

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/0074 /2011 CNPq

ESTIMATIVA E COMPARAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA INTER E
INTRA POPULACIONAL DE TRACAJÁ (FAMILIA PODOCNEMIDIDAE) EM
TRÊS TRIBUTÁRIOS DA BACIA AMAZÔNICA

Bolsista: Camila Paiva Vieira
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Neves Silva Viana

Manaus, 2012

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| i LISTA DE FIGURAS | 03 |
| ii RESUMO | 04 |
| 1. INTRODUÇÃO | 05 |
| 1.1 Família Podocnemididae | 05 |
| 1.1 Gênero <i>Podocnemis</i> | 06 |
| 1.3 <i>Podocnemis unifilis</i> | 06 |
| 1.4 Genética de Populações | 07 |
| 1.5 Marcadores Moleculares..... | 08 |
| 1.6 DNA Mitocondrial e Região Controle (Dloop)..... | 09 |
| 2. OBJETIVOS | |
| 2.1. Objetivo geral | 09 |
| 2.2. Objetivos específicos | 09 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 09 |
| 3.1. Coleta do Material | 09 |
| 3.2. Extração de DNA..... | 10 |
| 3.3. Amplificação <i>in vitro</i> via Reação em Cadeia da Polimerase..... | 11 |
| 3.4. Purificação do Material | 11 |
| 3.5. Reação de Sequência | 11 |
| 3.6. Sequenciamento | 12 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 13 |
| 5. CONCLUSÃO | 18 |
| 6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES | 19 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 20 |

i. LISTA DE FIGURAS E TABELAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Exemplar juvenil de <i>Podocnemis unifilis</i> | 06 |
| Figura 2. Mapa com as áreas de coleta de <i>Podocnemis unifilis</i> | 10 |
| Figura 3. Distribuição dos haplótipos de <i>P. unifilis</i> em função das localidades..... | 14 |
| Tabela 1. Resultado geral das análises..... | 15 |
| Tabela 2. Estimativa indireta de fluxo gênico (Nm) (acima da diagonal à direita) e diferenciação genética (F_{ST}) (abaixo da diagonal à esquerda) entre os pares de populações de <i>P.unifilis</i> | 16 |

ii. RESUMO

Os quelônios sofrem uma forte pressão antropogênica, devido ao sabor de sua carne e seus ovos. A exploração deste grupo concentra-se principalmente na família Podocnemididae, por possuir espécies de grande porte, como as do gênero *Podocnemis*. *Podocnemis unifilis*, conhecida popularmente como tracajá se encontra amplamente distribuída na bacia Amazônica, e é intensamente explorada tanto pelas populações tradicionais quanto por quelonicultores. Por se tratar de uma espécie suscetível a manejo é importante o estudo da diversidade genética e dinâmica de populações para fornecer suporte técnico adequado, ao órgão responsável pelo fornecimento destes animais aos criadores que vem distribuindo os filhotes sem um conhecimento prévio da estruturação das populações desta espécie. Além disso, este conhecimento é necessário durante o manejo das espécies na natureza para procurar manter a mesma diversidade genética encontrada nas populações daquele local, pois esta pode representar adaptações específicas para a região. Neste estudo analisamos sequências com 544 pares de bases do DNA mitocondrial de 45 indivíduos de *P. unifilis* provenientes da bacia do rio Amazonas nas localidades de Santarém; do rio Tocantins, no lago da represa de Tucuruí e rio Trombetas, na Reserva Biológica de Trombetas. Foram observados 20 haplótipos entre as populações e os parâmetros genéticos de diversidade gênica média (\hat{H}) e diversidade nucleotídica média (Π) apresentaram valores de 0,7577 e 0,006429 respectivamente. As análises de variância molecular (AMOVA) revelaram alto grau de subdivisão populacional ($F_{ST} = 0.33356$; $P < 0,001$). Os resultados mostraram que a maior variação genética dentro das amostras populacionais (66.64%). O teste de Mantel indicou que a diversidade genética não está associada à distância geográfica entre as localidades do estudo ($r = 0.811434$, $P < 0,05$). Nas três localidades foram evidenciados limitado fluxo gênico (Nm) confirmando que estas populações são diferenciadas geneticamente. Também foi realizada uma análise (com cinco localidades) incluindo às três populações estudadas mais duas provenientes da bacia do rio Amazonas das localidades de Terra Santa e Parintins Esta análise reafirmou estrutura nas populações de Trombetas e Tucuruí. Também foi realizado o Teste de Mantel para as cinco populações e indicou não haver correlação entre a distância geográfica e a diversidade genética ($r = 0.210851$ $P < 0,05$). Constatando que existem subpopulações geneticamente distintas de *P. unifilis* nas regiões estudadas, estas devem ser tratadas como unidades de manejo individuais com o objetivo de monitorar as populações e designar políticas de conservação e manejo que mantenham a diversidade genética das populações e da espécie.

