

**MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE  
ESTAÇÃO ECOLÓGICA JUAMI-JAPURÁ  
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA-PIBIC/ICMBio**

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE  
QUELÔNIOS DO GÊNERO *PODOCNEMIS*, DO ENTORNO DA ESTAÇÃO  
ECOLÓGICA JUAMI-JAPURÁ, AM.**

**Cristiane Gomes de Araújo  
Orientador: Júlio César Rocha Costa**

**TEFÉ  
2º SEMESTRE/2011**

## RESUMO

São poucos os estudos com filhotes de quelônios na Amazônia, sendo necessários, além dos dados ecológicos, informações sobre a estrutura e variabilidade genética das espécies para dar suporte adequado aos programas de manejo realizados pelos agentes de praia e pesquisadores, para a efetiva conservação das espécies. O objetivo foi caracterizar a variabilidade genética intra e inter populacional e verificar a existência de populações geneticamente diferenciadas em populações naturais de *Podocnemis sextuberculata* e de *Podocnemis unifilis* provenientes do entorno da Estação Ecológica Juami-Japurá (EEJJ). Foram aleatoriamente selecionados 19 ninhos de tracajá e 30 ninhos de iacá de duas diferentes praias. De cada ninho foram aleatoriamente selecionados dois filhotes para a coleta de 100 $\mu$ L de sangue, totalizando 38 filhotes de tracajá e 60 filhotes de iacá. Os sangues foram estocados em tubos eppendorf contendo álcool etílico absoluto, e posteriormente foram feitas as extrações e amplificação de DNA por PCR. A partir das nove sequências analisadas verificou-se que quatro foram polimórficas. Dentre os sítios variáveis, dois corresponderam a mutações do tipo transição e dois do tipo transversão. As sequências nucleotídicas obtidas são compostas por 312 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*), as quais foram agrupadas em quatro diferentes haplótipos. A diversidade gênica média ( $\hat{H}$ ) e a diversidade nucleotídica média ( $\hat{I}$ ) apresentaram valores consideráveis, 0,583 e 0,0039, respectivamente. Os testes de neutralidade  $F_s$  de Fu e D de Tajima apresentaram resultados que sugerem que a população de tracajá analisada encontra-se em equilíbrio genético.

## ***ABSTRACT***

There are few studies of young turtles in the Amazon, are needed in addition to ecological data, information on the structure and genetic variability of the species to give adequate support to management programs carried out by staff researchers and beach for the effective conservation of species . The objective was to characterize the genetic variability within and between populations and verify the existence of genetically differentiated populations in natural populations of *Podocnemis sextuberculata* and *Podocnemis unifilis* from the surroundings of the Ecological Station Juami-Japurá (EEJJ). We randomly selected 19 nests of tracajá nests and 30 iaçá two different beaches. Of each nest were randomly selected two puppies to collect 100 mL of blood, totaling 38 pups tracajá and 60 pups iaçá. The bloods were stored in eppendorf tubes containing absolute ethyl alcohol, and then were made of DNA extraction and PCR amplification. From the nine sequences analyzed it was found that four were polymorphic. Among the variable sites, two corresponded to mutations for two of the transition and transversion type. The nucleotide sequences obtained are composed of 312 base pairs of mitochondrial DNA control region (D-loop), which were grouped into four different haplotypes. The average gene diversity (H) and average nucleotide diversity ( $\Pi$ ) showed significant values, 0.583 and 0.0039, respectively. Fs neutrality tests Fu and D Tajima presented results that suggest that the turtle population is analyzed in genetic equilibrium.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Mapa das localidades amostradas na calha do rio Japurá, situadas próximas a principal entrada para a ESEC Juami-Japurá, AM (Praias Juami e Juamizinho).....	<b>9</b>
<b>FIGURA 2.</b> Coleta de sangue em filhote através da punção da veia femoral.....	<b>10</b>
<b>FIGURA 3.</b> Filhote de <i>Podocnemis sextuberculata</i> sendo liberado em seu habitat natural.....	<b>10</b>
<b>FIGURA 4.</b> Extração de DNA de filhotes de quelônios em gel de agarose 0,8%.....	<b>15</b>
<b>FIGURA 5.</b> Sequências nucleotídicas obtidas das nove amostras analisadas de <i>P. unifilis</i> .....	<b>16</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>5</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
2.1- Área de estudo.....	8
2.2- Amostragem.....	8
2.3- Coleta de sangue.....	9
2.4- Extração de DNA.....	10
2.5- Amplificação <i>in vitro</i> via PCR.....	12
2.6- Purificação do material.....	12
2.7- Reação de sequência.....	13
2.8- Sequenciamento.....	14
2.9- Análises de polimorfismos genéticos.....	14
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>18</b>
<b>6. AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>18</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>19</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Podocnemis* que ocorrem no Brasil estão amplamente distribuídas pela bacia Amazônica (Pritchard & Trebbau, 1984). Das cinco espécies do gênero, três (*P. expansa*, *P. unifilis*, *P. sextuberculata*) ocorrem na Estação Ecológica Juami-Japurá, AM.

