

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

**ANÁLISE GENÉTICO-POPULACIONAL DE *PODOCNEMIS*
SEXTUBERCULATA (TESTUDINES, *PODOCNEMIDIDAE*, *CORNALIA*
1849) NA CALHA DO RIO JURUÁ, UTILIZANDO A REGIÃO
CONTROLE DO DNA MITOCONDRIAL (*D - LOOP*).**

Bolsista: Marcos do Prado Sotero

Manaus
2009

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/013/2008

**ANÁLISE GENÉTICO-POPULACIONAL DE *PODOCNEMIS*
SEXTUBERCULATA (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE, CORNALIA
1849) NA CALHA DO RIO JURUÁ, UTILIZANDO A REGIÃO
CONTROLE DO DNA MITOCONDRIAL (*D - LOOP*).**

Bolsista: Marcos do Prado Sotero
Orientadora: Profa. Dra. Maria das Neves Silva Viana

Manaus
2009

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

RELATÓRIO PARCIAL
PIB-B/013/2008

Bolsista: Marcos do Prado Sotero

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Neves Silva Viana

Manaus
2009

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Exemplar de <i>P. sextuberculata</i>	10
Figura 02. A - ex. jovem de <i>P. sextuberculata</i> , B - plastrão com tubérculos.....	11
Figura 03. Mapa de distribuição de <i>P. sextuberculata</i>	12
Figura 04. Gel de quantificação de DNA de <i>P. sextuberculata</i>	19
Figura 05. Gel de produto de PCR do DNA de <i>P. sextuberculata</i>	19
Figura 06. Árvore dos haplótipos das populações de <i>P. sextuberculata</i>	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Parâmetros genéticos para <i>Podocnemis sextuberculata</i>	23
Tabela 02. Lista dos valores Nm (acima) e F_{ST} (abaixo) entre as populações de <i>P. sextuberculata</i>	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Família Podocnemididae.....	9
1.2. Gênero Podocnemis	9
1.3. Podocnemis Sextuberculata	10
1.4. Calha do Rio Juruá	12
1.5 Genéticas de populações	13
1.6. Marcadores Moleculares	14
1.7. DNA Mitocondrial e Região controle (Dloop)	14
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Coleta do material	16
3.2. Extração de DNA	16
3.3. Amplificação <i>in vitro</i> via PCR.....	16
3.3.1. Purificação do Material	17
3.3.2. Seqüenciamento	17
4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS-POPULACIONAIS.....	17
4.1. Análises da frequência e distribuição dos haplótipos	17
4.2 Análises de Polimorfismo genéticos	18

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÃO	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	31

1. INTRODUÇÃO

Os répteis são animais que se adaptaram facilmente e têm evoluído para ocupar uma variedade de habitats, são encontrados em quase todos os continentes, exceto na Antártica. A maioria dos países tem pelo menos uma espécie de réptil terrestre. Os répteis estão em qualquer lugar, dos desertos secos e quentes às úmidas florestas tropicais. Eles são especialmente comuns em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Austrália e Américas, onde temperaturas mais altas e a caça diversa lhes permitem desenvolver-se.

A fauna de tartarugas na América do Sul é bastante variada, aproximadamente 20% das espécies de tartarugas do mundo estão na América do Sul (PRITCHARD, 1975). Os quelônios são classificados em duas subordens de acordo com a maneira que recolhem a cabeça para dentro do casco. Os Cryptodira (*crypto* = escondido, *dire* = pescoço) retraem a cabeça curvando o pescoço na forma de um S vertical, enquanto os Pleurodira (*pleuro* = lado) retraem a cabeça curvando o pescoço horizontalmente (POUGH *et al.*, 2003). Divididos nestas duas subordens existem quatorze famílias, e a América do Sul possui uma rica fauna de quelônios, onde podemos encontrar representantes de nove destas famílias (RUEDA – ALMONACID *et al.*, 2007).

Atualmente, após uma revisão da classificação do gênero *Podocnemis* por (RHODIN *et al.*, 1978), na família Pelomedusidae ficaram apenas as tartarugas africanas *Pelusios* e *Pelomedusas* e a família Podocnemididae agrupa os gêneros *Podocnemis* e *Peltocephalus* (que ocorrem na América do Sul) e *Erymnochelis* (que ocorre apenas em Madagascar).

1.1. Família Podocnemididae

A família Podocnemididae agrupa os gêneros *Podocnemis* e *Peltocephalus* e *Erymnochelis*. Abrange um grupo de tartarugas dulcícolas distribuídas na América do Sul e na Ilha de Madagascar, que se caracterizam por retrair a cabeça lateralmente para dentro do casco (subordem Pleurodira), por não apresentarem escudo nugal e terem o dorso da cabeça coberto por escamas grandes e justapostas. Seus representantes estão perfeitamente adaptados à vida aquática por possuírem carapaças relativamente aplanadas e termodinâmicas, olhos e narinas dispostos dorsalmente sobre o crânio e membros totalmente palmeados (RUEDA – ALMONACID *et al.*, 2007).