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

1. INTRODUÇÃO

Os quelônios são animais de vida longa, podem chegar a aproximadamente 100 anos. Muitas espécies apresentam baixas taxas de crescimento e requerem longos períodos para atingir a maturidade. Espécies de pequeno porte, como a tartaruga-pintada (*Chrysemys picta*), não atingem a maturidade antes dos sete a oito anos de idade e podem viver mais de 25 anos. Espécies de maior porte como jabutis e tartarugas marinhas podem viver tanto quanto os seres humanos, e os jabutis-caixa podem viver mais do que 50 anos (Pough *et al.*, 2003).

A ordem Testudines compreende os répteis terrestres, marinhos e dulcícolas. Apresenta o corpo envolvido por duas conchas ósseas, uma carapaça dorsal e um palastrão ventral que estão ligados lateralmente por uma ponte óssea. As suas mandíbulas são desenvolvidas, assumindo a forma de um bico córneo, ausência de dentes, língua não extensível, presença de pálpebras e pescoço geralmente retrátil com oito vértebras cervicais. Os membros são geralmente pentadáctilos, todos são ovíparos e não apresentam cuidados parentais.

Os Testudines 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).

1.1 Família Podocnemididae

A família Podocnemididae pertence a subordem Pleurodira e segundo Noonan (2000), esta família compreende um grupo monofilético que reúne três gêneros de quelônios de água doce: *Erymnochelis* (Baur, 1888); *Peltocephalus* (Duméril e Bibron, 1835) e *Podocnemis* (Wagler, 1830). O gênero *Erymnochelis* está representado por apenas uma espécie vivente, *E. madagascariensis* (Grandidier, 1867), restrita a Madagascar (Pritchard e Trebbau, 1984). *Peltocephalus*, grupo-irmão de *Podocnemis*, é monoespecífico, estando *Peltocephalus dumerilianus* (Schweigger, 1812) distribuída pelo leste da Colômbia, sudoeste da Venezuela e noroeste do Brasil (Pritchard e Trebbau, 1984).

1.2 Gênero *Podocnemis*

O gênero *Podocnemis* (WAGLER, 1830), pode ser encontrado na América do Sul. Este gênero possui seis espécies, das quais quatro podem ser encontrados na região Amazônica Brasileira: *Podocnemis unifilis* (TROSCHER, 1848), *Podocnemis sextuberculata* (CORNÁLIA, 1849), *Podocnemis erythrocephala* (SPIX, 1824) e *Podocnemis expansa* (SCHEIGGER, 1812).

1.3 *Podocnemis unifilis*

Tem uma ampla distribuição em planícies tropicais do norte da América do Sul nas bacias venezuelanas dos rios Orinoco e Amazonas, leste da Colômbia, leste do Equador, nordeste do Peru, Guiana Francesa, Guiana, Suriname e bacia do rio Amazonas no norte do Brasil, e norte da Bolívia. A espécie vive em uma variedade de habitats, tais como, grandes rios, lagos, lagos de meandro, pântanos, brejos e lagoas (Vogt, 2008). Quanto à morfologia apresenta patas curtas e cobertas com pele rugosa, cabeça achatada e cônica, de pequeno tamanho em relação ao corpo (Figura 1).



Figura 1. Exemplar juvenil de *P. unifilis*.

Esta espécie é muito predada por populações ribeirinhas, é a segunda espécie mais consumida da região, devido à qualidade de sua carne e ovos, além do sabor possuem uma grande reserva de gordura (BRANCO, 1997). Após a publicação da portaria 142/92-P, que regulamentou a criação em cativeiro para a comercialização da tartaruga da Amazônia (*P. expansa*) e do tracajá (*P. unifilis*) aumentou a procura destas espécies por pessoas interessadas em iniciar criação de quelônios para comercialização.

O IBAMA fornece filhotes aos criadores, os quais são retirados da natureza sem que haja um prévio estudo das características genéticas e ecológicas para escolher a melhor região de onde serão coletados. Para solucionar este problema é necessário

conhecer as características genéticas das populações naturais destas espécies para orientar a elaboração de projetos adequados ao manejo e conservação.