Estes animais possuem a maior expectativa de vida entre os vertebrados, sendo que as espécies terrestres podem ultrapassar os cem anos. A maior parte do desenvolvimento biológico destes animais só ocorre durante os primeiros cinco a dez anos de existência e, segundo pesquisas, a maturidade sexual só acontece aproximadamente entre quatro a sete anos de vida para os machos, e entre onze a quinze anos para as fêmeas (Viana, 2005).

*Podocnemis unifilis*, conhecida popularmente como tracajá (fêmea) e zé prego (macho), possui a carapaça cinza escura quando molhada. Apresenta as patas curtas e cobertas com pele rugosa, cabeça achatada e cônica, de pequeno tamanho em relação ao corpo. Os olhos, bastante juntos, são separados por um sulco. A fêmea adulta pesa em torno de oito quilos e mede cerca de 38 cm (Pritchard & Trebbau, 1984). É uma tartaruga essencialmente aquática. A espécie pode ser encontrada nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco e seus afluentes. No norte da América do Sul, ocorre em rios de água preta, clara e branca bem como em lagos e reservatórios (Pritchard & Trebbau, 1984; Iverson, 1992).

Quanto à alimentação, esta espécie é considerada generalista, sendo predominantemente herbívora, ingerindo macrófitas aquáticas como aguapés e gramíneas; e em algumas ocasiões, moluscos e frutos que caem durante a estação chuvosa. No entanto, em cativeiro segundo Fachín-Terán et al. (1997), a dieta desta

espécie é onívora, tornando-se melhor adaptada a este tipo de ambiente, em relação a *P. expansa*, a tartaruga-da-amazônia.

As fêmeas de *P. unifilis* não formam agregações de nidificação, e desovam em praias arenosas, barrancos às margens dos rios e lagos, e outra grande variedade de substratos (Rueda-Almonacid et al., 2007).

*Podocnemis sextuberculata* é conhecida popularmente como iaçá, pitiú ou cambéua (Smith, 1979). A carapaça tem coloração que vai de marrom-clara a marrom-escura. O plastrão nos indivíduos jovens apresenta seis tubérculos de cor cinza ou marrom, os quais conferem o nome à espécie, *P. sextuberculata*. O dimorfismo sexual é caracterizado pela presença de manchas amarelas com um par de barbelos logo abaixo da boca dos machos. Além disso, as fêmeas são maiores.

Sua distribuição geográfica abrange a drenagem do rio Amazonas no Brasil, Peru e Colômbia (Ernst & Barbour, 1989; Iverson, 1992). No Brasil é encontrada em rios de água barrenta como Solimões, Japurá e Branco; e em rios de água clara como Trombetas e Tapajós (Cantarelli & Herde, 1989). Na Reserva Sustentável de Mamirauá-RDSM, é encontrada em águas pretas e barrentas, nos canais dos rios, paranás, ressacas e lagos, sendo relativamente abundante e constituindo uma importante fonte alimentar para a população local (Fachín, 1999).