O gênero *Erymnochelis* está representado por apenas uma espécie vivente, *e. madagascariensis* (GRANDIDIER, 1867), restrita a Ilha de Madagascar (PRITCHARD & TREBBAU, 1984). O gênero *Peltocephalus*, grupo-irmão de *Podocnemis*, é monoespecífico, estando *P. dumerilianus* (SCHWEIGGER, 1812) distribuída pelo leste da Colômbia, sudoeste da Venezuela e noroeste do Brasil (PRITCHARD & TREBBAU, 1984). O gênero *podocnemis*, distribui-se pela região setentrional cisandina da América do Sul, sendo o mais representativo dentro da família, com seis espécies viventes: *P. erythrocephala* (SPIX, 1824), *P. expansa* (SCHWEIGGER, 1812), *P. lewyana* (A. DUMÉRIL, 1852), *P. sextuberculata* (CORNALIA, 1849), *P. unifilis* (TROSCHER, 1848) e *P. vogli* (L. MULLER, 1935) (MITTERMEIER & WILSON, 1974; PRITCHARD & TREBBAU, 1984).

1.2. O Gênero Podocnemis

Podocnemis ocorre tipicamente na América do Sul e no Brasil é representado por quatro espécies: *P. expansa*, *P. unifilis*, *P. sextuberculata* e *P. erythrocephala*. Os indivíduos adultos, destas quatro espécies, principalmente na Amazônia, tanto são utilizados como fonte de alimento, pelas populações ribeirinhas, como possuem alto valor comercial no mercado ilegal,

para consumo da carne e ovos, por isso vem sendo exploradas em grande escala na região sendo comercializadas nos grandes centros urbanos.

Segundo uma pesquisa realizada sobre o consumo de quelônios na Amazônia, o gosto do amazonense pela carne e ovos de quelônios é generalizado, em todas as amostras houve registro de consumo, mesmo que esporádico. São pratos apreciados e tradicionais na culinária local, mas há grandes diferenças na frequência com que os entrevistados comem quelônios por ano (REBÊLO & PEZZUTI, 2000).

Conseqüentemente algumas espécies do gênero estão classificadas como vulneráveis e dependentes de cuidados no apêndice II do CITES (Convention on International Trade in Endangered Species). Em adição aos dados ecológicos existentes, são necessárias informações sobre estrutura populacional e variabilidade genética para dar suporte a programas de manejo adequados para conservação de cada uma destas espécies.

1.3. *Podocnemis sextuberculata*

P. sextuberculata (Figura 1 e 2) é popularmente conhecida como iaçá, pitíu ou cambéua (SMITH, 1979), distribui - se pelos rios de água barrenta da bacia amazônica como Solimões, Japurá e Branco; e em rios de água clara como Trombetas e Tapajós. A fêmea possui manchas amarelas com dois barbelos embaixo da boca. A carapaça tem coloração marrom-clara a marrom-escuro. Nos indivíduos jovens o plastrão apresenta seis pontas (tubérculos) salientes de cor cinza ou marrom, o que lhe confere o nome a espécie (Figura 2B).

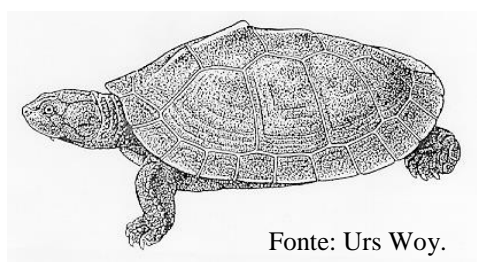


Figura 1. Exemplo de *P. sextuberculata*.

Os indivíduos juvenis são facilmente reconhecidos por apresentarem seis tubérculos proeminentes no plastrão, os quais conferem o nome à espécie (IBAMA, 1989); bem como, manchas claras sobre a escama inter parietal e pequenas manchas brancas ou amarelo pálido no focinho, região pós orbital e margem superior do tímpano (RUEDA – ALMONACID *et al.*, 2007).

