

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

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *PODOCNEMIS EXPANSA* EM UM
CRIATÓRIO AUTORIZADO PELO IBAMA NO ESTADO DO ACRE. PERSPECTIVAS
DE SOLTURA DESSES ANIMAIS PARA REPOVOAR O RIO ACRE.

Bolsista: Patrícia Monik Maués dos Santos Pantoja/ FAPEAM

Manaus
2015

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 0064/2014

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *PODOCNEMIS EXPANSA* EM UM
CRIATÓRIO AUTORIZADO PELO IBAMA NO ESTADO DO ACRE. PERSPECTIVAS
DE SOLTURA DESSES ANIMAIS PARA REPOVOAR O RIO ACRE.

Bolsista: Patrícia Monik Maués dos Santos Pantoja/ FAPEAM
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Neves Silva Viana

Manaus
2015

SUMÁRIO

1.RESUMO.....	04
2. INTRODUÇÃO.....	05
3. MATERIAIS E MÉTODOS	08
3.1 SELEÇÃO DE AMOSTRAS.....	08
3.2 EXTRAÇÃO DO DNA PARA DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS.....	08
3.3 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO DNA.....	09
3.4 ANÁLISES POPULACIONAIS.....	09
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
5. CONCLUSÃO.....	14
6. REFERÊNCIAS.....	15
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	18

RESUMO

No Brasil o gênero *Podocnemis* é representado por quatro espécies sendo elas *Podocnemis uniflis*, *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 importância para as populações ribeirinhas da região sendo utilizada, como alternativa na alimentação, a espécie *P. expansa*, é uma das mais consumidas no estado do Amazonas. Após a permissão para a criação em cativeiro destas espécies, através da portaria 142/92 IBAMA, houve um aumento na demanda comercial, entretanto pouco se conhece sobre a dinâmica e estrutura populacional. No presente trabalho caracterizamos a variabilidade genética de *P. expansa* provenientes de um criatório utilizando a região controle do DNA mitocondrial como marcador molecular e comparamos com sequências de indivíduos da mesma espécie de diferentes localidades obtidas na literatura com o objetivo de identificar a origem do plantel existente na fazenda Estância Terra. Foram analisados 109 indivíduos de *P. expansa* sendo 52 indivíduos da fazenda e 57 obtidos do GeneBank, as sequências nucleotídicas foram compostas por 500 pares de bases que foram agrupadas em 21 haplótipos, os resultados dos parâmetros genéticos evidenciam bons níveis de diversidade gênica (0.8055), e a diversidade nucleotídica foi de 0.005466. As sequências foram utilizadas para construir uma rede intraespecífica totalizando 40 haplótipos. O maior número de haplótipos compartilhados entre os indivíduos da fazenda com as demais localidades foi verificado nas amostras de Guaporé indicando a possível procedência de que parte dos indivíduos da fazenda vem de lá. A árvore de Máxima Parcimônia gerada no MEGA também mostrou um forte agrupamento entre as amostras da Fazenda e Guaporé corroborando o resultado anterior. Ainda não foi possível identificar a origem da maior parte das amostras da fazenda devido ainda não termos obtido sequências de DNA com boa qualidade, para identificar a relação genética das amostras com outras localidades, que possivelmente deram origem ao plantel da fazenda, continuaremos as análises posteriormente.

PALAVRAS-CHAVE: *Podocnemis expansa*, diversidade genética, DNA mitocondrial.

1. INTRODUÇÃO

Podocnemis expansa (SCHWEIGGER, 1812) é denominada tradicionalmente como tartaruga-da-Amazônia e pertence à ordem Testudines, subordem Pleurodira, família Podocnemidida. O gênero *Podocnemis* abrange atualmente seis espécies: *P.expansa*, *P. unifilis*, *P. sextuberculata*, *P. erythrocephala*, *P. vogli* e *P. lewyana* (PRITCHARD, 1979). Todas as espécies da Família Podocnemididae têm distribuição restrita à América do Sul, sendo que as espécies *Peltocephalus dumeriliana*, *Podocnemis erythrocephala*, *Podocnemis expansa*, *Podocnemis unifilis* e *Podocnemis sextuberculata*, ocupam toda a bacia Amazônica (POUGH, 2001).