A alimentação é predominantemente de matéria vegetal, tendo como principal componente as sementes. Fachín (1999), estudando conteúdo estomacal desta espécie encontrou 86,81% de sementes e quantidades mínimas de insetos e restos de peixes como escamas e nadadeiras, isto indica que esta espécie é principalmente herbívora e esporadicamente carnívora.

*Podocnemis sextuberculata* desova a noite, em pequenos grupos formados por 3 ou 4 fêmeas, durante o verão (outubro a dezembro) e deposita em média 16 ovos,

podendo variar entre 6 a 25 ovos. Seleciona praias arenosas largas e amplas para desovar, e em uma mesma noite podem subir até 40 fêmeas para nidificar na mesma praia (Rueda-Almonacid et al., 2007).

São poucos os estudos com filhotes de quelônios em diversas regiões amazônicas, e a dificuldade está no fato de não se saber o destino exato dos animais após a saída dos ninhos. Em adição aos dados ecológicos, são necessárias informações sobre estrutura e variabilidade genética para dar suporte adequado aos programas de manejo realizados pelos agentes de praia e pesquisadores, para a efetiva conservação das espécies. A variabilidade gênica de uma espécie além de ser muito importante para a sua evolução, por se a base fundamental da seleção natural que atua sobre as variantes ocorrentes dentro das populações em função da adaptação ao ambiente, também pode ser usada para verificar as afinidades e os limites entre as espécies, estimar níveis de migração e dispersão nas populações, e detectar aspectos reprodutivos e de estrutura familiar (Viana, 2005).

O DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) é considerado importante no estudo de variabilidade genética devido está presente em grande quantidade em todas as células (entre 1.000 e 10.000 moléculas de DNAm<sub>t</sub> por célula), o que lhe confere um menor risco de degradação em relação ao DNA nuclear. O fato de estar protegido por uma membrana o torna extremamente importante quando do estudo de espécimes biológicos antigos, cujo DNA nuclear, em cópia única, em geral, encontra-se degradado. O DNAm<sub>t</sub> confere portanto uma maior taxa de evolução do que os genes codificadores de proteínas do DNA nuclear (Brown et al., 1982). Sua ampla utilização é também justificada devido à facilidade em isolá-lo, ao grande número de cópias por célula, seu tamanho pequeno, sua organização simples e por não ser recombinante (Avisé et al., 1984; Hayashi et al., 1985). Desta forma, as técnicas que utilizam o DNAm<sub>t</sub>



contribuem para o conhecimento e a manutenção da integridade genética de subunidades populacionais ou populações locais, e informações sobre preservação e manejo da espécie.

Esse estudo tem como objetivos caracterizar e analisar a variabilidade genética intra e inter populacional e verificar a existência de populações geneticamente diferenciadas em populações naturais de tracajá e de iaçá provenientes do entorno da Estação Ecológica Juami-Japurá (EEJJ).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1- Área de estudo**

A Estação Ecológica Juami-Japurá está localizada no estado do Amazonas, a oeste da Amazônia Ocidental, no interflúvio dos rios Solimões e Japurá, e engloba toda a bacia do rio Juami, que é um dos afluentes da margem direita do rio Japurá. Localizada no município de Japurá, a estação ocupa uma área de 870.300ha, estando inserida na ecorregião do Interflúvio Solimões – Japurá (Dinerstein et al, 1995). Esta é caracterizada por Floresta Tropical Densa, composta por um mosaico de paisagens distintas: campinas, campinaranas, igapós, florestas de transição entre várzea do rio Japurá e o igapó do rio Juamí, e florestas de terra firme. A região é entrecortada por um complexo sistema de igarapés, canais e lagos interligados. De acordo com classificação de Sioli (1991), o rio Juami é do tipo de água preta, que caracteriza rios com estabilidade relativa dos leitos e pequena incidência de erosão fluvial.

