

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

**GENÉTICA POPULACIONAL DE PODOCNEMIS UNIFILIS (TESTUDINES,  
PODOCNEMIDIDAE) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA UTILIZANDO  
MARCADORES MICROSSATÉLITES.**

Bolsista: Roberta de Castro Canton

Manaus  
2010

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

RELATÓRIO FINAL  
PIB-B 0018/2010

**GENÉTICA POPULACIONAL DE PODOCNEMIS UNIFILIS (TESTUDINES,  
PODOCNEMIDIDAE) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA UTILIZANDO  
MARCADORES MICROSSATÉLITES.**

Bolsista: Roberta de Castro Canton  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria das Neves Silva Viana

Manaus  
2010

## ÍNDICE

Resumo do Trabalho .....	04
1. INTRODUÇÃO .....	05
1.1 Quelônios .....	05
1.2. <i>Podocnemis unifilis</i> .....	05
1.3 Genética da Conservação .....	06
1.4. Marcador Molecular.....	07
2. OBJETIVOS .....	09
2.1. Objetivo geral .....	09
2.2. Objetivos específicos .....	09
3. Materiais e Métodos .....	10
3.1. Coleta do material .....	10
3.2. Extração de DNA .....	10
3.3. Amplificação <i>in vitro</i> via Reação em cadeia da Polimerase.....	10
3.4. Reação de Genotipagem .....	12
3.5. Análise Genotípica .....	12
3.6. Análise Estatístico Populacional .....	12
4. RESULTADOS .....	14
5. DISCUSSÃO .....	18
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	21
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	22
8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES .....	26

**GENÉTICA POPULACIONAL DE *PODOCNEMIS UNIFILIS* (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES.**

Conhecida popularmente como tracajá, a *Podocnemis unifilis* é provavelmente a espécie mais abundante do gênero na região Amazônica e a segunda maior em tamanho, atrás apenas da Tartaruga da Amazônia. Historicamente, ela é caçada para consumo de suas carnes e ovos, possuindo uma grande importância comercial e cultural, pois é presença constante na refeição das populações locais, como importante fornecedor de proteína. A ação humana, através da predação de sua carne e ovos, e destruição de seu habitat, tem induzido o declínio populacional dessa espécie, causando perda da variação genética e, conseqüentemente, redução de sua capacidade de adaptação. Neste trabalho foram analisados 6 locos microssatélites de 86 indivíduos de cinco localidades da Amazônia brasileira: Manicoré, no rio Madeira (20), Oriximiná (14), Parintins (18), Barreirinha (16), no rio Amazonas, e uma localidade no rio Juruá (18), no Acre. Todos locos estudados foram polimórficos (apresentaram dois ou mais alelos) sendo Puni\_2E7 o que apresentou maior variabilidade na extensão com 46pb variando do menor para o maior alelo e o loco Puni\_2F6 o que teve maior número de alelos, apresentando 29 alelos diferentes. Três dos locos estudados (Puni\_1B2, 1E1 e 2F6) não apresentaram, após a correção de Bonferroni, desvio de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para nenhuma das cinco populações. Os outros três locos (1F10, 1H9 e 2E7) apresentaram deficiência de heterozigotidade para uma ou mais populações. O loco Puni\_1F10 apresentou desvio de EHW significativo para quatro das cinco populações estudadas, indicando a possibilidade de existência de alelos nulos para este loco. Barreirinha foi a população com o menor número de alelos e Juruá e Oriximiná as com maiores números de alelos e maior diversidade genética também (0,814 e 0,775, respectivamente). Com exceção de Parintins, todas apresentaram diversidade genética maior que 0,7, portanto, não há deficiência de diversidade nas populações estudadas. A correlação de Mantel não foi significativa (-0,32 para  $P:0,85$ ), portanto, não foi encontrada correlação entre distancia geográfica e diversidade genética.

Palavras-chave: *Podocnemis*, tracajá, microssatélites.

## **1. Introdução**

### **1.1. Quelônios**

Os quelônios constituem a classe com vida mais longa entre os vertebrados, chegando a viver mais de cem anos. Essa longevidade geralmente implica numa demora para a substituição de indivíduos na população. Associada a caça indiscriminada que não leva em conta a estimativa de densidade ou época da desova, e a sucessiva destruição do habitat, esses fatores levam a uma baixa taxa de entrada de jovens na população (Pough *et al.*, 2003).

Todos os quelônios são ovíparos e nenhum exibe cuidados parentais aos filhotes. Quando seus ovos eclodem, os predadores já se encontram na praia a espera de suas presas. Este é mais um fator para os filhotes, ao nascerem, sofrerem séria taxa de mortalidade ao atravessar os poucos metros de areia até a água.

Diversos autores citam que a reprodução dos Podocnemididae está relacionada com o ciclo anual de vazante e enchente, sendo que a desova e a incubação são realizadas na época seca, e o nascimento dos filhotes coincide com o início da enchente (Alho & Pádua, 1982a; Fachín-Terán, 1992; Thorbjarnarson *et al.*, 1993; Soini, 1996, 1997; Fachín-Terán & von Müllen, 2003)

O uso de informações a respeito dos aspectos básicos da biologia e genética dos quelônios é uma parte crucial dos esforços para manutenção das populações existentes e para o restabelecimento de populações em declínio (Pough *et al.*, 2003).

