molecular Ecology Notes*, v. 5, p. 308-310, 2005.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRALDALL, K.A. **TCS: a computer program to estimate gene genealogies.** *Molecular Ecology*, v. 9, p. 1657-1659, 2000.

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

EPPERSON, B. K.. **Geographical genetics.** Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA. 2003.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. **Analyses of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data.** *Genetics*, v. 131, n. 2, p. 479-49, 1992.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to Quantitative Genetics.** 4th Ed. London: Longman Press, 1996. p.463.

FANTIN, C.; CARVALHO, C. F.; HRBEK, T.; SITES JR, J. W.; MONJELÓ, L. A. S.; ASTOLFI-FILHO, S.; FARIAS, I. P. **Microsatellite DNA markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle.** *Molecular Ecology Notes*, v. 7, p. 1235–1238, 2007.

FREELAND, J.R. **Molecular Ecology.** John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 388p, 2005.

FREITAS, P. D.; CALGARO, M. R.; GALETTI Jr., P. M. **Genetic diversity within and between broodstocks of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae) and its implication for the gene pool conservation.** *Brazilian Journal Biology*, v. 67(4 Suppl.), p. 939-943, 2007.

FORNER, O. **Estudo da Variabilidade Genética Intrapopulacional em *Podocnemis unifilis* com Marcadores RAPD.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos/ Universidade Federal do Amazonas. 2001. P.82.

FU, Y.X. 1997. **Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection.** *Genetics*, 147: 915-925.

GARSCHAGEN, D. M. **Tartaruga. Enciclopédia Barsa.** Rio de Janeiro : Ed. Atlas, 1995. v. 14, p. 474-76.

GIBBONS, J. W. **Movement patterns among turtle populations: applicability to management of the desert tortoise.** *Herpetologica*, 1986. V. 42, n. 1, p. 104-113.

IBAMA. **Projeto Quelônios da Amazônia, 10 anos.** Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília, 1989.

IUCN. **Red List of Threstened Animals.** 2008-2009. Disponível em: <www.redlist.org> Acesso em 23/05/10.

IVERSON, A. **A revised checklist with distribution maps of turtle of the world.** Privately printed. Paust printing, Richmond, Indiana, 1992. 363p.

HONEYCUTT, R.I.; WHELLER, W.C. 1990. **Mitochondrial DNA: Variation in humans and higher primates. In: Dutta, S.K.; Winter. W.P. (ed.). DNA Systematics.: Human and higher Primates. Vol.3.** Boca Roton, Florida, CRC Press inc., p. 91-124.

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

KOCHER, T. D., THOMAS, W. K., MEYER, A., EDWARDS, S. V., PAABO, S., VALLABLANCA, F. X., WILSON, A. C. **Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989. 86: 6196-6200.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª edição. Editora Sarvier, São Paulo, 1995. 839p.

MEDEIROS-GALVÃO, R. **Variabilidade genética detectada por RAPD em *Glomerella cingulata*, um dos fungos endofíticos mais frequentes isolados em *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos / Universidade do Amazonas, 1998. p.151.

MOREIRA, H. L. M.; ZIMMERMANN, S.; RIBEIRO, R. P.; BASTOS, R. G.; VARGAS, L. D.; POVH, J. A. **The use of RAPD Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia**. In: World Aquaculture, Salvador . Proceedings... INVE, 2003. p.460.

NEIGEL, J.E. **Is FST obsolete?** *Conservation Genetics*, 2002. 3:167-173.

MEYER, A.; **Evolução do DNA mitocondrial em peixes**. *Biochemistry and molecular biology of fishes*. (2): 1-38, 1993.

MOLINIER, M.; GUYOT, J.L.; OLIVEIRA, E.; GUIMARÃES, V.; CHAVES, A. **Hidrologia da Bacia do Rio Amazonas**. Ciência e tecnologia. DRSTOM fonds Documentaire n° 41.720 ex. 1, cota B, 1995. 31p.

MORITZ, C.; DOWLING,; BROWN, W. M. **Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematic**. *Ann. Ver. Ecol. Syst.*, (18): 269-292, 1987.

NOVELLE, S. M. H. **Caracterização do micro-habitat dos ninhos e predação dos ovos de *Podocnemis erythrocephala* em áreas de desova do rio Ayuanã, AM**. 2006. 81f. Dissertação (Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, 2006.