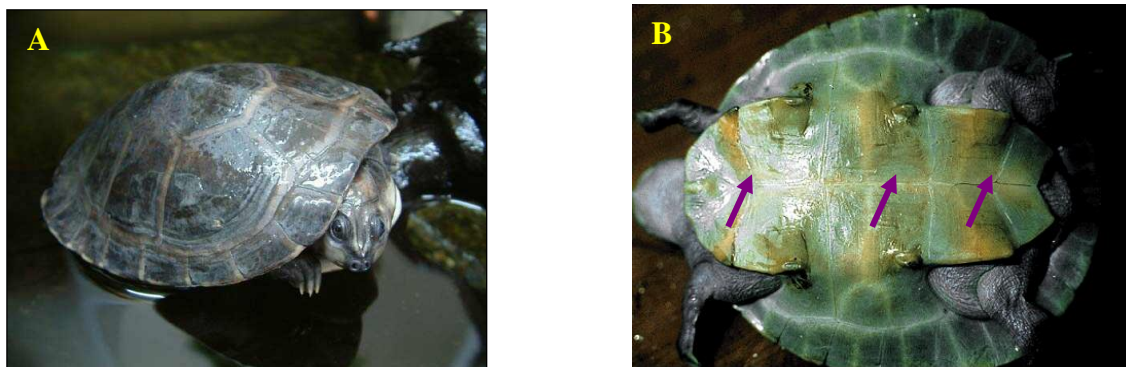
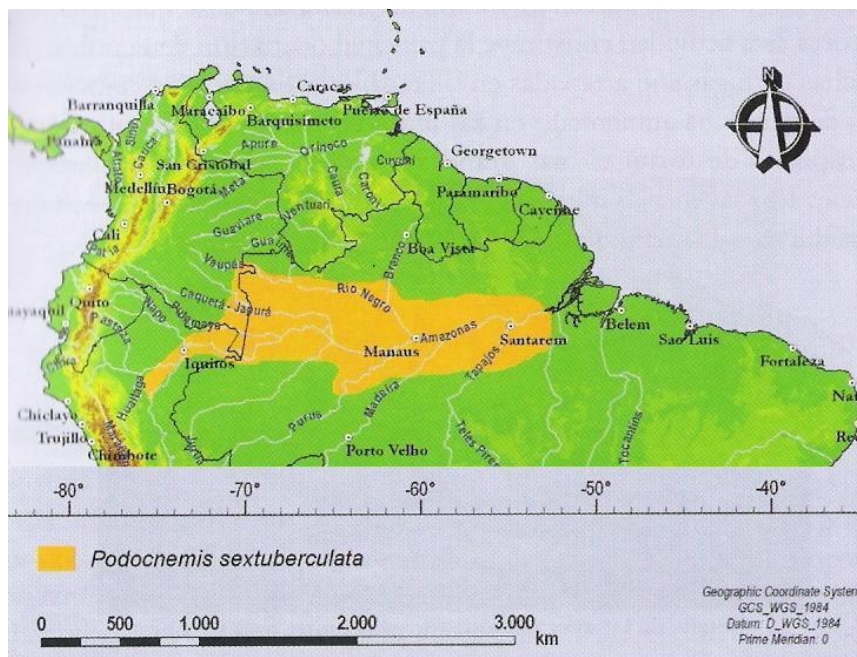


Figura 2. A - Exemplar jovem de *P. sextuberculata*. B - Plastrão exibindo os tubérculos.

As fêmeas são maiores que os machos, e selecionam praias arenosas para ovipostura. A postura média é de 16 ovos, com uma oscilação entre 6 a 25; o período médio de incubação é de 64 dias, e a variação se dá em função da temperatura de incubação dos ovos, quanto maior a temperatura mais rápida a eclosão (PEZZUTI & VOGT, 1999). Os ovos são relativamente grandes, elípticos, com casca dura e flexível (RUEDA – ALMONACID *et al.*, 2007).

A iaçá distribui-se geograficamente na drenagem do rio Amazonas no Brasil, Peru e Colômbia (IVERSON, 1992; ERNST & BARBOUR, 1989) (Figura 2). No Brasil pode ser encontrada em rios de água barrenta, como Solimões, Japurá e Branco; e em rios de água clara, como Trombetas e Tapajós (IBAMA, 1989).



Fonte: Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico. Serie de guías tropicales de campo n° 6.

Figura 3. Mapa de distribuição de *P. sextuberculata*.

1.4. Calha do Rio Juruá

No médio Juruá, em Carauari, os tabuleiros de tartarugas da RESEX são remanescentes das áreas protegidas pelos antigos donos de seringais. São ao todo 10 áreas: Jacaré (seringal Pupunha, comunidade Nova Esperança), Deus é Pai, Manariã, Ati (comunidade do Roque), Gumo do Facão, Bauana, Bom Jesus, Monte Carmelo (comunidade do Pau-furado), Itanga, Mandioca. Como resultado deste manejo comunitário, entre 1995 e 2005, foram devolvidos à natureza cerca de 1.948.009 filhotes de quelônios (ANDRADE et al. 2005).

O rio Juruá tem cerca de 3.350 km de extensão (fóz-nascente) (MINISTÉRIOS DOS TRANSPORTES, 2009) banha os estados brasileiros do Acre e Amazonas, nasce no Peru, atravessando o Acre até desaguar no rio Solimões. A pesca e captura de quelônios nos tabuleiros existentes é de grande importância para a região, pois para população ribeirinha é uma alternativa de renda e alimento, contribuindo negativamente para a preservação da espécie.

Sua presença ao longo do curso dos rios comprova que a espécie possui um hábito migratório extenso, onde já se catalogou um deslocamento de mais de 100 km. Devido à grande capacidade de migração, faz-se necessário o estudo da espécie em nível de variação genética que irão auxiliar nas práticas de manejo adequadas e conservação desta espécie.