P. expansa é conhecida como o maior quelônio de água doce do gênero *Podocnemis* na América do Sul, já que as fêmeas podem medir de 50 a 89 cm de comprimento, 60 cm de largura (ALFINITO, 1975; PRITCHARD e TREBBAU, 1984; IBAMA, 1989) e pesar de 15 a 80 kg (MITTERMEIER, 1978; ALHO e PÁDUA, 1982; PRITCHARD e TREBBAU, 1984; IBAMA, 1989). Esta espécie depende exclusivamente do ambiente aquático para o seu crescimento, locomoção e acasalamento, só deixando a água por algumas horas para se aquecer ao sol e para desovar. A desova ocorre em grandes grupos, com dezenas de fêmeas subindo às praias ao mesmo tempo. Segundo Ferreira Junior (2003), este fenômeno era um fiel registro da abundância e exuberância das populações de tartarugas do Novo Mundo. O período de nidificação varia conforme a localidade. No Brasil, ocorre de setembro a dezembro. A desova ocorre geralmente à noite e as fêmeas põem uma média de 100 ovos por postura, momento este onde estão mais sujeitas a ação de predadores. O período de incubação gira em torno de 60 dias. A alimentação é típica de um animal onívoro oportunista, ou seja, alimenta-se de frutos, raízes, sementes e folhas de plantas arbóreas e herbáceas, bem como de crustáceos, moluscos e pequenos peixes.

Durante séculos vêm ocorrendo a utilização dos quelônios como fonte de proteína na dieta de populações humanas que vivem em locais hostis e ambientes isolados em várias partes do mundo (PEZZUTI, 1998). Na Amazônia este cenário se repete, já que os quelônios constituem um recurso da fauna silvestre de grande importância para as populações que vivem às margens dos rios e dos lagos. No Estado do Acre a predação da tartaruga-da-amazônia se estende no curso geográfico do Rio Acre. Sua carne, excelente fonte de proteína, bem como os seus ovos, gordura e vísceras são de grande interesse às comunidades ribeirinhas (ALHO e PÁDUA, 1982). O hábito da caça de adultos e a coleta indiscriminada de ovos estão causando o desaparecimento da espécie (ANDRADE, 2007).

Mas a partir de 1967, a captura e comércio de animais silvestres foi oficialmente proibida, com a publicação da Lei nº 5.197. A partir desta data, ocorreu uma significativa redução na utilização destes recursos ou de seus subprodutos para consumo e inclusive para a venda. (ANDRADE, 2007). Após várias décadas de intensa exploração a *Podocnemis expansa* foi considerada pela União Internacional para Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) como ameaçada de extinção. Atualmente, devido aos programas de proteção implementados pelo governo federal e conduzidos sob as responsabilidades do Instituto Chico Mendes da Biodiversidade (ICMBIO) e do Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios (RAN), esta espécie não se encontra mais ameaçada, porém, ainda apresenta baixo risco de extinção, portanto, dependente de conservação pelos critérios da IUCN. Todas as espécies de *Podocnemis* estão listadas no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Fauna e da Flora Selvagens em Perigo de Extinção (CITES), que se encontra publicado como Anexo II na Instrução Normativa nº 11, de 17 de maio de 2005 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (MOURA, 2009).

A Lei nº 5.197, de 1967, além de proibir a captura e comércio de animais silvestres, prevê em seu artigo 6º, item b, a construção de criadouros destinados estes animais, para fins econômicos e industriais. Em 1973 foi sancionada a Portaria nº 1265P, onde foi autorizada a implantação de projetos de criadouros na Amazônia. Entretanto, a criação comercial é considerada ainda de alto custo e os criadouros existentes são insuficientes para atender o mercado. A demanda por filhotes para criação também ultrapassa a capacidade dos tabuleiros protegidos pelo IBAMA (ANDRADE, 2007).