### **2.2- Amostragem**

Foram aleatoriamente selecionados 19 ninhos de *P. unifilis* (tracajá) (Praia de proteção – 15 ninhos; Praia do Juamizinho – 4 ninhos) e 30 ninhos de *P. sextuberculata*

(iaçá) (Praia de proteção – 13 ninhos; Praia do Juamizinho – 17 ninhos). Dois filhotes por ninho foram aleatoriamente selecionados para a coleta de sangue, totalizando, portanto 38 filhotes de tracajá e 60 filhotes de iaçá. As duas praias amostradas estão situadas no entorno da ESEC Juami-Japurá, AM (**Figura – 1**).



**Figura 1.** Mapa das localidades amostradas na calha do rio Japurá, situadas próximas a principal entrada para a ESEC Juami-Japurá, AM (Praias Juami e Juamizinho).

### 2.3- Coleta de sangue

O método utilizado para a coleta de sangue foi através da punção da veia femoral utilizando seringas descartáveis de insulina (**Figura - 2**), coletando-se aproximadamente cerca de 100 $\mu$ L de sangue de cada indivíduo e armazenando as amostras em tubos eppendorf de 1,5mL contendo 500 $\mu$ L de álcool etílico absoluto. Em seguida, os tubos foram rotulados com os dados de campo, refrigerados e depositados na Coleção de Tecidos de Genética Animal (CTGA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), até a realização do processo de extração do DNA mitocondrial e

amplificação por via PCR. Após a coleta de sangue todos os filhotes foram devolvidos ao seu hábitat natural (**Figura – 3**).



**Figura 2.** Coleta de sangue em filhote através da punção da veia femoral.



**Figura 3.** Filhote de *Podocnemis sextuberculata* sendo liberado em seu habitat natural

#### 2.4- Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com sucesso pelo método CTAB (Doyle & Doyle, 1987) para todas as mostras. De acordo com o protocolo de extração de DNA do Laboratório de Bioquímica Molecular da Universidade Federal do Estado Amazonas - UFAM, primeiramente foi retirada uma pequena quantidade de sangue de cada amostra e colocada em microtubos *ependorfs* de 1,5mL. Em seguida adicionou-se 500 $\mu$ L de solução CTAB, responsável pelo rompimento das membranas celulares e conseqüentemente liberação do DNA. Foi adicionado 4 $\mu$ L de RNase, homogeneizou-se sem movimentos bruscos por 5min, as amostras foram encubadas por 30 min a 37°C, para ação da RNase, e logo após esse procedimento foi adicionado 5 $\mu$ L de Proteinase K. Novamente homogeneizou-se por mais 5 min e foram encubadas a 55°C por 60 minutos, agitando os tubos a cada 10 minutos para homogeneizar a solução, pois o aumento da temperatura provoca desnaturação das proteínas e facilita a solubilização das membranas celulares, o favorece a atuação da Proteinase K. Após esse procedimento, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente, adicionou-se