1.5. Genética de populações

A ciência da genética de populações iniciou-se em 1908 com G. Hardy e W. Weinberg. Estes pesquisadores provaram independentemente o “teorema de Hardy-Weinberg”, o qual postula que a reprodução sexual não causa uma redução na variação genética em cada geração. Pelo contrário, a quantidade da variação permanece constante geração após geração, na ausência de outras formas perturbadoras. Este equilíbrio é a consequência direta da segregação de alelos na meiose dos heterozigotos (GRIFFITHS *et al.*, 2006). Segundo (FUTUYMA, 2002), a única mudança na composição genética da população é a redistribuição dos genótipos em frequências que serão mantidas em todas as gerações subsequentes.

A genética de populações estabelece relações entre os processos de hereditariedade individual e o desenvolvimento da constituição genética das populações, que se define como o conjunto das frequências de genótipos diferentes na população; assim como, mudanças temporal e espacial nesta constituição. Estudos genético-populacionais produzem descrições dos padrões reais de variação genética entre indivíduos nas populações, e avaliam as taxas dos processos de reprodução, mutação, recombinação, seleção natural e variação aleatória nas taxas reprodutivas, os quais atuam ao nível de organismos individuais, aumentando ou reduzindo a variabilidade genética (GRIFFITHS *et al.*, 2006).

A variabilidade genética, diversidade de alelos ou haplótipos nos diversos locos de uma espécie nos permite investigar as afinidades e os limites entre as espécies, detectar modos

reprodutivos e estrutura familiar, estimar níveis de migração e dispersão nas populações (AVISE, 1994); além de ser importante para a evolução, pois a seleção natural atua entre as variantes que ocorrem dentro das populações em função da adaptação ao ambiente.

Atualmente diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética ao nível de seqüência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo genoma do organismo.

1.6. Marcadores moleculares

A variabilidade genética é o princípio básico para estudos genéticos e de melhoramento, permitindo selecionar e estudar a herança de caracteres. Marcadores moleculares são utilizados na definição de populações viáveis, na caracterização de populações locais ou raças, na identificação da estrutura populacional bem como na definição de espécies e subespécies (BOWEN *et al.*, 1991)

Sabe-se que, até meados da década de 60, a variabilidade genética era observada somente para genes de caracteres morfológicos, geralmente de fácil identificação visual, o que limitava o número de marcadores a serem utilizados. Na última década, o uso de classes de marcadores moleculares com o objetivo de estimar o fluxo gênico e do grau de diferenciação populacional tem sido difundido principalmente por técnicas que permitem a análise de múltiplos loci gênicos e muitos alelos por loco (AVISE, 1994; FERRARIS & PALUMBI, 1996; HILLIS *et al.*, 1996).

1.7. DNA Mitocondrial e Região controle (Dloop)

A mitocôndria é uma organela encontrada na maioria dos eucariontes. Possui 13 genes codificadores de proteína que são 90% do genoma, 22 RNAs de transferência (tRNAs), 2 RNAs

ribossômicos e uma região não codificadora chamada região controle ou alça D (*d-loop*) (AVISE *et al.*, 1986).

A região controle, região não codificadora do genoma mitocondrial, localiza - se entre as regiões codificadora do tRNA da prolina e do 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 da fita leve e pesada. Possui uma taxa de evolução de duas a cinco vezes maior que a dos genes mitocondriais codificadores de proteína, além de possuir uma maior variabilidade de substituição de bases que outras regiões do DNA mitocondrial e do DNA nuclear, por esse motivo tem sido muito usada nos estudos populacionais.

2. OBJETIVOS

2.1 objetivo Geral

Caracterizar a variabilidade genética de populações naturais de *Podocnemis sextuberculata* provenientes da calha do rio Juruá, utilizando a Região Controle do DNA mitocondrial, visando dar suporte para o planejamento de programas de manejo e conservação destes animais na natureza e oferecer suporte à criação em cativeiro.

2.2 Objetivos específicos

- Estimar os níveis de variabilidade genética de cinco populações de *P. sextuberculata*;
- Determinar o padrão de distribuição geográfica dos haplótipos do DNA mitocondrial e inferir se há eventos históricos envolvidos nesta distribuição.
- Verificar a ocorrência de populações geneticamente estruturadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Foram coletadas um total de 43 amostras em quatro regiões na calha do rio Juruá. As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia femural utilizando seringa de 1mL, coletando-se em torno de 50µl de sangue que em seguida foram armazenados em microtubos *eppendorfs* contendo 500 µl de etanol absoluto.

3.2. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada através do método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987), com algumas modificações. Verificou-se a eficiência da extração e a concentração das amostras de DNA utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.3. Amplificação *in vitro* via PCR

As reações de amplificação foram realizadas via PCR em eppendorf de 0,2 mL. O volume foi ajustado para 15 µL de reação com água deionizada autoclavada. O programa de amplificação tem os seguintes perfis de temperatura: 92°C por um minuto para a desnaturação (dissociação) das fitas complementares do DNA; seguidos por 35 ciclos de 92°C (1 minuto), 55 °C (35 segundos), 72°C (1minuto e meio); e uma extensão final à 72°C por 5 minutos para a extensão dos segmentos amplificados de DNA.