### **1.2. *Podocnemis unifilis***

Conhecida popularmente como tracajá é provavelmente a espécie mais abundante do gênero e a segunda mais consumida da região amazônica. É essencialmente aquática e os filhotes nascem com manchas amarelo-luminoso na cabeça, que se mantêm nos machos adultos. São animais mais generalistas, podendo ser encontrados nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco, e seus afluentes, no norte da América do Sul, em rios de água preta, clara e branca, também em lagos e reservatórios (Pritchard & Trebbau 1984).

É predominante herbívora, ingerindo macrófitas aquáticas como aguapés e gramíneas. Segundo Fachín-Terán *et al.* (1995), sua dieta pode diferenciar entre machos e fêmeas. Sementes e frutas são mais consumidas por fêmeas e talos e brotos pelos machos.

Apesar de não serem consideradas espécies migratórias, para desovar, a maioria das fêmeas que vivem em lagos de meandros e lagoas migra para os rios, atravessando centenas de metros em terra algumas vezes (Vogt, 2008).

O tracajá é provavelmente o quelônio mais comum da América do Sul, possuindo uma grande importância comercial e cultural, pois é presença constante na mesa do cidadão local, como importante fornecedor de proteína. A ação humana, através da predação de sua carne e ovos, e destruição de seu habitat, tem induzido o declínio populacional dessa espécie, causando perda da variação genética e, conseqüentemente, redução de sua capacidade de adaptação (Escalona, 2008).

Devido a sua ampla distribuição, esta espécie não está iminentemente ameaçada de extinção, porém, se a predação continuar sem controle, ela poderá figurar no grupo das espécies ameaçadas (Vogt, 2008).

### **1.3. Genética da Conservação**

O objetivo do uso da genética na conservação é estudar a biodiversidade molecular em populações naturais que sofrem ação antropogênica (Solé-Cava, 2001), e caracterizar a estrutura genética e história evolutiva de populações naturais que possibilite o apoio a programas de manejo e conservação. A variabilidade genética nos concede estabelecer relações intra e interespecífica, e entre populações, podendo também ser utilizada para detectar modos de reprodução e estrutura familiar e para estimar níveis de migração e dispersão nas populações (Avice, 1994).

A variabilidade genética é fundamental para que haja evolução adaptativa, pois a seleção natural atua entre as variantes que ocorrem dentro das populações em função da adaptação ao ambiente, convergindo esta variação entre populações e, finalmente, entre espécies.

Historicamente, os quelônios de uma maneira geral, vêm sendo explorados tanto para subsistência como comercialmente. A captura

indiscriminada e em grande escala de *P. unifilis* para a comercialização ilegal foi, sem dúvida, a principal razão da redução populacional desta espécie na Amazônia. Como atualmente o tracajá juntamente com a tartaruga da Amazônia foram liberados para a criação em cativeiro e comercialização, nos propomos fazer um estudo genético desta espécie a fim de contribuir para o conhecimento sobre a estruturação populacional. Com este estudo podemos obter informações genéticas que possam ser úteis no desenvolvimento de estratégias de conservação bem sucedidas, como conhecimento sobre efeitos da redução populacional, fluxo gênico entre as populações e acessar a diversidade genética da espécie. Estas informações são importantes para orientar a criação de tracajá em cativeiro para a comercialização desta espécie e auxiliar na implementação de políticas de manejo e monitoramento na natureza.

#### **1.4. Marcador Molecular**

A variabilidade genética pode ser analisada a partir de numerosas técnicas disponíveis que utilizam marcadores moleculares. Marcador genético é um marcador molecular, definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou uma seqüência direta da estrutura do DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1995), que segue os padrões mendelianos de herança quanto à sua segregação.

Uma das técnicas utilizadas para analisar a variabilidade genética fundamenta-se na utilização de marcadores baseados em DNA microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeats*) (Litt e Luty, 1989), que consistem em seqüências curtas, distribuídas aleatoriamente no genoma dos eucariotos, repetidas em tandem com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, possuem natureza altamente repetitiva e flanqueiam seqüências conservadas apresentando comportamento co-dominante (Avisé, 1994).

Os locos microssatélites são multialélicos co-dominantes, e evoluem através de processos mutacionais decorrentes de escorregões da DNA polimerase (*slippage*) durante a replicação e/ou de *crossing over* desigual (Eisen, 1999). Apresentam uma taxa de mutação de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  por locos por geração, que produz o alto nível de diversidade alélica necessária para estudos

genéticos (Schlötterer, 2000). Apesar de suas altas taxas evolutivas, eles são conservativos em suas regiões flanqueadoras (DNA ao redor dos locos microssatélites), podendo estas persistir por um longo período sem modificações (Zardoya *et al.*, 1996).

Cada loco microssatélite é amplificado individualmente através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), utilizando-se um par de iniciadores específicos (de 20 a 30 bases) e complementares as regiões flanqueadoras do microssatélite. Todo segmento amplificado de tamanho diferente (geralmente de várias dezenas até algumas centenas de pares de bases) representa um alelo diferente do mesmo loco (Ferreira e Grattapaglia, 1998).