No Estado do Acre existem seis criatórios comerciais autorizados pelo IBAMA. Um destes, localizado na Estância Terra, acomoda tartarugas desde meados dos anos oitentas, recebendo os animais tanto de apreensões realizadas pelo IBAMA como adquirindo-os através de criatórios menores ou da caça realizada pela população local, mantendo atualmente 150 mil exemplares de tartarugas, principalmente das espécies *P.expansa* e *P.unifilis*, em diversas faixas etárias. Apesar de ser licenciado como comercial, este criatório não participa de abate. O objetivo desta criação é manter as espécies e contribuir para a proteção das tartarugas, que se encontram em risco de extinção.

Apesar da existência dos programas de proteção e de repovoamento da *Podocnemis expansa* há uma carência sobre estudos populacionais desta espécie que avaliam sua situação na natureza, principalmente às margens dos rios, local onde ocorre a caça, que forneçam informações e estimativas de como deve ser feita a exploração deste recurso. Fatores como a

taxa de sobrevivência, recrutamento, tamanho e avaliação de estoques (grupos de animais com parâmetros populacionais constantes na área de distribuição) são de grande importância para a manutenção da espécie em seu local natural, mas insuficientes para a introdução de animais criados em cativeiros em áreas onde a espécie corre risco de extinção. O manejo da tartaruga-da-amazônia depende se a espécie constitui um ou vários estoques genéticos. No primeiro caso os animais podem ser reintroduzidos ou transferidos sem se questionar a origem dos mesmos. No segundo, isso não é recomendável, devido às características próprias de cada “unidade de manejo” (estoque) (TEIXEIRA et al, 2006). Assim, o entendimento da distribuição da variação genética dentro e entre populações se faz necessário para a conservação da espécie (SPRUELL et al, 2003) e portanto, para sua reintrodução nestas áreas.

Em 1996, Teixeira et al, avaliaram o locus gênico Tf (gene controlador de moléculas de transferrinas, útil para demonstrar o nível de polimorfismo em muitas espécies de vertebrados) em sete amostras populacionais de cinco áreas geográficas da região Amazônica, que mostraram existir um único estoque desta espécie na área estudada, sustentando a hipótese de fluxo livre de genes entre as populações investigadas.

Pearse et al, 2006, realizaram trabalhos com a *P. expansa* e demonstraram haver padrões consistentes de estrutura genética, limitados geograficamente em grandes bacias hidrográficas. Desta forma, é justificada a reintrodução desta espécie após a análise da variabilidade genética pelos genes mitocondriais, o que, além de promover o melhor conhecimento de vários aspectos da biologia de *P. expansa*, auxilia na elaboração de uma política adequada para a conservação e manejo da espécie. Assim, a criação de quelônios em criadouros licenciados poderá, de certa forma, amenizar a situação destes animais quanto à extinção (ANDRADE et al, 2006).

Em 2011, Rocha utilizou marcadores microssatélites na identificação genética da *P.expansa* na Bacia Hidrográfica Tocantins-Araguaia e não encontrou polimorfismo entre as populações dos locais pesquisados, sugerindo homogeneidade e inexistência de estrutura populacional nos animais amostrados. Neste caso, os resultados baseados nestes marcadores permitiram a adoção de medidas apenas de translocações ou de manejo dentro da bacia do Araguaia, para a espécie *P.expansa*. Para a translocação de animais entre outras bacias hidrográficas, foi necessária a realização de coletas mais abrangentes e a utilização de novos marcadores.

Desta forma, fica explícita a importância da avaliação da variação genética populacional de animais de criatório para a reintrodução da espécie em ambientes naturais,

que aliada ao monitoramento do manejo e de outros fatores ambientais, podem contribuir com o conservacionismo da tartaruga-da-amazônia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 SELEÇÃO DE AMOSTRAS

Para a realização deste estudo, com autorização do SISBIO n° 44760-1, foram coletadas amostras de sangue de animais de um criatório comercial para serem comparadas com animais que vivem em ambiente natural.