Após a reação, a eficiência da amplificação foi verificada através da aplicação de 3 µL do produto amplificado de cada reação em gel de agarose 1,0 %, e 1µL do marcador molecular Ladder 1 Kb, por cerca de 1 hora e 40 minutos com corrente de 70 mA. Por comparação com o marcador, foi determinado o tamanho do fragmento amplificado.

3.3.1 Purificação do material

A purificação foi realizada com o Kit Exo SAP, que 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, utilizando-se 3 μL do mix em cada amostra. Este DNA purificado foi utilizado na reação de seqüenciamento.

3.3.2 Sequenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada no termociclador com o volume final 10 μL com os seguintes componentes: 2 μL do *primer forward* (F), utilizados anteriormente na amplificação do fragmento; 4 μL da solução do Kit de reação Dyenamic™ ET Dye Terminator; 4 μL de DNA purificado (entre 30 –100 ng/ 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 a 50 °C, para o anelamento dos *primers* e 1 minuto a 60 °C para a extensão da região a ser seqüenciada.

Após o término da reação de seqüenciamento, o produto foi precipitado com EToh/EDTA precipitation_Cycle sequencing. Deixou-se secar em temperatura ambiente e depois de seco ressuspendeu-se o material 10 μL de *Loading buffer* (presente no kit de seqüenciamento). Após a precipitação o material foi seqüenciado.

4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS – POPULACIONAIS

4.1 Análises da frequência e distribuição dos haplótipos

As análises das frequências e distribuição dos haplótipos foi realizada utilizando o programa TCS (CLEMENT *et al.*, 2000). Este *software* agrupa seqüências de pares de bases que

diferem entre si, em passos mutacionais, dentro de haplótipos, ele também calcula a frequência desses haplótipos em uma matriz, e estima relações genealógicas entre eles, usando um algoritmo descrito por (TEMPLETON, CRANDALL E SING 1992).

4.2 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) 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. 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, estes testes são muito utilizados em análise 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 2000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA de todas as amostras foi extraído pelo método CTAB e quantificado por meio de eletroforese em gel de agarose (Figura 4).

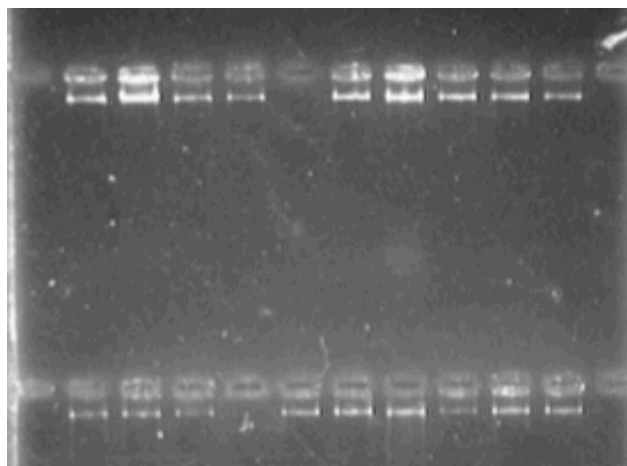


Figura 4. Gel de quantificação de DNA de *P.sextuberculata*.

As reações de amplificação do DNA por PCR foram realizadas com os iniciadores DLSex e 12SR5, para todos os indivíduos e todas as localidades.

Após a amplificação, os produtos das PCRs foram visualizados em gel de agarose para checar a eficiência da amplificação (figura 5), e posteriormente foram purificados pelo método Exo SAP para em seguida realizar-se a reação de sequenciamento.

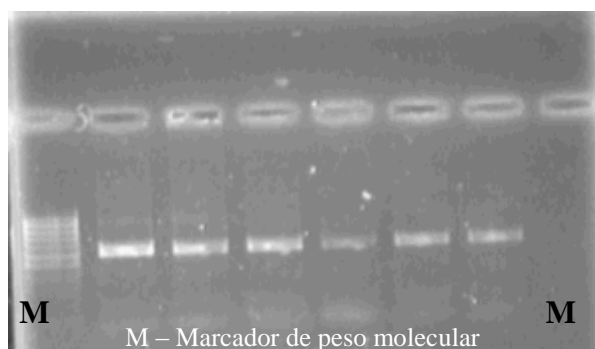


Figura 5. Gel de produto de PCR de *P.sextuberculata*.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o Kit de reação Dyenamic™ ET Dye Terminator, e posteriormente a precipitação da reação de sequenciamento utilizando o método EToh/EDTA precipitation_Cycle sequencing. Em seguida analisadas pelo ABI, 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.

As análises de populações foram realizadas com 43 indivíduos de *P. sextuberculata* utilizando-se seqüências nucleotídicas com um total de 605 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*) gerando uma matriz de dados utilizada para estimar cladogramas intra-específicos de haplótipos. Para isto, utilizou-se o programa TCS (CLEMENT *et al.*, 2000), um *software* que agrupa seqüências de pares de bases que diferem entre si em passos mutacionais dentro de haplótipos e calcula a freqüência desses haplótipos na matriz, estimando relações genealógicas entre eles, usando um algoritmo descrito por (TEMPLETON, CRANDALL E SING , 1992).