## **2. Objetivo**

### **2.1. Objetivo Geral**

Determinar o nível de variabilidade genética em cinco populações de *P. unifilis* distribuídas ao longo da Bacia Amazônica, utilizando marcadores moleculares de DNA microssatélite.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Estimar os níveis de variabilidade genética intra e inter populacional de *P. unifilis*;
- Verificar a ocorrência de populações geneticamente estruturadas;
- Determinar se existe correlação entre a divergência genética e a distância geográfica.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Coleta das amostras**

As coletas foram realizadas em cinco localidades da região Amazônica: rio Jarauacá (Oriximiná/PA); rio Andirá (Barreirinha/AM), rio Madeira (Manicoré/AM); rio Amazonas (Parintins/AM) e rio Juruá (Acre) com uma amostragem aproximada de 20 indivíduos por localidade. O método utilizado para a coleta de sangue foi através da punção da veia femural utilizando seringa de 1mL, coletou-se cerca de 100 µl de sangue que foram colocados em microtubos tipo *ependorfs* contendo 500 µl de etanol absoluto, e armazenados a 4°C. Após a coleta de sangue, os filhotes foram libertados no local de origem. As amostras de sangue estão depositadas na Coleção de Tecidos de Genética Animal (CTGA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

#### **3.2. Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada pelo método CTAB (Doyle & Doyle, 1987), com algumas modificações.

A eficácia da extração foi verificada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Neste procedimento, foram utilizados 2µL do DNA extraído juntamente com 2µL de azul de Bromofenol. Após o término da corrida, o gel foi observado em um transluminador de luz ultravioleta VDS.

#### **3.3. Amplificação *in vitro* via PCR**

O DNA extraído foi submetido à Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) seguindo o protocolo econômico descrito por Schuelke (2000), onde se adiciona a cauda M13 a um dos primers e marca-se somente o primer M13 com a fluorescência desejada, neste caso, TET. As condições de termociclagem estão divididas em duas etapas: na primeira etapa, o primer forward com sua seqüência M13 é incorporado ao produto de PCR; na etapa seguinte, quando o primer forward estiver totalmente utilizado, a temperatura de anelamento é reduzida para que ocorra o anelamento do primer universal M13 (-21), que funciona como forward, a fim de que seja incorporada ao produto da PCR a fluorescência. Por esta razão, a quantidade de primer forward é menor que do primer reverse.

Seguindo este protocolo a reação de PCR foi feita num tubo tipo eppendorf 0,2 mL, ajustada para um volume final de 10 $\mu$ L, contendo 4,4 $\mu$ L de Água MilliQ, 0,7 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 0,8  $\mu$ L de dNTP, 1,0  $\mu$ L de Tris-HCL, 0,5 $\mu$ L do Primer Forward M13, 0,5  $\mu$ L do Primer M13, 1,0  $\mu$ L do Primer Reverso, 0,2  $\mu$ L de Taq polimerase e 1,0  $\mu$ L de DNA. A reação é realizada em um termociclador, onde se amplifica a região de DNA microssatélite desejada. A temperatura inicial de desnaturação é de 94°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos à 94°C por 50 segundos; 55°C à 64°C, dependendo da temperatura específica de anelamento para cada primer por 50 segundos; e 72°C por 1 minuto. Logo após, são realizados 10 ciclos à 94°C por 40 segundos, 53°C por 35 segundos e 72°C por 40 segundos, para anelamento do primer M13; com extensão final à 72°C por 20 minutos.

O produto amplificado é então submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para que a eficiência da reação seja constatada. Neste procedimento, serão utilizado 2 $\mu$ L do produto de PCR juntamente com 2 $\mu$ L de Bromofenol, e um marcador de peso molecular conhecido (100 pb), para posterior comparação e estimativa da concentração do DNA em análise. Após o término da corrida, o gel é observado em um transluminador de luz ultravioleta VDS.

Foram utilizados seis locos de microssatélites descritos por Fantin *et. al.* (2007) para as análises: Puni\_1B2, Puni\_1E1, Puni\_1F10, Puni\_1H9, Puni\_2E7, Puni\_2F6. As características dos *primers* estão apresentadas na tabela 1.

TABELA 1: Características dos *primers* utilizados no presente trabalho.

<b>Primer</b>	<b>Região Repetida</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Temperatura de hibridização</b>
Puni_1B2	GA	343 – 369	55°C
Puni_1E1	CT <sub>9</sub> ttCT <sub>7</sub>	185 – 209	64°C
Puni_1F10	CT <sub>8</sub>	203 – 215	60°C
Puni_1H9	GA <sub>12</sub>	171 – 191	60°C
Puni_2E7	GA <sub>2</sub> gcGA <sub>8</sub>	260 – 282	56°C
Puni_2F6	CT <sub>6</sub> Tct <sub>10</sub>	291 – 325	60°C

### 3.4. Reação de Genotipagem

As reações de genotipagem foram feitas em uma microplaca com 96 poços para um volume final de 10 $\mu$ L, contendo 3 $\mu$ L do produto da PCR, que é diluído com 15 $\mu$ L ou 20 $\mu$ L de Água MilliQ, e 7 $\mu$ L da solução para genotipagem. Esta solução contém 775 $\mu$ L de *Tween* 1% e 25 $\mu$ L do padrão de genotipagem ET400. A reação é então desnaturada à 94°C por 5 minutos e injetada no seqüenciador automático MegaBACE 1000, para que os genótipos do produto da PCR sejam determinados e analisados com a ajuda dos softwares específicos: *Genetic Profiler* e *Fragment Profiler*.

### 3.5. Análise Genotípica

A análise genotípica foi realizada utilizando-se os programas *Genetic Profiler* e *Fragment Profiler*, a fim de que seja identificado o genótipo de cada loco para os indivíduos amostrados. Em seguida, será construída uma matriz com as informações dos genótipos dos indivíduos para que sejam feitas as análises estatísticas para os indivíduos amostrados.