O criatório comercial está localizado na Rodovia AC 090 ou Transacreeana, quilômetro cinco, coordenadas geográficas S 10°00'24,64" e O 67°53'24,40", município de Rio Branco, que, de acordo com o último censo realizado pelo IBAMA, mantém atualmente 150 mil exemplares, em diversas faixas etárias, devidamente registrados. A área da fazenda destinada ao criatório comporta três tanques, com tamanhos variados que correspondem a aproximadamente 10 km² de lâmina d'água. Os animais são distribuídos nos tanques de forma aleatória, tendo separação apenas no berçário. Os tanques possuem área de alimentação feita em rampas de cimento e praias de areia para a reprodução. Os animais recebem ração para peixes e farinha de carne, duas vezes ao dia. O abastecimento de água e a drenagem ocorrem de forma natural, no período chuvoso.

No estudo dos animais do ambiente natural, foram utilizadas sequências de DNA de *Podocnemis expansa* coletadas no GeneBank (NCBI).

A captura dos animais do criatório foi realizada ao acaso, com malhadeira de 100 mm, puxada por dois barcos e por mergulho, que consiste em avistar o animal em local raso e apreendê-lo com as mãos. O local foi definido através da observação de onde os animais se concentram na superfície dos tanques ou dos rios para respirar, ou na nas praias, no momento da ovopostura.

Os animais receberam a classificação e composição amostral, foi feita a biometria (aferição massa corporal, comprimento e largura da carapaça e do plastrão, altura e abertura entre plastrão e carapaça na margem caudal, segundo Malvasio et al 2002) e cada indivíduo recebeu uma identificação externamente, através de uma pequena placa de alumínio numerada e fixada no casco, que facilitará a recaptura, se for necessário.

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA PARA AS ANÁLISES

As amostras de sangue foram mantidas em microtubos com etanol 95% até a extração de DNA, no Laboratório de Bioquímica Molecular da Universidade Federal do Amazonas

(UFAM). 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 Gel Red.

O DNA extraído foi depositado no banco de DNA do Laboratório de Bioquímica Molecular da UFAM.

3.3 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO DNA

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 do DNA mitocondrial e suas sequências de bases nucleotídicas podem ser visualizadas na Tabela 1.

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

Iniciadores	Sequência Nucleotídica	Referência
PRO	5' - CCCATCACCCACTCCCAAAGC - 3'	Pearse <i>et al.</i> , 2006
12SR5	5' - GTCAGGACCATGCCTTTGTG - 3'	T. 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 sequenciamento foram feitas em uma placa para um volume final de 12µL utilizando o kit de reação “*Big Dye*”. Em seguida, a placa contendo o DNA foi submetida a eletro-injeção e as sequências nucleotídicas foram determinadas pelo sequenciador automático ABI 3130XL (*Applied Biosystems*), seguindo instruções do fabricante.

A etapa de sequenciamento 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).

3.4 ANÁLISES POPULACIONAIS

As medidas estatísticas de genética populacional foram feitas através das análises da frequência e distribuição dos haplótipos utilizando o programa TCS (CLEMENT *et al.*,

2000). Este *software* agrupou as sequências 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 frequência gênica, entretanto a AMOVA considera o número de mutações entre os haplótipos.

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

As análises Evolucionárias foram realizadas no programa MEGA6 (TAMURA *et al.* 2013).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No programa Arlequin 2000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000) foram analisadas sequências de DNA de 53 indivíduos de *P. expansa* do criatório Fazenda Estância Terra os quais foram comparadas com sequências de indivíduos obtidas no banco de dados NCBI provenientes dos rios, Tapajós (6), Branco (4), Uatumã (6), Guaporé (pimenteiras)(6), Guaporé (6), Xingu (5), Araguaia (8), Amazonas (6), Purus (5) e Trombetas (6) (Tabela 2), compostas por 500 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*). Tanto as sequências obtidas no banco de dados e as obtidas dos indivíduos do criatório foram agrupadas em uma matriz de dados para serem submetidas às análises estatísticas.

Os resultados dos parâmetros genéticos evidenciam bons níveis de diversidade gênica para a maioria das amostras retiradas do NCBI utilizadas para as comparações com as amostras do criatório (Tabela 2). Tanto o número de haplótipos (21) quanto a diversidade gênica (0,8055) encontrados para os indivíduos do criatório são elevados se considerarmos este grupo como uma população. Para interpretar estes níveis elevados deve ser levado em consideração o fato de provavelmente esse grupo ser formado por indivíduos de diversas localidades.