500µL de Clorofórmio/Álcool Isoamílico na proporção 24:1 e misturou-se suavemente por inversão durante 5 minutos. O clorofórmio é um agente desproteinizador. A mistura de clorofórmio/Álcool Isoamílico é utilizada para definir duas fases após a centrifugação: uma que contém ácidos nucleicos (aquosa) e outra contendo proteínas, polissacarídeos e pigmentos (orgânica). O álcool isoamílico também é utilizado para reduzir a espuma formada no processo de desnaturação. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10min, para definir as duas fases. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo identificado e adicionou-se 400 µL de Isopropanol 100%, que foi resfriado e suavemente misturado por inversão durante 2 minutos para que as nuvens de DNA fossem observadas. O isopropanol é utilizado para precipitar o DNA, pois compete por suas moléculas de água, tornando-o insolúvel. Em seguida o material foi incubado a -20°C por 2h, para que ocorresse a precipitação. Depois desse processo foi levado novamente a centrifuga a 13.000 rpm por 15min para que o DNA ficasse visível na forma de um pequeno pellet, o sobrenadante foi descartado e inverteu-se o tubo em papel absorvente, adicionando-se 1mL de Etanol 70%, invertendo-se por 5min para lavar o pellet. O etanol é utilizado para a lavagem do DNA, ele carrega os sais que precipitam junto com as moléculas de ácido nucleico. Em seguida as amostras foram centrifugadas novamente a 13.000 rpm por 15min, após isso descartou-se o sobrenadante e inverteu-se os microtubos em papel absorvente, esperou-se secar por aproximadamente 3h em temperatura ambiente e depois de seco colocou-se 20µL de água ultra pura para diluir o pellet. A eficiência da extração e a concentração do DNA foram verificadas por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose em uma concentração de 0,8%. No preparo do gel utilizou-se 0.8g de agarose para 100 ml de tampão TEB 1X em um erlenmeyer, levado ao microondas por 2 minutos e 50s até a diluição total da agarose. Posteriormente, colocou-se em uma vasilha com água para

diminuir a temperatura até aproximadamente 50°C. Logo após despejou-se no suporte para gel e esperou-se por 30min até que a agarose polimerizasse, e em seguida foram aplicadas as amostras de DNA. Neste procedimento, foram utilizados 2µL do DNA extraído juntamente com 2µL do corante Gel Red. Após o término da corrida o gel foi observado em transluminador de luz ultravioleta VDS e fotografado.

## **2.5- Amplificação *in vitro* via 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 µL 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'/ Pearse et al., 2006) e do 1,5 µL *Primer Reverse* 12SR5 (5'-GTCAGGACCATGCCTTTGTG-3'/ Tomas Hrbek com. Pessoal) ambos à 2 mM; 0,4 µL de DNA Taq polimerase à 5 U/µL e 1,0 µL do DNA genômico de cada indivíduo a 10 – 100 ng/µL. O volume final 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; 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 2µL 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.

## **2.6- 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. Este DNA purificado foi utilizado na reação de sequência.

## 2.7- 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  $\mu\text{L}$  do *primer forward* (F) ou *reverse* (R), utilizados anteriormente na amplificação do fragmento; 4  $\mu\text{L}$  da solução do Kit de reação Dyanamic™ ET Dye Terminator; 4  $\mu\text{L}$  de DNA purificado (entre 30 –100 ng/ $\mu\text{L}$ ).

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 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 $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 7,5 mM e 27,5  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (100% de pureza), posteriormente misturou-se com o vortex e centrifugou-se 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  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. Centrifugou-se por 15 minutos e eliminou-se o álcool 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 ressuspendeu-se o material 10  $\mu\text{L}$  de *Loading buffer* (presente no kit de sequenciamento). Após a precipitação o material estava pronto para ser sequenciado.

## 2.8- Sequenciamento

Para a obtenção da sequência nucleotídica final, o DNA purificado foi submetido a uma eletroforese 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 serão conferidas e editadas no programa BioEdit, a fim de que sejam estabelecidas as sequências individuais finais. As sequências, então, foram alinhadas utilizando a ferramenta Clustal W do referido programa gerando uma matriz de dados contendo sequências de todos os indivíduos estudados. Após este processo foram feitas as análises estatísticas e moleculares.