### 3.6. Análises Estatísticas - Populacionais

Estimativas sobre a existência de polimorfismo intra-específico e divergências genéticas entre populações foi obtida através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), utilizando-se o programa Arlequin versão 2000 (Schneider *et al.*, 2001), 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.

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) é uma condição genética ótima caracterizada pela união aleatória de alelos de um loco em uma população infinitamente grande. O método da Cadeia de Markov foi usado para fornecer uma estimativa imparcial da probabilidade do EHW dos alelos microssatélites em cada população. Desta maneira, variações no tamanho dos *loci* microssatélites são determinadas através da frequência de heterozigotos (observada e esperada) e testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg,

desequilíbrio de ligação e divergência na frequência alélica e genotípica entre as populações, utilizando-se também o programa ARLEQUIN versão 2000.

A estimativa da variabilidade genética e as medidas estatísticas de genética populacional foram feitas através das análises das frequências e distribuição dos alelos de cada *locus* microssatélite com o programa ARLEQUIN versão 2000. As observações dos resultados permitirão instituir a variabilidade e distância genética intraespecífica nas diferentes localidades, permitindo a determinação do grau de diferenciação genética entre os indivíduos e dos níveis de variabilidade genética nas populações. A analogia entre a distância genética e geográfica será realizada pelo teste de Mantel (1967), também no programa ARLEQUIN versão 2000. A significância dos resultados foi avaliada por testes de permutação (1000 replicações) e todos os níveis de significância para os testes envolvendo comparações múltiplas foram ajustados seguindo a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

#### 4. Resultados

Foram analisados seis locos de microssatélites para as populações de *P. unifilis* do Juruá, Manicoré, Barreirinha, Parintins e Oriximiná, as quais apresentaram número de alelos por loco superior a dois, evidenciando o polimorfismo dos mesmos. A média de alelos por locos foi de 16,17 variando entre 11 a 26, respectivamente para os locos Puni\_1F10 e Puni\_2F6 (tabela 2). Os alelos do loco Puni\_1F10 apresentaram o menor tamanho, enquanto os alelos do Puni\_2E7 foram os maiores. Com exceção do loco Puni\_2E7, em todos os demais foram observados desequilíbrio de ligação entre os heterozigotos esperados e observados (tabela 2).

TABELA 2. Caracterização de seis locos microssatélites em *Podocnemis unifilis*.

Locos	Tamanho da extensão	Nº. de alelos	Tamanho dos alelos	$H_O$	$H_E$
Puni_1B2	343 – 369	12	26	0,6212	0,8536*
Puni_1E1	185 – 209	19	30	0,7284	0,8598*
Puni_1F10	203 – 215	11	11	0,2933	0,8071*
Puni_1H9	171 – 191	14	30	0,4588	0,8427*
Puni_2E7	260 – 282	15	46	0,4615	0,5661
Puni_2F6	291 – 325	26	35	0,6935	0,8780*

Nota:  $H_O$  - heterozigosidade observada;  $H_E$  - heterozigosidade esperada; \*Valor significativo de  $P < 0.05$  após correção de Bonferroni.

A partir dos resultados obtidos, foi observada uma variação de 3 a 11 alelos por locos por população, sendo o menor número de alelo por locos obtido para o loco Puni\_1F10 da população Barreirinha e o maior para o loco Puni\_2E7 população do Manicoré (tabela 3). Na média o número de alelos por locos para a população do Juruá e Barreirinha foi de 6,33, enquanto para Manicoré, Parintins e Oriximiná foi de 7,33; 6,50 e 6,67, respectivamente (tabela 4). Após correção de Bonferroni ( $P < 0,05$ ) foi diagnosticada ao menos um par de locos em desequilíbrio de ligação para todas as populações. As populações Manicoré, Barreirinha e Oriximiná apresentaram desequilíbrio de ligação para apenas o par de locos Puni\_1F10, enquanto a população de Parintins apresentou desequilíbrio de ligação no locos Puni\_1B2 e Puni\_1H9 e a população do Juruá no locos Puni\_1B2 e 1F10 (tabela 3).

TABELA 3. Caracterização de seis locos microsatélites por população em *Podocnemis unifilis*.

		Puni_1B2	Puni_1E1	Puni_1F10	Puni_1H9	Puni_2E7	Puni_2F6
Juruá AC	G	10	17	13	17	11	11
	N	6	8	4	5	6	9
	$H_o$	0,3000	0,7059	0,2308	0,4706	0,3636	0,7273
	$H_E$	0,7579	0,8057	0,6738	0,6257	0,6320	0,7879
	P	0,0010**	0,1404	0,0004**	0,2051	0,0157	0,1974
Manicoré AM	G	18	20	19	21	19	20
	N	7	6	4	7	11	9
	$H_o$	0,6667	0,8000	0,1579	0,6190	0,7368	0,7500
	$H_E$	0,8048	0,6820	0,4737	0,7433	0,8421	0,7974
	P	0,1934	0,0876	0,0007**	0,1783	0,0993	0,0510
Barreirinha AM	G	12	16	15	16	13	12
	N	9	7	3	5	6	8
	$H_o$	0,6667	0,7500	0,2000	0,4375	0,4615	0,6667
	$H_E$	0,8623	0,8206	0,5356	0,6049	0,5661	0,8406
	P	0,2011	0,5664	0,0047**	0,2791	0,0695	0,1661
Parintins AM	G	12	16	14	17	18	15
	N	8	7	4	5	6	9
	$H_o$	0,6667	0,8125	0,5714	0,1176	0,7778	0,6000
	$H_E$	0,7645	0,7681	0,5847	0,6712	0,6794	0,8092
	P	0,0035**	0,6003	1,0000	0,0000**	0,7158	0,0147
Oriximiná PA	G	14	12	14	14	14	4
	N	8	7	5	5	9	6
	$H_o$	0,7143	0,5000	0,3571	0,6429	0,7143	0,7500
	$H_E$	0,8122	0,5581	0,7249	0,7345	0,8280	0,8929
	P	0,1653	0,2100	0,0046**	0,3106	0,2096	0,4179