As 43 amostras seqüenciadas foram submetidas ao programa TCS, gerando um cladograma intraespecífico com 14 haplótipos (Figura 6). Observa-se a predominância de um haplótipo comum (Sex2JuBf) 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.

Os resultados dos parâmetros genéticos evidenciam bons níveis de diversidade gênica, para as populações estudadas com exceção da população de Roque onde se observou baixo nível de diversidade gênica e Nova Esperança que apresentou nível intermediário (Tabela 1). Estas análises comparam dois indivíduos da mesma população analisando suas diferenças.

O número de haplótipos diferentes foi maior para Botafogo o que pode ser percebido quando se compara com os valores de diversidade gênica indicando um alto nível de sítios polimórficos comparados as outras localidades (Tabela 1).

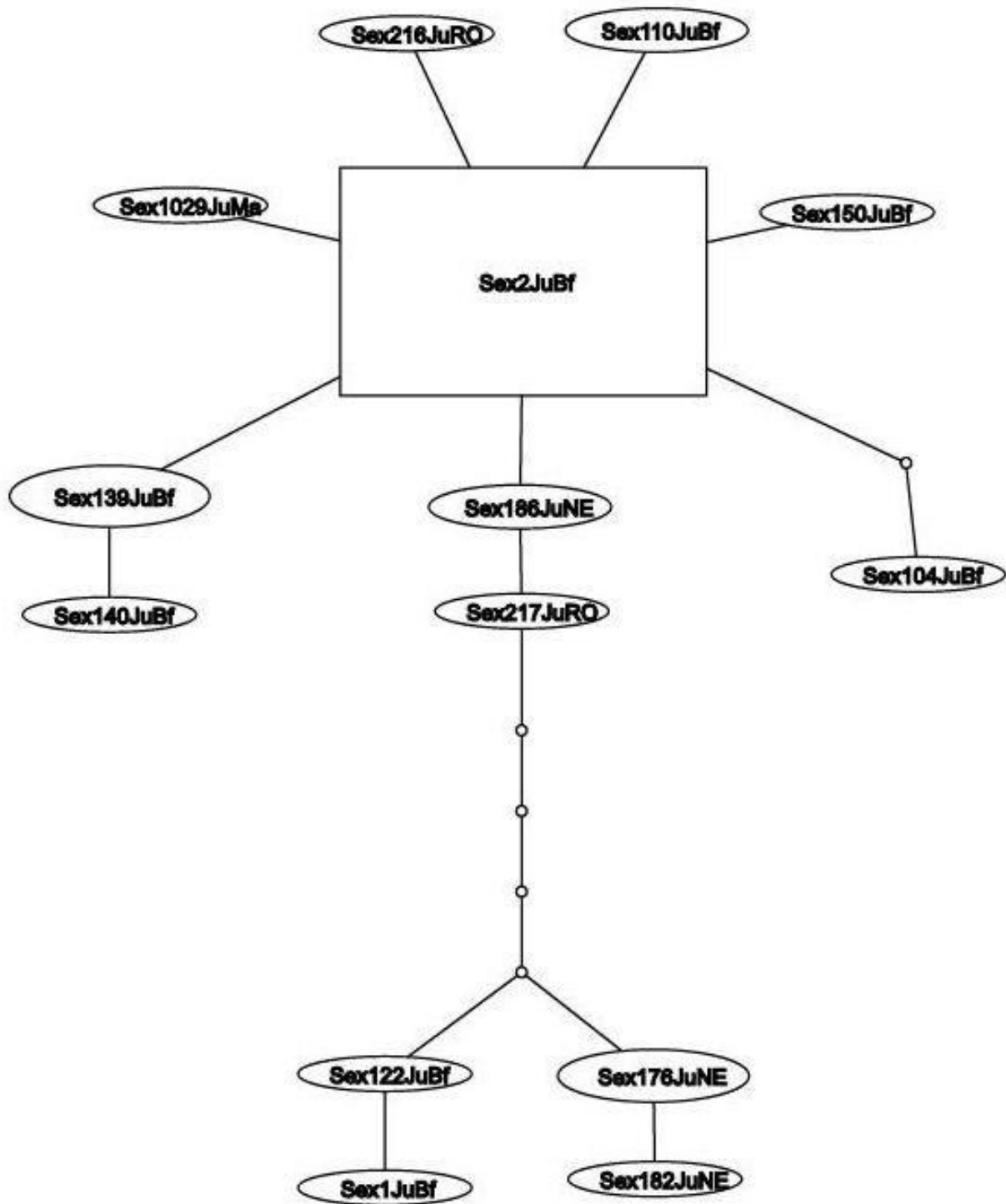


Figura 6. Árvore dos haplótipos das populações de *Podocnemis sextuberculata*.