1.4 Genética de Populações

A genética da conservação tem sido aplicada nos estudos relacionados a conservação de espécies animais e vegetais em todo o planeta, sendo esta, fornecedoras de ferramentas que auxiliam na identificação de espécies comercializadas, do local onde ocorreu a exploração, ou ainda na certificação da origem de espécimes comercializadas por criadores (Frankham, 2008).

A biodiversidade e a variabilidade genética de uma espécie além de serem muito importantes para a sua evolução, pois é a base em que se fundamenta a seleção natural que atua sobre as variantes ocorrentes dentro das populações em função da adaptação ao ambiente. Também pode ser usada para verificar afinidades e os limites entre as espécies, para estimar níveis de migração e dispersão nas populações, e para detectar modos de reprodução e estrutura familiar (Viana, 2005). Atualmente, esta variabilidade pode ser analisada a partir de numerosas técnicas disponíveis que utilizam marcadores moleculares.

1.5 Marcadores Moleculares

Diversos marcadores moleculares estão disponíveis, sendo que cada um deles apresenta características próprias que os tornam mais adequado ao tipo de trabalho realizado. Marcadores moleculares, muitas vezes utilizados em genética da conservação incluem impressões digitais de DNA, fragmentos de restrição do polimorfismo (RFLP) do sequenciamento genético, análise mitocondrial e nuclear, e genotipagem de diferentes loci nucleares, como microssatélites e polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados (AFLPs) (Aitken et al. , 2004). Junto com essas ferramentas moleculares, que podem incluir polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) e, mais recentemente, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs).

A utilização de marcadores genéticos transmitidos uniparentalmente como o DNA mitocondrial, por exemplo, que nos animais é considerado quase exclusivamente de herança materna, é muito útil por fornecer dados sobre a evolução e dispersão dos organismos. Devido a seu predominante modo de herança materna (Huntchison *et al.*, 1974; Avise, 1986), o número efetivo de genes do genoma mitocondrial corresponde a um quarto do nuclear, levando a mais rápida taxa de diferenciação genética através da

deriva (Birky *et al.*, 1983). A divergência genética é também aumentada pela maior taxa de evolução de sequências (pelo menos em vertebrados), particularmente dentro de uma porção hipervariável do genoma mitocondrial, a região controle, em comparação aos genes codificantes do DNA nuclear (Brown *et al.*, 1979; Brown, 1983; Moritz *et al.*, 1987). Estas propriedades também facilitam a reconstrução de relações filogenéticas entre os haplótipos do DNA mitocondrial, que podem ser comparadas a sua atual distribuição geográfica para identificar os processos que definem a estrutura genética entre populações (Avise *et al.*, 1987; O'Corry-Crowe *et al.*, 1997).

1.6 DNA mitocondrial e Região Controle (*D-loop*)

A mitocôndria é uma organela encontrada na maioria dos eucariontes, possui 13 genes codificadores de proteína que são 90% do genoma, 22 genes codificadores de RNAs de transferência, dois genes codificadores de RNAs ribossômicos e uma região não codificadora chamada região controle (AVISE *et al.*, 1986).

O DNAm_t é muito utilizado devido à facilidade em isolá-lo, ao grande número de cópias por célula, seu tamanho pequeno, sua organização simples, por não ser recombinante (Avise *et al.*, 1984; Hayashi *et al.*, 1985) e por sua suposta herança materna (a mitocôndria paternal parece ser ativamente degradada durante a fertilização) e uniclonal (Hutchinson *et al.*, 1974; Giles *et al.*, 1980; Waughn *et al.*, 1980; Avise, 1986, 1994). A herança materna gera hipóteses que refletem a filogenia das fêmeas de uma população, sendo útil, por exemplo, no estudo da movimentação de fêmeas em populações naturais de uma espécie (Lasman *et al.*, 1981; Avise *et al.*, 1984). A alta taxa de mutação ainda permite que o DNA mitocondrial seja utilizado para inferir relações filogenéticas entre populações ou espécies com tempos de divergência relativamente recentes entre milhares e alguns milhões de anos (Brown *et al.*, 1979).