Nota: G – número de genótipos amostrados; N – número de alelos;  $H_o$  - heteroziguidade observada;  $H_E$  - heteroziguidade esperada; \*\* Valores significantes após correção de Bonferroni ( $P < 0,0083$ ).

As análises das populações de *P. unifilis* demonstraram altos índices de diversidade gênica, com exceção para a população do Juruá como pode ser observado na tabela 4. A diversidade gênica para essa população foi de zero, enquanto que para as demais variou de 0,6794 ( $\pm 0,4399$ ) para a localidade de Manicoré a 0,7751 ( $\pm 0,4618$ ) em Oriximiná. A média da diferença entre os pares, definida como a média das diferenças entre todos os locos amostrados, variou de 0,6794 ( $\pm 0,5308$ ) na população de Parintins a 3,1005 ( $\pm 1,6593$ ) na Oriximiná. A população do Juruá apresentou média das diferenças entre os

pares de zero, que era previsto devido o baixo índice de diversidade gênica (tabela 4). Na análise de desequilíbrio de ligação para as populações do Juruá e Parintins não foram encontrados valores significantes ( $p < 0,05$  após correção) para 66,67% das comparações entre os locos, enquanto para as populações de Manicoré, Barreirinha e Oriximiná não houve significância em 83,33% das comparações entre os seis locos analisados.

TABELA 4. Medidas de diversidade genética.

População	<i>N</i>	Diversidade gênica	Média das diferenças entre os pares	<i>M</i>	$H_O - H_E$
Juruá	18	0,0000±0,0000	0,0000±0,0000	6,33	0,4664-0,7138
Manicoré	21	0,6945±0,4399	2,0836±1,1884	7,33	0,6217-0,7239
Barreirinha	16	0,7127±0,4969	1,4254±0,8935	6,33	0,5304-0,7050
Parintins	18	0,6794±0,5900	0,6794±0,5308	6,50	0,5910-0,7127
Oriximiná	14	0,7751±0,4618	3,1005V±1,6593	6,67	0,6131-0,7586

Nota: *N* - número amostral; *M* - número médio de alelos;  $H_O$  - heterozigosidade observada;  $H_E$  - heterozigosidade esperada.

Os resultados de variação molecular revelaram moderado grau de estruturação populacional ( $F_{ST}$  0,2245  $P < 0,001$ ). A maior variação genética obtida ocorreu dentro das populações (53,17%) do que em relação a variação entre as populações (22,45%) e entre os indivíduos dentro da população (24,38%). Os valores de  $F_{ST}$  para as comparações par-a-par entre as localidades foram significantes para a maioria, exceto para as comparações entre as populações do Juruá/Manicoré e Barreirinha/Oriximiná, evidenciando a existência de estruturação entre as populações. No geral, o número de migrantes entre as populações foi considerado alto variando de 1,10 a 16,36. Os maiores valores de migrantes ocorreram entre Manicoré/Juruá ( $Nm=16,36$ ) e Oriximiná/Barreirinha ( $Nm=8,18$ ), populações que não apresentaram valores de  $F_{ST}$  significantes (tabela 5). Apesar da distância de 2.675,54 quilômetros entre as populações de Manicoré e Juruá, a maior entre as populações, foram as que obtiveram maior fluxo gênico com número de migrantes de 16,36. Ao contrario, o fluxo gênico entre as populações de Barreirinha e Parintins foi de apenas 1,26 migrantes por geração mesmo apresentando distância de 44,92



quilômetros entre elas. O teste de Mantel (-0,16280  $P=0,5797$ ) não foi significativo.

TABELA 5. Valores de  $Nm$  (acima da diagonal e à direita) e valores de  $F_{ST}$  (abaixo da diagonal e à esquerda) observados entre os pares de populações de *P. unifilis*.

	Juruá	Manicoré	Barreirinha	Parintins	Oriximiná	AMOVA		
Juruá	--	16,36	3,14	1,25	2,13	Entre população	Entre indivíduos dentro população	Dentro população
Manicoré	0,0352	--	2,74	1,26	1,92			
Barreirinha	0,2399*	0,2376*	--	1,26	8,18	22,45%	24,38%	53,17%
Parintins	0,3531*	0,2885*	0,3639*	--	1,10			
Oriximiná	0,1829*	0,1564*	0,0290	0,2979*	--	F <sub>ST</sub> 0,2245 P<0,001		

Nota: \* Indica valor significativo de  $F_{ST}$  com  $P < 0,05$  após correção de Bonferroni para múltiplas comparações. Em negrito indica os maiores valor de  $Nm$ .