Tabela 1. Parâmetros genéticos para *Podocnemis sextuberculata*.

Populações	N	Número de Haplótipos	Diversidade Gênica	Diversidade Nucleotídica (por sitio)	Teste D de Tajima	Teste F_s de Fu
Botafogo	12	8	0.9091±0.0649	0.005810±0.003580	-0.48474	-2.06350
Nova Esperança	12	5	0.6667±0.1409	0.005409±0.003370	0.39834	0.99237
Roque	12	4	0.4545±0.1701	0.001052±0.000990	-1.17901	-1.5898*
Manaria	7	4	0.7143±0.1809	0.004250±0.002960	-1.59446*	0.35446

Nota: N = número de indivíduos; (*) nível de significância $P < 0.05$.

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 Fu 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 resultantes dos testes de neutralidade seletiva de mutações indicam que algumas localidades não estão em equilíbrio genético com relação aos haplótipos do DNA mitocondrial. O Teste D de Tajima foi significativo ($P < 0,05$) para a localidade de Manariã. Enquanto que F_s de Fu mostrou desvio significativo da expectativa neutra das mutações para a

população de Roque (Tabela 1). 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. Valores negativos e significativos como os encontrados neste estudo representam um padrão freqüentemente observado em populações onde há um excesso de mutações recentes e são interpretados como evidencia de crescimento populacional e/ou seleção (Tajima, 1989; Fu, 1997)

Análises de variância molecular (AMOVA), e análises de expansão populacional e polimorfismo do DNA foram realizados com o auxílio do programa Arlequin (SCHNEIDER *et al.*, 2001). Os resultados revelaram uma alta taxa de diversidade genética para todas as amostras populacionais. A maior variação genética foi verificada dentro das populações (98,73 %).

Os valores obtidos das comparações múltiplas entre os pares de populações através do índice Φ_{ST} foram utilizados estimar o fluxo gênico das fêmeas. Os resultados foram usados para fazer uma estimativa do número efetivo de fêmeas migrantes de iaçá por geração entre as localidades estudadas (Tabela 2)

Tabela 2. Lista dos valores Nm (acima da diagonal) e F_{ST} (abaixo da diagonal) entre as populações de *Podocnemis sextuberculata*.

Populações	Botafogo	Nova Esperança	Roque	Manariã
Botafogo	-	∞	5,95652	∞
Nova Esperança	0	-	4,32402	∞
Roque	0.08394	0.11563	-	140,29787
Manariã	0	0	0.00356	-

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 são indicativos de que a divergência genética está sendo refreada (HARTL & CLARK, 1989).

Os valores do F_{ST} para todas as comparações de populações não foram significantes indicando não haver populações estruturadas. Os altos valores de Nm corroboram com os dados de F_{ST} pois são parâmetros inversamente proporcionais (Tabela 2). Este resultado indica que não existe estrutura genética entre as populações e que o número de migrantes estabelece um elevado fluxo gênico entre as amostras populacionais estudadas do rio Juruá.

Esses altos índices de número de migrantes evidenciando um intenso fluxo gênico podem estar associados ao fato dessas localidades estarem na calha de um mesmo rio, facilitando assim o deslocamento desses animais entre as populações existentes, afirmando que a maior distância aproximada de 644,94 Km de uma localidade a outra mais extrema, não está servindo de barreira para o fluxo gênico.

6. CONCLUSÃO

A utilização da região controle do DNA mitocondrial (*D – loop*), mostrou-se eficiente nos estudos com as populações da *P. sextuberculata*.

Não foi evidenciada diferenciação genética significativa entre as populações analisadas (Botafogo, Nova Esperança Roque e Manariã), o que sugere que podem ser consideradas uma única e grande população panmítica. Este estudo pode servir como referência para futuros projetos de manejos com a *P. sextuberculata*. 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 da calha do Juruá, 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.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, P.C.M., Pinto, J.R.S.;Lima, A.; Duarte, J.A.M.: Costa, P.M.;Oliveira, P.H.G.;Azevedo, S.H. 2005. Projeto Pé-de-pincha, Parceria de futuro para conservar quelônios na várzea amazônica. Coleção Iniciativas Promissoras. Vol. 1. IBAMA/Provárzea. 27 p.

Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman e Hall, Inc., USA. 511 p.

Avise, J. C.; Helfman, G. S.; Saunders, N. C.; Stanton, L. H. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population Genetic consequence of an unusual History Pattern. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, (83):4350-4354.

Bowen, B. W.; Meylan, A.B. and Avise, J.C. 1991. Evolutionary distinctiveness of the endangered Kemp's Ridley sea turtle. **Nature** 352:709-711.

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

Disponível em <http://www.transportes.gov.br/bit/hidro/griojuru.htm>, Acesso em 13/07/2009 às 10:00h.

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

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

Ernest, C. H. e Barbour, R. W. 1989. Turtles of the World. Smithsonian Institution Press. Washington, D. C. 313 p.

Excoffier L, Smouse Pe, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491.