OLIVEIRA, A. B. **Palestra- Manejo Comunitário de Quelônios no médio rio Amazonas e Juruá – PROGRAMA “PÉ-DE-PINCHA”**, 2010.

ORR, R.T. **Biologia dos Vertebrados**. 5ª Edição. São Paulo: Editora Roca Ltda, 1986.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A.; TEMPLETON, A.R. **GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes**. *Molecular Ecology*, v.9, n. 4, p. 487-488, 2000.

POVH, A. P. *et al.* **Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, n.2, p.201-206, 2008.

REBÊLO, G.; PEZZUTTI, J.; **Percepções sobre o consumo de quelônios na Amazônia: sustentabilidade e alternativas ao manejo atual**. *Ambiente & Sociedade – Ano III*, p. 87-88, 2000.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Ed. Brasília: EMBRAPA, 2001. p.215.

- REIS, I. J. **Criação em cativeiro: Cresce interesse pela criação e comercialização de quelônios, Chelonia**. Goiânia: Cenaqua, Área técnica de criação em cativeiro, 1994. p. 4.
- ROSA, A. J. M.; PAIVA, R. S. **Marcadores Moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico**, Platina, DF: Embrapa Cerrado, 2009.
- SALERA JUNIOR, G.; MALVASIO, A.; PORTELINHA, T. C. G. **Avaliação da predação de *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) no rio Javaés, Tocantins**. Acta Amazônica, vol. 39(1) 2009: 207 – 214.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- SANTO, A. P. E. *et al.* **Controle reprodutivo de quelônios (Reptilia, Chelonia) em cativeiro**. XXVII Congresso da Sociedade de Zoológicos do Brasil. Bauru/SP. 2003.
- SANTOS, R. C. **Estrutura genética das populações de irapuça (*Podocnemis erythrocephala*, Podocnemididae) da Amazônia brasileira: implicações para a conservação**. 65f. Dissertação (Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.
- SCHIAVINATO, J. L. S; GALETTI, P. M. Jr.; FREITAS, P. D. **Análise da diversidade genética em duas famílias de camarões cultivados *Litopenaeus vannamei* utilizando marcadores microssatélites obtidos de regiões arbitrárias e expressas do genoma desta espécie**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. p.386.
- SILVA, T.J.; **Genética de conservação de *Podocnemis sextuberculata* (TESTUDINES, PELOMEDUSIDAE, CORNOALIA, 1849) utilizando ND1 do DNA mitocondrial**. 2002. 63f. Dissertação (mestrado) – Universidade federal de São Carlo, Amazonas.
- SISTEMA DE INFORMAÇÃO TERRITORIAIS. Disponível em: <<http://www.sit.mda.gov.br/territorios>> Acesso em 03 janeiro 2011.
- SITES, J. W., FITZSIMMONS N. N.; SILVA, N. J. AND CANTARELLI, V. H. **Conservation genetics of the Giant Amazon River Turtle (*Podocnemis expansa*; Pelomedusidae) - inferences from two classes of molecular markers**. *Chelon. Conserv.* 1999. Biol. 3 (3): 454-463.
- SOINI, P.; SOINI, M. **Um resumen comparativo de la ecologia reproductiva de los quelônios acuáticos**. In: SOINI, P.; TOVAR, A.; VALDEZ, U. (Ed.). **Reporte Pacaya_Samiria. Investigaciones em cahuana, 1980-1994**. Informe N° 19, p. 215-226. Lima, Peru. 1995(b). CDC-UNALM;FPCN;TCN.
- STRACHAN, T.; READ, A.P. **Human molecular genetics**. *Bios Scientific Publishers Ltda*, Oxford. 1996. 610 p.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595. 1989.
- TEMPLETON, A.R.; BOERWINKLE, E.; SING, C.F. **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. 1987.

WRIGHT, S. **The genetic structure of populations.** *Annals of Eugenics*, 1951. 15: 323-354.

6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2010	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2011	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Revisão de literatura	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
2	Coleta de materiais		R	R		R							
3	Extração de DNA				R	R	R						
4	Amplificação do Material através de PCR				R	R	R	R					
5	Organização do Banco de Dados das Genotipagens							R	R	R	R		
6	Análise de dados									R	R	R	R
7	Elaboração do Resumo e Relatório Final									R	R	R	R
8	Preparação da Apresentação Final para o Congresso											R	R

R= Realizada