As 109 sequências foram plotadas em uma matriz de dados que foi utilizada para estimar um cladograma intra-específico de haplótipos no programa TCS (CLEMENT *et al.*, 2000). Este *software* agrupa sequências de pares de bases que diferem entre si em passos mutacionais dentro de haplótipos e calcula a frequência desses haplótipos, estimando relações genealógicas entre eles, usando um algoritmo descrito por (TEMPLETON, CRANDALL e SING, 1992).

Tabela 2. Parâmetros genéticos para *Podocnemis expansa*

Populações de <i>P. expansa</i>	N	Nº de Haplótipos	Sítios Polimórficos	Diversidade Gênica	Diversidade Nucleotídica
Tapajós	6	3	3	0.7333 +/- 0.1552	0.002400 +/- 0.002040
Rio Branco	4	1	0	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000
Uatumã	6	3	2	0.6000 +/- 0.2152	0.001333 +/- 0.001355
Guaporé (Pimenteiras)	6	2	3	0.3333 +/- 0.2152	0.002000 +/- 0.001789
Guaporé	5	2	5	0.6000 +/- 0.1753	0.003600 +/- 0.002890
Xingu	5	1	0	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000
Araguaia	8	1	0	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000
Amazona (Terra Santa)	6	2	2	0.3333 +/- 0.2152	0.001333 +/- 0.001355
Purus	5	1	0	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000
Trombetas	6	3	6	0.6000 +/- 0.2152	0.002000 +/- 0.001789
Criatório	52	20	28	0.7979 +/- 0.0476	0.004855 +/- 0.002969
Total	110	41	56	-	-

No cladograma gerado no programa TCS (Figura 2) observa-se a predominância de um haplótipo mais ancestral (Tap86) que foi composto por 49 indivíduos, provenientes do rio Tapajós (3), Rio Branco (4), 4 indivíduo do rio Uatumã, 8 indivíduo do rio Guaporé, 5 indivíduo do rio Xingu, 5 indivíduo do rio Trombetas e 20 indivíduos do criadouro da Fazenda Terra, indicando que existe compartilhamento de haplótipos com todas as localidades com exceção do rio Araguaia. No agrupamento Tap 23, composto por 23 haplótipos, estão todas as amostras do Araguaia além de amostras do Tapajós, Terra Santa, Abufari, e Trombetas e apenas um indivíduo do criadouro Estância Terra. O agrupamento Gup33 contendo 14 haplótipos, é constituído por 3 amostras Guaporé e o restante do criatório. Este agrupamento indica a proximidade genética entre os indivíduos do criatório e Guaporé sugerindo que parte do plantel da Fazenda é proveniente do rio Guaporé.

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.

O total de 108 amostras, com 500 caracteres cada, foi considerado para as análises filogeográficas com o objetivo de visualizar agrupamentos entre as amostras do criatório e as amostras obtidas do banco de dados GenBank. A média da composição de bases para o DNAm_t foi de 27,4% para timina, 31,8% para citosina, 29,8% para adenina e 11% para guanina, esta baixa quantidade no percentual do nucleotídeo guanina é característica de genes mitocondriais.