## 2.9- Análises de polimorfismos genéticos

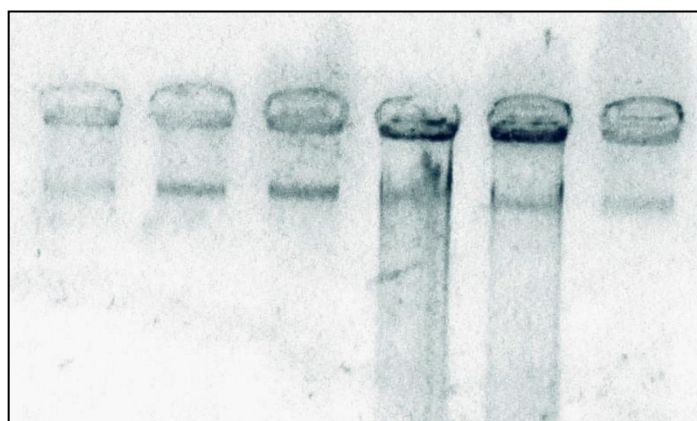
Para determinar a diferenciação e variabilidade genética entre as populações, foi realizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Schneider et al., 2000) - é uma estimativa de estrutura genética populacional similar a outras abordagens que levam em conta a variação na frequência gênica. Entretanto 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 será possível determinar o fluxo gênico através do número de migrantes.

Para testar se as mutações encontradas ao longo das sequências de DNA realmente são neutras, foram aplicados os testes de neutralidade seletiva de Tajima e Fu, que são muito utilizados em análises genéticas de populações. O teste  $D$  de Tajima, baseado no modelo dos sítios infinitos sem recombinação (Kimura, 1969) é apropriado para sequências curtas de DNA. Este modelo assume que os sítios ao longo de uma

sequência de DNA sofrem mutações independentes e irregulares e que a probabilidade de um mesmo sítio sofrer mutações duas vezes é infinitamente pequena. Todos estes testes de variabilidade genética foram realizados no programa Arlequin 2000 (Schneider et al., 2000).

### 3. RESULTADOS

Foram realizadas com sucesso as extrações de DNA para todas as amostras (Figura - 4).

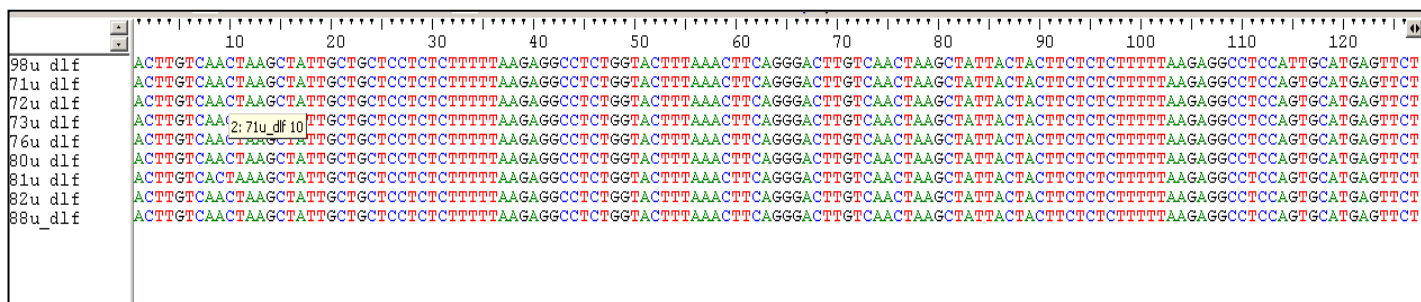


**Figura 4.** Extração de DNA de filhotes de quelônios em gel de agarose 0,8%.

As reações de PCR foram feitas para todas as amostras de *Podocnemis unifilis* e os resultados para esta técnica foram produtos de PCR de boa qualidade que foram purificados e submetidos à reação de sequenciamento.

Infelizmente, devido a problemas técnicos no sequenciador automático da Universidade Federal do Amazonas, o banco de dados para análises foi composto por apenas nove sequências de DNA (Figura - 5), o que inviabilizou as comparações entre as amostras populacionais. O problema já foi solucionado e, portanto continuaremos com os procedimentos para a breve apresentação dos resultados definitivos.