A região controle, uma das poucas regiões não codificadoras do genoma mitocondrial, está localizada entre as regiões codificadoras do RNA transportador da prolina e do RNA transportador da fenilalanina. Esta região é chamada de *D-loop* (*displacement loop structure*) ou alça D e nela estão os sítios de iniciação da replicação da fita pesada (H) e os promotores de transcrição das fitas leve e pesada. Possui uma taxa de evolução de duas a cinco vezes maiores 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 têm sido muito utilizado em estudos populacionais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Análise e comparação da diversidade genética em três populações naturais de *Podocnemis unifilis* da Amazônia Brasileira, utilizando como marcador molecular a Região Controle do DNA Mitocondrial.

2.2 Objetivos específicos

Determinar os níveis de variabilidade genética em populações de *Podocnemis unifilis* provenientes da Reserva Biológica de Trombetas, do lago da Usina Hidrelétrica (UHE) de Tucuruí e Santarém; Comparar a diversidade genética da população de Tucuruí com as populações de Santarém e Trombetas; Verificar a ocorrência de populações geneticamente estruturadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do Material

Foram coletadas para estudo amostras de sangue de 88 espécimes de *P. unifilis*, sendo provenientes de cada uma das três localidades amostradas: Rio Trombetas (Rebio Trombetas) 30 amostras, Rio Amazonas (Santarém) 28 amostras e Rio Tocantins (lago da UHE de Tucuruí) 30 amostras.

O método utilizado para a coleta de sangue foi a punção da veia femoral utilizando seringa de 1ml. Foram coletados cerca de 100 µl de sangue os quais foram armazenado-os em microtubos tipo *eppendorfs* contendo 500 µl de etanol absoluto. Após a retirada de sangue, os filhotes foram libertados no seu local de origem de onde foram capturados. As amostras de sangue foram depositadas na Coleção de Tecidos de Genética Animal (CTGA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).



Figura 2. Mapa das localidades amostradas: Rio Trombetas (Rebio Trombetas), Rio Amazonas (Santarém) e Rio Tocantins (Tucuruí).

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método CTAB (Doyle e Doyle, 1987), com algumas modificações. A eficácia da extração e a concentração do DNA foram verificadas através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Neste procedimento, foram utilizados 2 μ L do DNA extraído juntamente com 2 μ L de azul de bromofenol. O gel foi corado com Gelred e após o término da corrida, observado documentado em transluminador de luz ultravioleta VDS.

3.3 Amplificação *in vitro* via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas via PCR em tubos eppendorf de 0,2 mL sendo as concentrações de cada componente as seguintes: 1,5 μ L de tampão 10X ;

1,5 µL de dNTPs (25 mM); 1,5 µL de cloreto de magnésio (25mM); 1,5µL do *Primer Forward* PRO (5'- CCCATCACCCACTCCCAAAGC-3') e do 1,5 µL *Primer Reverse* 12SR5 (5'-GTCAGGACCATGCCTTTGTG-3') ambos à 2 mM; 0,4 µL de DNA Taq polimerase à 1U/µL e 1,0 µL do DNA genômico de cada indivíduo com concentrações variando de 10 – 100 ng/µL. O volume final foi ajustado para 15 µL de reação com água deionizada autoclavada. O programa de amplificação teve os seguintes perfis de temperatura: 92°C por um minuto; seguidos por 35 ciclos de 92°C (1 minuto), 55° C (35 segundos), 72°C (1 minuto 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 2 µL do produto amplificado de cada reação em gel de agarose 0,8 %, e 2µL 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 se o tamanho do fragmento amplificado.

3.4 Purificação do material

A purificação 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, e foi realizada com polietileno glicol (método mais econômico). Este DNA purificado foi utilizado na reação de sequência.

3.5 Reação de sequência

A reação de sequência também foi realizada através da técnica de PCR na qual o volume final de cada reação foi obtido com os seguintes componentes: 2 µL do *primer forward* (F) ou *reverse* (R), 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 à 50 °C, para o anelamento dos *primers* e 1 minuto à 60 °C para a extensão da região a ser sequenciada.

Após o término da PCR de sequenciamento, o produto foi precipitado de acordo com o seguinte protocolo: Adicionou-se à placa com o material amplificado 1 µL de acetato de amônio 7,5 mM e 27,5 µL de etanol absoluto (100% de pureza) a placa foi agitada no vortex e centrifugada por alguns segundos (*spin down*). Incubou-se a temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida centrifugou-se em centrífuga refrigerada por 45 minutos. Eliminou-se o álcool por inversão da placa e acrescentou-se 120 µL de etanol 70%. Centrifugou-se por 15 minutos e o álcool foi eliminado por inversão da placa. Em seguida centrifugou-se com a placa invertida em um papel toalha um *spin* à 700 RPM. Deixou-se secar em temperatura ambiente e depois de seco foi acrescentado 10 µL de *Loading buffer* (presente no kit de sequenciamento). Após a precipitação o material estava pronto para ser sequenciado.