## 5. Discussão

A pressão antropogênica, como a destruição de habitats e principalmente a exploração comercial, tem contribuído para o declínio populacional e extinção de muitas espécies. Mudanças na distribuição e abundância das populações devido a super-exploração humana pode afetar a dinâmica de processos como seleção natural, fluxo gênico e deriva genética, que acarreta modificações na estrutura da diversidade dentro e entre as populações (Vrijenhoek, 1998; Mills 2006). A estrutura populacional é modificada quando ocorre o aumento do declínio populacional ocasionado pela erosão genética promovida pelo acasalamento consanguíneo e rápida perda de alelos, reduzindo o potencial de adaptação da população frente às mudanças ambientais (Stockwell *et al.*, 2003). As populações de *P. expansa* e *P. unifilis* desde o século XVIII são exploradas comercialmente como fonte de alimento, além de sofrerem perda de habitat devido à destruição ambiental contribuindo de forma significativa para seu declínio populacional (Smith, 1979; Redford & Robinson, 1991; IUCN, 1994; Rebêlo & Lugli, 1996; Rebêlo & Pezzuti, 2000; Pearse *et al.*, 2006; Escalona *et al.*, 2009). A espécie *P. unifilis*, mesmo sendo considerado abundante da bacia Amazônica brasileira, devido à alta exploração comercial e destruição de seus habitat, é classificado como “vulnerável e baixo risco, mas dependente de conservação” na *Red List* – IUCN (1994) e incluída no apêndice II do CITES (*Convention on International Trade in endangered Species* – <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>).

Como estratégia para conservação e manejo de quelônios na Amazônia Legal Brasileira, diversos programas são direcionados às espécies de *P. unifilis* e *P. expansa* com o intuito de proteger as áreas de nidificação, o habitat, criação para soltura de filhotes na natureza e criação de quelônios destinados a comercialização (Cantarelli, 1993; Cantarelli, 1997). Desta forma, foi estudada a estrutura populacional e a diversidade genética de *P. unifilis* buscando disponibilizar informações que possam ser usadas na implementação efetiva de programas de conservação.

Os locos utilizados nesse estudo apresentaram alto grau de poliformismo com média de 16,17 alelos por loco. Nas análises foi observado desequilíbrio de ligação entre os locos estudados, exceto para o loco

Puni\_2E7. Os locos de microssatélites utilizados nesse estudo foram desenvolvidos por Fantin *et al.*, (2007). No desenvolvimento dos mesmos os autores evidenciaram deficiência de heterozitogos para os locos Puni\_1F10 e Puni\_1H9, assim como, excesso de heterozigosidade para Puni\_2E7.

A partir dos resultados foi observado desequilíbrio de ligação em pelo menos um loco dos seis estudados por população. O loco Puni\_1F10 apresentou desequilíbrio em quatro das populações analisadas, apresentam deficiência de heterozigotos como descrito por Fantin *et al.*, (2007). O loco Puni\_1B2 também apresentou deficiência de heterozigotos, contudo, o mesmo fato não foi relatado para esse loco nas análises de Fantin *et al.*, (2007). Em estudos utilizando microssatélites, contudo, para *P. expansa* na população do Abufari Pearse *et al.*, (2006) encontraram ausência de equilíbrio de ligação em seis dos sete locos analisados. Quando uma população está em equilíbrio de ligação significa dizer que esta apresenta constância tanto nas frequências alélicas como genotípicas ao longo de gerações sucessivas, ou alteração não significativa nos valores das frequências. No geral, as populações estudadas nesse trabalho apresentaram constância nas frequências alélicas e genotípicas como mencionado acima. Mesmo apresentando desequilíbrio de ligação em dois locos (Puni\_1B2 e Puni\_1F10) as populações do Juruá e Parintins não foram obtidos valores significantes em 66,67% das comparações, já para Manicoré, Barreirinha e Oriximiná esse valor aumenta para 83,33%. Escalona *et al.*, (2009) encontrou desequilíbrio de ligação para população de *P. unifilis* localizada no Trombetas/AM, em que foi encontrado deficiência de heterozigotos.

Neste trabalho foram detectados altos níveis de diversidade gênica para as populações de *P. unifilis*, exceto para Juruá, assim diversidade alélica. Resultados semelhantes foram encontrados por Escalona *et al.*, (2009) analisando locos de microssatélites em populações de *P. unifilis* localizada na Venezuela, Colômbia, Peru e Trombetas/Brasil. Altos níveis de diversidade e riqueza alélica também foram diagnosticados para outras tartarugas exploradas como a congênere *P. expansa* (Pearse *et al.*, 2006). Esses resultados sugerem que a pressão antropogênica ainda não está afetando a variabilidade genética das populações analisadas (Escalona *et al.*, 2009). Contudo, essa variabilidade encontrada pode ser reflexo de diversidade que ainda não está sendo afetada

por fatores recentes, devido essa espécie apresentar sobreposição de gerações por causa da grande longevidade e múltipla paternidade (Gibbons and Semlitsch, 1982; Fantin *et al.*, 2007; Escalona *et al.*, 2009).