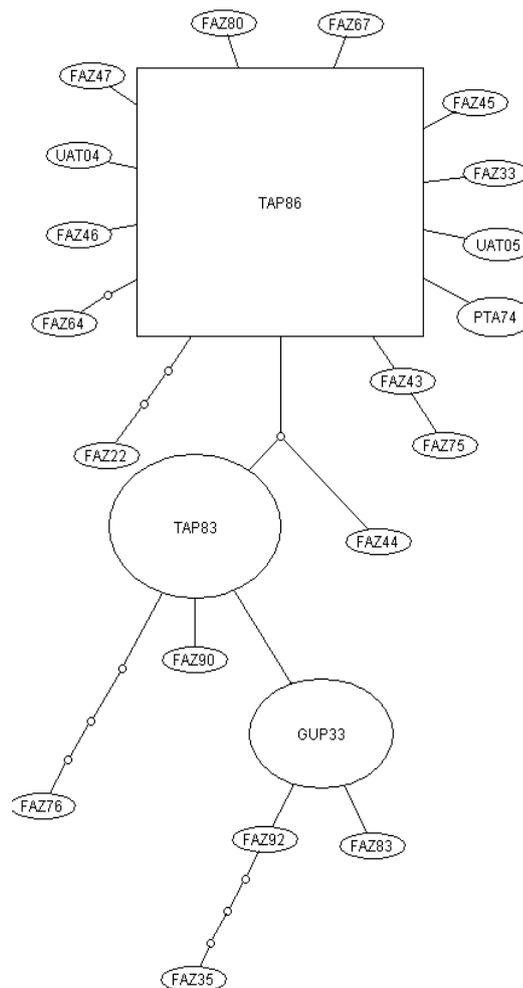


Figura 2. Árvore dos haplótipos das populações de *Podocnemis expansa*

A história evolutiva foi inferida usando o método de máxima parcimônia. A árvore de consenso inferida a partir de 10 árvores mais parcimoniosas é mostrado na Figura 3. Ramos correspondentes às partições reproduzidas em menos de 50% das árvores estão em colapso. O índice de consistência é 0.967742 (0.875000), o índice de retenção é 0.990476 (0.990476), e o índice composto é 0.958525 (0.866667) para todos os sites e sites informativos de parcimônia (entre parênteses). A árvore MP foi obtida utilizando o algoritmo Subtree-Poda-Regrafting (SPR) com pesquisa de nível 0 (NEY e KUMAR, 2000), em que as árvores iniciais foram obtidas por adição aleatória de seqüências (10 repetições).