3.6 Sequenciamento

Para a obtenção das sequências nucleotídicas finais, O DNA purificado foi submetido por eletroinjeção a uma eletroforese capilar em gel de poliacrilamida no sequenciador automático ABI, seguindo a metodologia padrão do fabricante.

Após o sequenciador automático gerar as sequências nucleotídicas de cada reação, estas foram conferidas e editadas no programa BioEdit, a fim de que fossem estabelecidas as sequências individuais finais. As sequências foram alinhadas utilizando a ferramenta Clustal W do referido programa gerando uma matriz de dados contento sequências de todos os indivíduos estudados. Após este processo foram feitas as análises estatísticas e moleculares.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O banco de dados para análises de populações foi composto de 45 sequências nucleotídicas com um total de 544 pares de bases cada. A composição média de bases nucleotídicas deste fragmento parcial foi de: 29,61% de Citosina, 32,93% de Timina, 24,18% de Adenina e 13,27% de Guanina. A partir de todas as sequências analisadas verificou-se que 516 sítios foram monomórficos e apenas 28 foram polimórficos. Dentre os sítios variáveis, 26 corresponderam a mutações do tipo transição e duas do tipo transversão.

Utilizando o programa TCS (Clement *et al.*, 2000) as sequências de DNA dos indivíduos coletados na REBIO Trombetas (rio Trombetas), no lago da UHE de Tucuruí (rio Tocantins) e nas proximidades de Santarém (rio Amazonas) foram plotadas em uma matriz de dados que foi utilizada para estimar um cladograma intra-específicos de haplótipos (Figura 3). 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).

Neste cladograma foram definidos 14 haplótipos, e destes, o mais comum foi (258Tr) com 12 indivíduos somente da localidade de Trombetas, o segundo mais comum (594Tu) possui 6 indivíduos apenas de Tucuruí. Estes dois haplótipos juntos equivalem a aproximadamente 40% do total de haplótipos identificados. Também foram encontrados haplótipos raros ou *singletons* e alguns *missing haplotype*.