As populações aqui analisadas apresentaram moderado grau de estruturação populacional com  $F_{ST} = 0,2245$  e significância de  $P < 0,001$ , após correção de Bonferroni para  $\alpha = 0,05$ . Interessantemente, as comparações par-a-par entre as populações de Juruá e Manicoré não foram significantes e apresentou alto nível de fluxo gênico ( $Nm = 16,36$ ). Essas populações estão separadas por aproximadamente 2.675,54 quilômetros seguindo o curso dos rios. Ao contrario da congênero *P. expansa*, *P. unifilis* não apresenta como característica dispersão a longas distâncias (Bock *et al.*, 1998) indo de oposição aos dados aqui reportados. Para melhor compreender essa situação sugere-se aumentar o número amostral, assim como, amostrar populações intermediária a essas localidades para maiores confirmação dos dados aqui apresentados. As populações de Barreirinha e Oriximiná, equidistantes a 194,81 quilômetros, também não apresentaram valores de  $F_{ST}$  significante e número de migrante igual a 8,18. Apesar de possuírem equidistância de 44,92 e 149,89, respectivamente para as comparações entre Barreirinha/Parintins e Oriximiná/Parintins, foi observado  $F_{ST}$  significante. Bock *et al.*, (2001) estudando padrão eletroforético em *P. unifilis* e *P. expansa*, encontrou pronunciada diferenciação entre as populações de *P. unifilis* separadas a pouco mais que 60 quilômetros, semelhante às populações separadas a milhares de quilômetros. Bock *et al.*, (2001) sugere que tal fato esteja relacionado as características generalista da espécie, pois sendo menos seletiva tanto em termos alimentar e microhabitat de nidificação, essa espécie pode satisfazer suas necessidades dentro de uma área muito mais restrita. Assim, Bock *et al.*, (2001) concluem que apesar da grande variedade geográfica de *P. unifilis*, essas são compostas por múltiplas populações isoladas reprodutivamente, mesmo na ausência de barreiras reprodutivas. Por meio dos dados aqui apresentados, não foi observado relação entre a distância genética e geográfica ( $r = -0,16280$   $P = 0,5797$ ), contudo, o baixo número de populações analisadas pode ter influenciado no teste, assim, mais populações deve ser incluída nas análises.

## 6. Considerações finais

Os dados aqui reportados apresentam implicação para a conservação e manejo das espécies de *P. unifilis*. As populações de *P. unifilis*, assim como, sua congênere *P. expansa* tem apresentado recente declínio populacional em muitos lugares, devido à exploração e perda de habitat (Vrijenhoek, 1998). As populações estudadas nesse trabalho devem ser consideradas com unidade de manejo, a fim de promover a manutenção de sua variabilidade genética. Afinal, se uma espécie ocupando uma determinada área se apresenta geneticamente estruturada, a estratégia para sua conservação deve procurar preservar sua diversidade genética desta localidade, pois a espécie pode apresentar adaptações específicas para esta área as quais seriam perdidas caso a população fosse misturada com outras (Vasconcelos, 2005). Mesmo as populações de Minicoré e Juruá que não apresentaram  $F_{ST}$  significativo devem ser consideradas como unidade de manejo, até que outras populações localizadas entre essas sejam amostradas. A aparente alta diversidade genética encontrada para as populações de *P. unifilis* estudadas nesse trabalho devem ser consideradas com cautela, essa variabilidade pode ser reflexo de diversidade que ainda não está sendo afetada por fatores recentes, devido essa espécie apresentar sobreposição de gerações por causa da grande longevidade e múltipla paternidade (Gibbons and Semlitsch, 1982; Fantin *et al.*, 2007; Escalona *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos fornecem informações para que projetos de manejo e conservação de *P. unifilis* sejam desenvolvidos adequadamente. A conservação das diversas espécies de quelônios da Amazônia é importante não apenas por manter a diversidade biológica neste bioma, mas também por serem um meio de subsistência para as populações ribeirinhas e simbolismo cultural para muitas etnias indígenas (Rebêlo & Lugli, 1996; Salera *et al.*, 2006).

## 7. Referências Bibliográficas

- Alho, C.J.R. & Pádua, L.F.M. 1982a. Reproductive parameters and nesting behavior of the amazon turtle *Podocnemis expansa* (Testudinata: Pelomedusidae) in Brazil. *Canadian Journal of Zoology*, 60 (1): 97-103.
- Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman e Hall, Inc., USA. 511 p.
- Bock, B. C., Páez;, V. P., & Pérez, N. F. (1998). Estudio preliminar con radiotelemetr[ia sobre los desplazamientos de hembras de la tortuga *Podocnemis unifilis* en el río Caquetá, Amazonas, Colombia. *Actual Biología*, 20, 29-36.
- Bock, B. C., Páez;, V. P., & White, M. M. (2001). Genetic Population Structure of Two Threatened South American River Turtle Species, *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis*. *Chelonian Conservation and Biology*, 4(1), 1-6.
- Cantarelli, V. H. (1993). Projeto Quelônios da Amazônia, 10 Anos Ministério do Interior, IBAMA, Brasília.
- Cantarelli, V. H. (1997). The Amazon turtles - conservation and management in Brazil. In *Proceedings: Conservation, Restoration, and Management of Tortoises and Turtles* (pp. 407-410). New York: Turtle and Tortoise Society.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13– 15.
- Eisen, J.A. (1999). Mechanistic basis for microsatellite instability. In: *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds Goldstein, D.B. & Schlötterer, C.). Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 34–48.
- Escalona, T. *et al* (2008). Population genetics of the endangered South American freshwater turtle, *Podocnemis unifilis*, inferred from microsatellite DNA data. *Springer Science*
- Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491p.
- Fachín-Terán, A. 1992. Desove y uso de playas para nidificación de taricaya (*Podocnemis unifilis*) en el río Samiria, Loreto-Perú. *Boletín de Lima* 79:65-75.
- Fachín-Terán, A.; Vogt, R.C.; Gomez, M.F.S. 1995. Food habitats of na

assemblage of five species of turtles in the rio Guaporé, Rondônia, Brazil. *Journal of Herpetology* 29(4):536-547.