Ferraris, J. D., & Palumbi, S. R. (Eds.). 1996. *Molecular Zoology. Advances, Strategies, and Protocols*. Wiley-Liss, New York. In: Sites, J. W.; Fitzsimmons, N. N., Silva; N. J. & Cantarelli, V. H. 1999. Conservation Genetics of the Giant Amazon River Turtle (*Podocnemis expansa*; Pelomedusidae) – Inferences From Two Classes of Molecular Markers. *Chelonian Conservation and Biology* 3 (3):454-463.

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

Futuyma, D. J. *Biologia Evolutiva*. 2ª edição. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2002.

Griffiths, A. J. F.; Wessler, S. R.; Lewontin, R. C.; Gelbart, W. M.; Suzuki, D. T. & Miller, J. H. *Introdução a genética*. 8ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

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

HARTL D.L.; CLARK A.G. 1989. *Principles of Population Genetics*, second edition, *Sinauer Associates Inc*, Sunderland MA, 481 pp.

Hillis, D.M.; Mable, B.K.; Larson, A.; Davis, S.K.; Zimmer, E.A., 1996. Nucleic acids. IV. Sequencing and cloning. In: Hillis, D.M.; Mable, B.K.; Moritz, C. (eds) *Molecular Systematics*. 2nd ed. Sinauer Associates. Sunderland. Massachusetts. Pp 321-384.

IBAMA, 1989. Projeto Quelônios da Amazônia – 10 anos. Brasília. 119p.

- Iverson, A. 1992. A revised checklist with distribution maps of turtle of the world. Privately printed. Paust printing, Richmond, Indiana. 363p.
- Kimura, M. 1969. The number of heterozygous nucleotides sites maintained in a finite population due to the steady flux of mutations. *Genetics*, 61: 893-903.
- Mittermeier, R. A. e Wilson, R. A. 1974. Redescription of *Podocnemis erythrocephala* (Spix, 1824), an Amazonian Pelomedusid turtle. – *Pap. av. Zool.* 28: 147-162
- Pezzuti, J.C.P. & Vogt, R.C.1999. Nest site selection and causes of mortality of *Podocnemis sextuberculata*, Amazonas, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology*, v.3, n. 3, p. 419-424.
- Pough, F.H.; Janis, C.M.; Heiser, J.B. *A Vida dos Vertebrados*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.
- Pritchard, P. C. H. e Trebbau, P. 1984. Turtles of Venezuela. *Soc. Stud. Amphib. Rept.* Pp. 33-43.
- Pritchard, P. C. H. 1975. Distribution of tortoises in tropical South America. *chelonian*. San Francisco, 2 (1): 3-10.
- Rebêlo, G. H. ; Pezzuti, J. C. B. . Percepções sobre o consumo de quelônios na Amazônia, sustentabilidade e alternativas ao manejo atual. *Ambiente e Sociedade*, Campinas-SP, v. 6/7, p. 85-104, 2000.
- Rhodin, A.G.J.; Mittermeier, A.R., Gardnerand, A.L. & Medem, F. Karyotypic analysis of the *podocnemis* turtles. **Copeia**, v.1978, n.4, 723-728. 1978.
- Rueda-Almonacid, J. V.; Carr, R. A.; Mittermeier, J. V.; Rodríguez-Mahecha, R. B. Mast; Vogt, R. C.; Rhodin A. G. J.; Ossa-Velásquez, J. de La; Rueda, J. N. & Mittermeier, C. G. 2007. Las

tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico. Serie de guías tropicales de campo n° 6. Conservación Internacional. Editorial Panamericana, Formas e Impresos. Bogotá, Colombia. 538 pp.

Schneider, S.; Roessli, D. and Excoffier, L. 2000. Arlequin Version 2.000: A software for population genetic data analysis. Laboratório de genética e biometria. Universidade de Geneva, Suíça. Adquirido de: <http://anthropologie.unige.ch/arlequin>.

Schneider, S.; Roessli, D.; Excofier, L. 2001. Arlequin Version 2.000: A software for population genetic data analysis. Laboratório de genética e biometria. Universidade de Geneva, Suíça. Adquirido de: <http://anthropologie.unige.ch/arlequin>.

Spix, J. 1824. Species novae Testudinatum Brazilian. 24 pp. Monachii (*In*: PRITCHARD, P.C.H.; TREBBAU, P. 1984. *Turtles of Venezuela*. Soc. Stud. Amphib. Rept. p: 33-43).

Smith, N. J. H. 1979. Aquatic turtles of Amazonia: na endangered resource, *Biological Conservation*, V. 16, p. 165-176.

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

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

8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2007	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2008	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Extração do DNA das amostras	R	R	R	R								
2	Quantificação do DNA extraído			R	R	R	R						
3	Amplificação do material através da PCR												
4	Purificação do PCR				R	R	R	R	R				
5	Seqüenciamento do produto PCR							R	R	R	R	R	
6	Análise dos resultados							R	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
9	Preparação da Apresentação Final para o Congresso											P	P