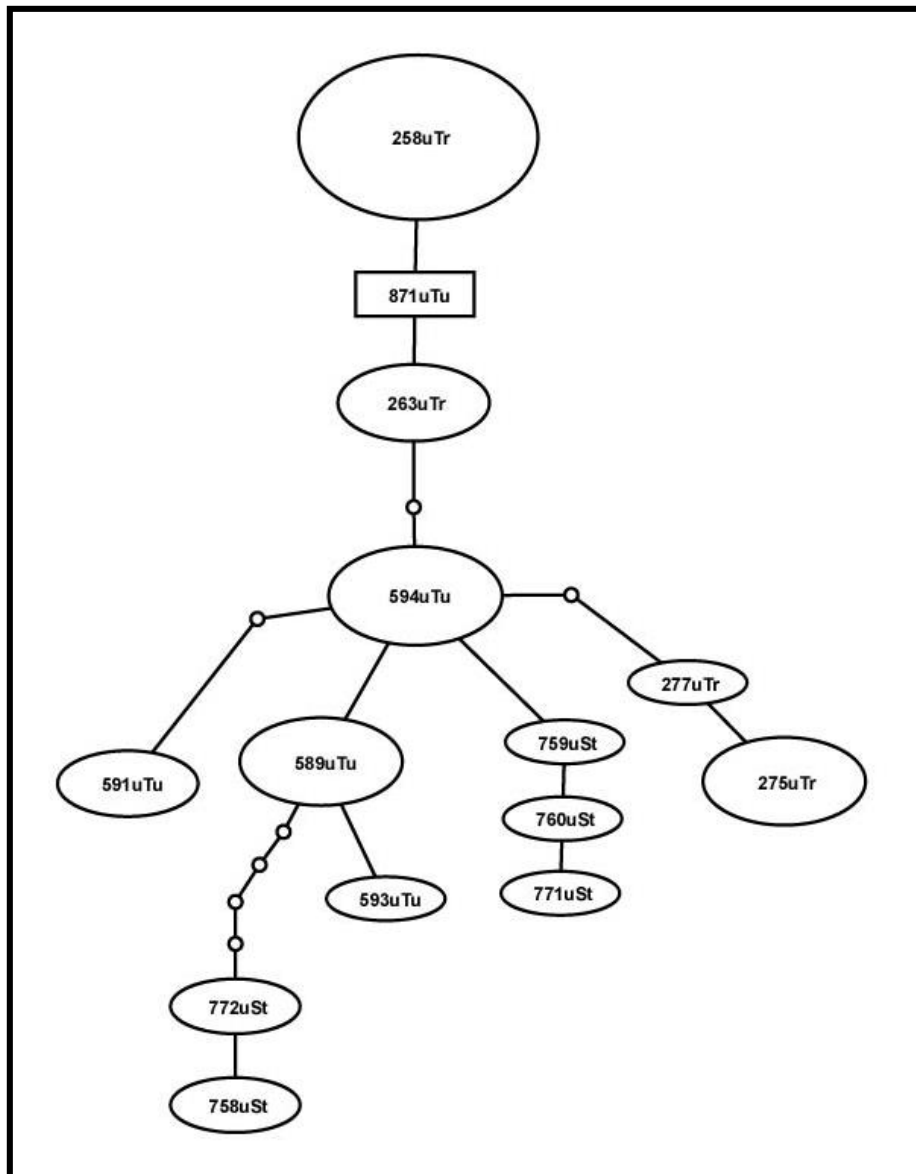


Figura 3. Cladograma dos 14 haplótipos identificados em *P. unifilis*.

Os níveis de variabilidade genética estimados com base nos parâmetros genéticos e na análise de polimorfismo de DNA estão sumariados na Tabela 1. A média da diversidade gênica (H) total foi estimada em 0,7577. Os valores individuais encontrados para as localidades analisadas foram 0,9333 no rio Amazonas, na localidade de Santarém, 0,5731 no rio Trombetas, na Reserva Biológica de Trombetas e 0,7667 no rio Tocantins, em Tucuruí. A diversidade nucleotídica média observada quando reunidas todas as localidades amostradas foi de 0,006429 e os valores individuais foram 0,005461 no rio Trombetas, na Reserva Biológica de Trombetas, 0,010825 no rio Amazonas, em Santarém e 0,003002 no rio Tocantins, na localidade de Tucuruí. Estas

estimativas de polimorfismo genético indicam diferentes níveis de variabilidade genética ao longo da área de estudo desta espécie.

Os valores resultantes dos testes de neutralidade seletiva de mutações indicam que as localidades estão em equilíbrio genético com relação aos haplótipos do DNA mitocondrial (Tabela 1). O Teste *D* de Tajima não foi significativo ($P < 0,05$) para as localidades. O *F_s* de Fu também não mostrou desvio significativo da expectativa neutra das mutações. Estes testes estatísticos foram desenvolvidos sob as premissas da teoria neutra de mutações e baseiam-se no modelo de sítios infinitos sem recombinação (KIMURA, 1969), apropriado para sequências de DNA. Portanto, como não foram encontrados desvios significativos, os dois testes estatísticos indicam que as populações estudadas estão em equilíbrio genético.

Tabela 1. Parâmetros genéticos para *Podocnemis unifilis*,

NOTA: Nível de significância $P < 0,05$; Trombetas = Rio. Trombetas, Tucuruí = Rio

| Populações | N | Número de Haplótipos | Diversidade Gênica | Diversidade Nucleotídica (por sítio) | Teste D deTajima | Teste <i>F_s</i> de Fu |
|------------|----|----------------------|--------------------|--------------------------------------|------------------|----------------------------------|
| Trombetas | 19 | 4 | 0.5731 +/- 0.1101 | 0.005461 +/- 0.003338 | 1.61331 | 3.02750 |
| Tucuruí | 16 | 5 | 0.7667 +/- 0.0656 | 0.003002 +/- 0.002093 | -0.33101 | -0.20005 |
| Santarém | 10 | 7 | 0.9333 +/- 0.0620 | 0.010825 +/- 0.006388 | 0.50957 | -0.34992 |

Tocantins; Santarém = Rio Amazonas.

As análises de expansão populacional e polimorfismo do DNA foram realizados no programa Arlequin (Schneider *et al.*, 2001). As Análises de Variância Molecular (AMOVA) revelaram a existência de forte subdivisão populacional ($F_{ST} = 0.33356$; $P < 0,001$). Os resultados mostraram que 33.36% da variância total ocorrem entre as populações, enquanto a maior variação genética foi atribuída à variância dentro das amostras populacionais (66.64%).