Fachín-Terán, A. & Von Mülhen, E.M. 2003. Reproducción de la taricaya *Podocnemis unifilis* Troschel 1848 (Testudines: Podocnemididae) en la várzea del medio Solimões, Amazonas, Brasil. *Ecología Aplicada* 2(1):125-132.

Fantin, C.; Carvalho, C. F.; Hrbek, T.; Sites JR, J. W.; Monjeló, L. A. S.; Astolfi-Filho, S.; Farias, I. P. 2007. Microsatellite DNA markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle. *Molecular Ecology Notes* 7 (6): 1235-1238 p.

Ferreira, M. E. e Grattapaglia, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília. EMBRAPA-CENARGEM, pp. 220  
Ferreira, M. E. e Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília. EMBRAPA-CENARGEM, pp. 220.

Gibbons, W., & Semlitsch, R. D. (1982). Survivorship and longevity of a long-lived vertebrate species: How long do turtles live? *Journal of Animal Ecology*, 51, 523-527.

Litt, M. e Luty, J. A. 1989 . A Hipervariable Microsatellite Revealed by in vitro amplification of a dinucleotidic repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. H. Genet.* 44: 398-401.

Mills, L. S. (2006). *Conservation of wildlife populations: demography, genetics, and management*. Blackwell. Oxford, UK: Blackwell Publishing.

Neigel, J. E. 2002. Is FST obsolete? *Conservation Genetics* 3:167-173  
Pough, F.H.; Janis, C.M.; Heiser, J.B. A Vida dos Vertebrados. 3ª ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.

Pearse, D. E., Dastrup, R. B., Hernandez, O., & Sites JR, J. W. (2006). Paternity in an Orinoco Population of Endangered Arrau River Turtles, *Podocnemis expansa* (Pleurodira; Podocnemididae), from Venezuela D. *Chelonian Conservation and Biology*, 5(2).

Pritchard, P.C.H. & Trebbau, P. 1984. *The Turtles of Venezuela*. Society for the studies of amphibians and reptiles. *Contributions to Herpetology*. 2: VIII + 403.  
Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365–371.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18 (2): 233-234.

Rebêlo, G. H., & Lugli, L. (1996). The conservation of freshwater turtles and the dwellers of the Amazonian Jaú National Park (Brasil). In S. K. Jain, *Ethnobiology in human welfare* (pp. 253-258). New Delhi: Deep Publications.

Rebêlo, G. H., Pezzuti, J. C., Lugli, L., & Moreira, G. (2005). Parque Pesca Artesanal de Quelônios no Parque Nacional do Jaú (AM). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi (Ciências Humanas)*, 1(1), 109-125.

Redford, K. H., & Robinson, J. G. (1991). Subsistence and commercial uses of wildlife. In J. G. Robinson & K. H. Redford, *Neotropical wildlife use and conservation* (pp. 7-23). Chicago: University of Chicago Press.

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](http://anthropologie.unige.ch/arlequin).

Salera Jr., G., Malvasio, A., & Giralдин, O. (2006). Antropologia: Índios Karajá, tartarugas e tracajás vivem em harmonia no rio Araguaia - Relações cordiais. *Ciência Hoje*, 38, 61-63.

Smith, Nigel J. H. (1979). Aquatic turtles of Amazonia: An endangered resource. *Biological Conservation*, 16(3), 165-176.

Soini, P. 1996. Reproducción, abundancia y situación de quelonios acuáticos en la Reserva Nacional Pacaya-Samiria, Perú. *Folia Amazonica* 8(1):147-164

Solé-Cava, A.M. 2001. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In MATIOLI, S.R. (ed.). *Biologia Molecular e Evolução*. Holos, Ribeirão Preto. p. 172-192

Thorbjarnarson, J.B.; Perez, N.; Escalona, T. 1993. Nesting of *Podocnemis unifilis*. *Journal of Herpetology* 27(3):344-347.

Vasconcelos, W. R. (2005). Diversidade genética e estrutura populacional dos crocodilianos jacaré-açú (*Melanosuchus niger*) e jacaré-tinga (*Caiman crocodilus crocodilus*) da Amazônia.

Vrijenhoek, R. C. (1998). Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 53, 394-412.

Vogt, R. C. *Tartarugas da Amazônia*. Lima: Gráfica Biblos, 2008.

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



Zardoya, R.; Vollmer, D. M.; Craddock, C.; Streelman, J. T.; Karl, S.; Meyer, A. 1996. Evolutionary Conservation of Microsatellite Flanking Regions and their Use in Resolving the Phylogeny of Cichlid Fishes (Pisces: Perciformes). *Proceedings: Biological Sciences* 263 (1376): 1589-1598.

### 8. Cronograma de Atividades

Nº	Descrição	Ago 2010	Set	Out	No V	Dez	Jan 2011	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Seleção das Amostras	E	E										
2	Extração de DNA das Amostras		E	E	E								
3	Quantificação do DNA e Ajuste das Alíquotas de Trabalho		E	E	E								
4	Amplificação do Material através de PCR				E	E	E	E					
5	Genotipagens				E	E	E	E					
6	Organização do Banco de Dados das Genotipagens					E	E	E	E				
7	Análise dos Resultados							E	E	E	E	E	
8	Levantamento Bibliográfico	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	P
9	Elaboração do Resumo e Relatório Final									E	E	E	
10	Preparação da Apresentação Final para o Congresso												P

**E: Executado**

**P: Previsto**