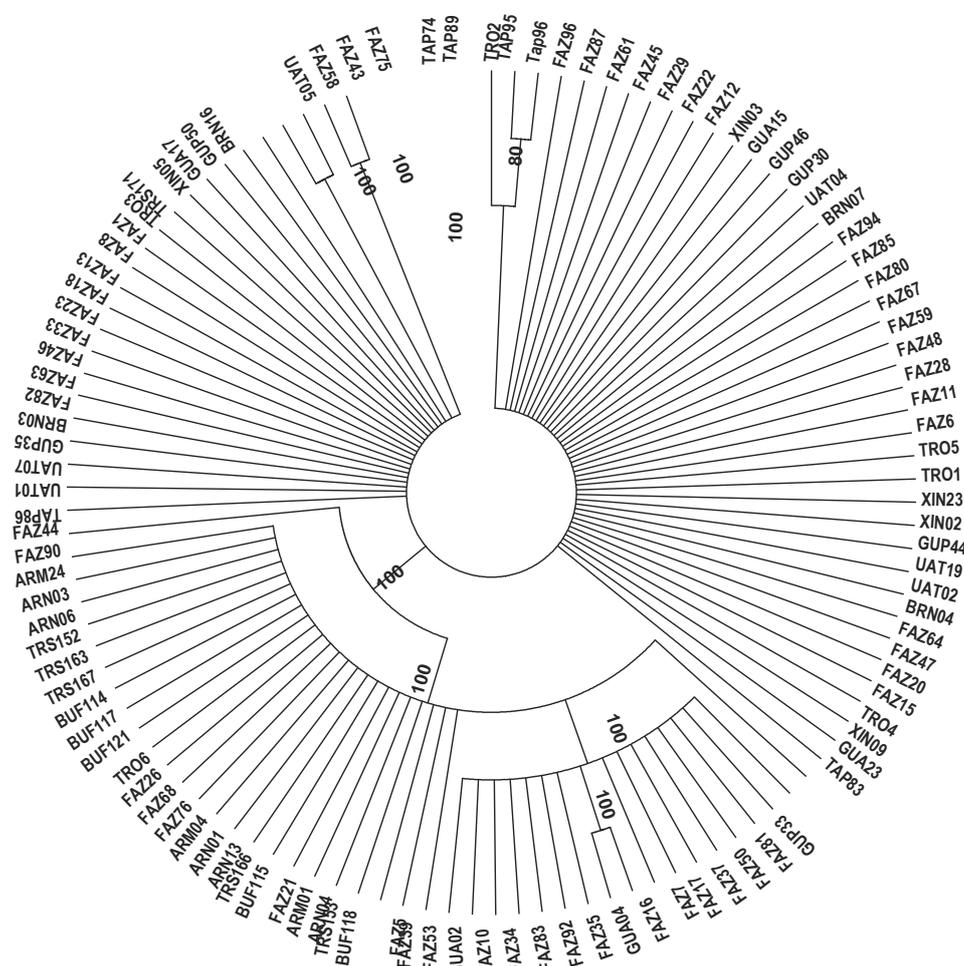


Figura 3. Árvore de consenso inferida a partir de 10 árvores mais parcimoniosas pela análise de Maxima Parsimonia no programa MEGA6.

A análise envolveu 109 seqüências de nucleotídios. Todas as posições que contêm lacunas e falta de dados foram eliminados. Foi utilizado um total de 500 posições

nucleotídicas no conjunto de dados final. As análises Evolutionarias foram realizadas no programa MEGA6 (TAMURA ET AL. 2013).

O agrupamento formado no cladograma obtido no programa TCS onde se observou um haplótipo restrito a indivíduos do Guaporé (3) e da Fazenda (11) também pode ser visualizado na árvore de Máxima Parcimônia produzida no Mega (Figura 3), confirmando a similaridade genética entre os indivíduos da fazenda e Guaporé.

5. CONCLUSÃO

Com os resultados deste estudo podemos inferir que as amostras de *P. expansa* coletadas no Criatório da Estância Terra apresentam uma alta variação genética, que pode estar associada à possibilidade de origens diferentes dos animais que compõem o plantel de tartarugas da Fazenda. Devido a não termos ainda analisado todos os dados, no momento podemos afirmar apenas a similaridade genética com a população do rio Guaporé.

Como ainda não temos dados suficientes para inferir a provável localidade de origem da maioria dos animais estudados, e como nossos resultados indicam a similaridade genética com diversas populações de tartarugas que foram usadas para as comparações não podemos indicar um local seguro para a soltura destes animais sem comprometer a sobrevivência destes na natureza e causar danos para as populações locais.

A intenção de repovoar o Rio acre utilizando estes animais ainda pode ser avaliada, mas, serão necessários mais estudos genéticos para descobrir quais animais tem mais capacidade de se adaptar as condições locais e que possuam maior similaridade genética para não interferir nas populações existentes. Além disso, é necessário fazer um estudo rigoroso das condições sanitárias e da saúde destes animais, que estão confinados há anos, para poder reintroduzi-los na natureza.

6. BIBLIOGRAFIA

ALFINITO, J. A preservação da tartaruga amazônica. *Brasil Florestal*, 6(21): 20-23. 1975.

ALHO, C.J.R.; PÁDUA, L.F.M. Reproductive parameters and nesting behavior of the Amazon turtle *Podocnemis expansa* (Testudinata, Pelomedusidae) in Brazil. *Canadian Journal of Zoology*, 60: 97-103. 1982.

ANDRADE, P.C.M., Pinto, J.R.S.;Lima, A.; Duarte, J.A.M.: Costa, P.M.;Oliveira, P.H.G.;Azevedo, S.H. 2006. Projeto Pé-de-pincha, Parceria de futuro para conservar quelônios na várzea amazônica. Coleção Iniciativas Promissoras. Vol. 1.

ANDRADE, P.C.M. Criação de Quelônios no Amazonas. Projeto de diagnóstico da Criação de Quelônios da Amazônia Ocidental. 2 Edição. ProVárzea/FAPEAM/SDS.Manaus/AM. 447p. 2007.

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

CORNALIA, E. Vertebratorum Synopsis . In: Museo MediolanensisExtantium: 1849. p. 301-315.

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

EVETT, I.W.; GILL, P.D.; LAMBERT, J.A.; OLDROYD, N.; FRAZIER, R.; WATSON, S.; PANCHALS, S.; CANNOLLY, A.; KIMPTON, C. Statistical analysis of data for three British ethnic groups from a new STR multiplex. *International Journal a Legal Medicine*, v.10, p. 5-9, 1997.

EXCOFFIER, L.G.L.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, v.1, p. 47-50, 2005.