Para verificar se existe isolamento por distância foi realizado o teste de Mantel. Na análise foram inseridas as três populações amostradas. Os valores indicaram que a

diversidade genética não está sendo influenciada pela distância geográfica entre as localidades ($r = 0.811434$, $P = 0.335000$).

Embora o fluxo gênico, estimado pelo número de migrantes por geração (Nm), observado entre as localidades de Trombetas e Santarém e entre Tucuruí e Santarém apresentem valores maiores que um estas populações estão diferenciadas. Este pequeno fluxo gênico pode indicar resquícios de eventos ocorridos no passado.

Tabela 2. Estimativa indireta de fluxo gênico (Nm) (acima da diagonal e à direita) e diferenciação genética (st) (abaixo da diagonal e à esquerda) entre os pares de populações de *P. unifilis*.

| Localidades | Trombetas | Tucuruí | Santarém |
|-------------|-----------|-----------|----------|
| Trombetas | - | 0.65287 | 1.11182 |
| Tucuruí | 0.76585** | - | 1.93478 |
| Santarém | 0.44971** | 0.25843** | - |

NOTA: ** Nível de significância $P < 0,001$ (após a correção de Bonferroni); Trombetas = Rio. Trombetas, Tucuruí = Rio Tocantins; Santarém = Rio Amazonas.

A diferenciação genética encontrada na população do lago da UHE de Tucuruí (rio Tocantins), do pode ter sido ocasionada pelo represamento da área alagada durante a construção da Usina. Certamente o represamento da água contribuiu para o isolamento da população adaptada às corredeiras e que migrava livremente ao longo do rio.

Uma nova análise foi realizada também utilizando o DNA Mitocondrial como marcador molecular com 88 indivíduos de *P. unifilis* provenientes da bacia do rio Amazonas nas localidades de Terra Santa, Parintins e Santarém, e do rio Tocantins no lago da represa de Tucuruí. A diversidade gênica média (\hat{H}) e a diversidade nucleotídica média (I) apresentaram valores consideráveis, 0,76 e 0,0068 respectivamente.

Os valores do índice de fixação, Φ_{ST} foram significativos para as localidades do Trombetas e Tucuruí nas comparações com todas as localidades, Terra Santa e Parintins (nas comparações entre si), que evidenciaram também limitado fluxo gênico (Nm); apenas para as comparações que envolveram a população de Santarém (rio Amazonas) este índice não foi significativo. Tais resultados corroboram os encontrados anteriormente e demonstram que as populações de Trombetas e Tucuruí são diferenciadas geneticamente das demais.

No caso da diferenciação genética encontrada entre as populações de Parintins e Terra Santa, esta fornece suporte para a hipótese do rio Amazonas atuar como uma barreira física eficiente limitando o fluxo gênico de indivíduos de *P. unifilis* entre as populações.

Nesta nova análise também foi realizado o teste de Mantel para verificar se existe isolamento por distância. Na análise foram inseridas as cinco populações amostradas. Os valores indicaram que a diversidade genética não está sendo influenciada pela distância geográfica entre as localidades ($r = 0.210851$, $P = 0.380000$).

Outros estudos realizados com espécies do gênero *Podocnemis* também mostraram resultados semelhantes aos encontrados para estas populações.

Para estimar estrutura genética das populações de irapuca (*Podocnemis erythrocephala*), Cardoso (2008) utilizou o DNA mitocondrial e detectou forte influência da estrutura geomorfológica (cachoeiras, corredeiras e rios como barreira ao fluxo gênico) da bacia do rio Negro e do rio Amazonas sobre a diferenciação genética em três das dez localidades estudadas.

Canton (2010) utilizou o marcador mitocondrial para caracterizar geneticamente populações de *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* nos rios Madeira e Guaporé. Os resultados indicaram que pode estar ocorrendo um isolamento por distância entre as populações mais afastadas de *P. unifilis* pelo fato do tracajá, diferentemente das suas congêneres, não migrar por longas distâncias. Também se atribuiu a estruturação genética entre duas populações localizadas em lados opostos em relação ao rio Amazonas, apesar de geograficamente próximas, este pode atuar como uma barreira física eficiente para isolar estas populações de tracajá.

Também utilizando o DNA mitocondrial para análise genético-populacional de *Podocnemis sextuberculata* na calha do rio Juruá, Sotero (2011) não encontrou populações geneticamente estruturadas. Considerando o fato de essas localidades estarem na calha de um mesmo rio, mesmo este tendo uma grande extensão, não oferece barreiras que impeçam o fluxo gênico. Além disso, o comportamento migrador que esta espécie apresenta confirma este resultado que já era esperado.

Utilizando DNA microssatélites como marcador molecular, Escalona 2008, fez uma análise da estrutura genética populacional de *P. unifilis* nas localidades da Venezuela, Colômbia, Peru e Brasil. Foi encontrada uma correlação positiva entre divergência genética e distância geográfica, pois é evidente o isolamento por distância entre as bacias do Orinoco e Amazonas. A migração parece ocorrer pelas florestas

inundadas em algumas drenagens, e por canais de rios que podem ter barreiras geográficas que impedem dispersão entre bacias ou até entre tributários próximos da mesma base. Evidência de declínio populacional foi encontrada apenas na população do Brasil, e outro teste indicou forte evidência de recentes reduções no tamanho populacional em quase todas as localidades.

5. CONCLUSÃO

Segmentos mitocondriais têm emergido como uma importante escolha para estes estudos por que podem medir o atual nível de fluxo gênico entre populações e espécies, distinguir taxas de migração através de panmixia e estimar a variabilidade genética intra e interpopulacionais. Estas informações são de grande importância para planos de manejo e conservação de espécies ameaçadas.

A utilização da região controle do DNA mitocondrial (*D – loop*), mostrou-se eficiente para estimar a variabilidade genética das populações da *P. unifilis*.

As análises com as três populações, objeto deste estudo e as análises incluindo mais duas populações próximas da área de estudo, indicaram estruturação genética para as populações de Trombetas e Tucuruí.

Estudos como este podem servir como referência para futuros projetos de manejos com tracajá. Quando as populações são consideradas semelhantes do ponto de vista genético é possível escolher uma região mais acessível, para proteção e soltura de animais na natureza que forem apreendidos pelos órgãos competentes durante as fiscalizações de pesca ilegal. Esta medida permite poupar despesas com transportes e com as informações do status genético das populações não se corre o risco de colocar esses animais em um ambiente ao qual não estariam adaptados. Porém quando uma espécie apresenta populações geneticamente estruturadas, estas devem receber atenção diferenciada no manejo para que se possam preservar as adaptações características para cada região.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avise, J.C.; Niegel J.E.; Arnold, J. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, 20: 99-105.
- Avise, J.C.; Arnold, J.; Ball, R.M. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecological Systematics* 18:489-522.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, London.
- Birky, C.W.Jr.; Maruyama, T.; Fuerst, P. 1983. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondrial and chloroplast, and some results. *Genetics* 103:513-527.
- Branco, S. M. O desafio Amazônico. 1997. 17ª Edição. São Paulo: Editora Moderna, Coleção Polêmica.
- Brown, W.M.; George, M.J.R.; Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 1967-1971.
- Clement, M.; Posada, D.; Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9:16567-1659.
- Crandall, K.A.; Bininda-Emonds, O.R.P.; Mace, G.M.; Wayne, R.K. 2000. Considering evolutionary process in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 15:290-295.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13 – 15.
- Escalona, T. 2008. Population genetics of the endangered South American freshwater turtle, *Podocnemis unifilis*, inferred from microsatellite DNA data. Springer Science. *Conserv Genet* (2009) 10:1683–1696.

Hutchison, C.A.; Newbold, J.E.; Potter, S.S., Edgell, M.H. 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 251: 536-538.

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.

Lasman, R.A.; Shade, R.O.; Shapira, J.F.; Avise, J.C. 1981. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. *J. Mol. Evol.*, 17: 214-226.

Pough, F.H.; Janis, C.M.; Heiser, J.B. 2003. A Vida dos Vertebrados. 3ª ed. São Paulo: Atheneu Editora.

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

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

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

Pritchard, P. C. H.; Trebbau, P. The Turtles of Venezuela. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ann Arbor, MI. 1984.

Vogt, R. C, 2008. Tartarugas da Amazônia. Gráfica Biblos.

Schneider, S.; Roessli, D. E 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, D.; Duperchy, E.; Coursange, E.; Lenski, R.E.; Blot, M. 2000. "Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IX. Characterization of Insertion Sequence-mediated mutations and rearrangements" *Genetics* 156: 477-488.

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