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

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Projeto Quelônios da Amazônia - 10 anos. Ministério do Interior- IBAMA- Brasília. 1989.

KUMAR, S.; TAMURA K.; NEI, M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Bioinformatics*, v.10, n.2, p.189-191, 2004.

KUMAR, S.; J. DUDLEY; M. NEI & K. TAMURA. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 299-306. 2008.

MALVASIO, A., A. M. D. SOUZA, P. D. FERREIRA-JR, E. S. REIS e F. A. D. SAMPAIO. Temperatura de incubação dos ovos e granulometria dos sedimentos das covas relacionadas a determinação sexual em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e *P. unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae). *Publicações Avulsas do Instituto Pau-Brasil* 8-9:11-25. 2002.

MICHALAKIS, Y.; EXCOFFIER, L. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, v. 142, p. 1061-1064, 1996.

MITTERMEIER, R.A.; MEDEM, F.; RHODIN, A.G.J. Vernacular Names of South American Turtles. *Society for study of amphibians and reptiles. Herpetological Circular*, 9: 12. 1980.

MOURA, A. S. Proteínas plasmáticas na estimativa da variabilidade genético-populacional da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa* Schweigger, 1812). Dissertação (mestrado)--INPA, Manaus, 2009.

NEI, M. Genetic distance between populations. *American Nature*, v.106, p.283-292,1972.

PEARSE, D.E., ARNDT, A.D., VALENZUELA, N., MILLER, B.A., CANTARELLI, V., AND SITES, J.W., JR. Estimating population structure under non-equilibrium conditions in a

conservation context: continent- wide population genetics of the giant Amazon river turtle *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemidae). *Molecular Ecology* 15:985-1006. 2006.

PEZZUTI, J.C.B. Reprodução de iaçá, *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Pelomedusidae), na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas, concentração em Ecologia) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Universidade do Amazonas, Manaus. 66p.1998.

PRITCHARD, P. C. H. Side - neck turtles; Genus *Podocnemis*. In:Encyclopédia of turtles . Estados Unidos da América : T. F. H. , p.750-58. 1979.

PRITCHARD J.K; STEPHENS M.; DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v.155, p.945-959, 2000.

PRITCHARD, J.K.; WEN, W. Documentation for Structure Software, Version 2. Department of Human Genetics, University of Chicago, USA. 2003.

PRITCHARD, P.C.H.; TREBBAU, P.Turtles of Venezuela. Society for the study Amphibians and Reptiles. *Contributions to Herpetology*. 403pp. 1984.

SPRUELL, P.; HEMMINGSEN, A.R.; HOWELL, P.J.; KANDA, N.; ALLENDOLF, F.W. Conservation genetics of bull trout: Geographic distribution of variation at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, v.4, p.17-29, 2003.

TAMURA K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:30 2725-2729.

TEIXEIRA, A.S.; NAKAYAMA, C.M.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. Esterase-D and chromosome patterns in Central Amazon piranha (*Serrasalmus rhombus* Linnaeus, 1766) from Lake Catalão. *Genetics and Molecular Biology*, 29(3): 498-502. 2006.

TEIXEIRA, A.S.J. AMIESON,A. RAPOSO, J.C.P. VIEIRA, A.A. Transferrin polymorphism in Amazon turtles (*Podocnemis expansa*) stocks. *Braz.J.Genet.* p. 559-564.1996.

TEMPLETON, A. R., CRANDALL, K.A., Sing C. F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data: III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132, 619-633.

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

7. Cronograma de Atividades

Nº	Descrição	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
		2014					2015						
1	Extração de DNA das Amostras	R	R	R	R	R	R	R	R	R			
2	Quantificação do DNA e Ajuste das Alíquotas de Trabalho	R	R	R	R	R	R	R	R	R			
3	Amplificação do Material através de PCR						R	R	R				
4	Purificação							R	R	R			
5	Sequenciamento							R	R	R	R		
6	Análise dos Dados									R	R	R	R
7	Levantamento Bibliográfico	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
8	Elaboração do Resumo e Relatório Final										R	R	R
9	Preparação da Apresentação Final para o Congresso												P

R: Realizado

P: Previsto