**Figura 5.** Sequências nucleotídicas obtidas das nove amostras analisadas de *P. unifilis*.

A composição média de bases nucleotídicas deste fragmento parcial do DNA mitocondrial foi assim apresentada: 23,9% para Adenina, 35,3% para Timina, 22,4% para Citosina e 18,4% para Guanina. A partir de todas as sequências analisadas verificou-se que quatro foram polimórficos. Dentre os sítios variáveis, 2 corresponderam a mutações do tipo transição e 2 do tipo transversão.

As sequências nucleotídicas obtidas são compostas por 312 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*) as quais foram plotadas em uma matriz de dados que foi utilizada para estimar um cladograma intra-específico de haplótipos no programa TCS (Clement et al., 2000). Este *software* agrupa sequências de pares de bases que diferem entre si em passos mutacionais dentro de haplótipos e calcula a frequência desses haplótipos, estimando relações genealógicas entre eles, usando um algoritmo descrito por Templeton et al., (1992). Estas sequências foram agrupadas em 4 diferentes haplótipos.

A diversidade gênica média ( $\hat{H}$ ) e a diversidade nucleotídica média ( $\Pi$ ) apresentaram valores consideráveis, 0,583 e 0,0039, respectivamente. Os testes de neutralidade  $F_s$  de Fu e D de Tajima não mostraram desvios significativos da expectativa neutra das mutações sugerindo que esta população de *P. unifilis* encontra-se em equilíbrio genético.

#### **4. DISCUSSÃO**

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 inter populacionais. Estas são, por conseguinte características de extrema importância para o manejo e a conservação de espécies ameaçadas.

Justificamos os poucos resultados que obtivemos devido a problemas técnicos com o equipamento que forneceria as sequências de DNA para as análises, e informamos que independentemente do término do projeto continuaremos as análises até a sua conclusão, considerando que já temos as amostras coletadas fica mais fácil continuar apenas com as análises genéticas, e em breve apresentaremos resultados definitivos, e, portanto mais significativos.

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 caça ou pesca ilegal. Esta medida permitirá poupar despesas com transportes, e com as informações do status genético das populações, não se correrá o risco de colocar esses animais em um ambiente ao qual não estariam adaptados.

## **5. CONCLUSÃO**

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

Apesar de terem sido estudadas apenas uma pequena parte da população já foi possível verificar a partir da composição nucleotídica que as populações de tracajá da ESEC Juami-Japurá apresentam uma boa diversidade genética, e pelos testes de neutralidade das mutações (Tajima e Fu) que estas estão em equilíbrio. No entanto, para chegarmos a conclusões definitivas, é necessário aumentar o número de amostras analisadas.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Ministério do Meio Ambiente através do Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade, órgão responsável pela gestão e administração da ESEC Juami-Japurá, AM;

Ao Programa de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq/ICMBio pela oportunidade de estágio voluntário concedida;

Ao programa Áreas protegidas da Amazônia (ARPA) que nos ajuda financeiramente na logística de nossas atividades;

A professora Dra. Maria das neves Viana do Laboratório de Bioquímica Molecular da UFAM, pela colaboração no projeto e oportunidade concedida de aprendizado das técnicas de coleta de sangue e moleculares em seu laboratório.

A todos os agentes de praia e vigilantes das Bases da Estação Ecológica Juami-Japurá.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Awise, 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.

Brown, W.M.; Prager, E.M.; Wang, A.; Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.*, (18) 225-239.

Cantarelli, V.H. & Herde, L.C. (1989). *Projeto quelônios da Amazônia 10 anos*. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA., Brasília.

Clement, M.; Posada, D.; Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9:1656-1659.

Dinerstein, E.; Olson, D.M.; Graham, D.J.; Webster, A.L.; Primm, S.A.; Bookbinder, M.P.; Ledec, G. *A conservation Assessment of the terrestrial ecoregions of Latin America and the Caribbean*. Washington: WWW & The World Bank, 1995.

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

Ernst, C.H.; Barbour, R.W. 1989. *Turtles of the World*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. and London. 313pp.

Epperson, B.K. 1995. Spatial structure of two-locus genotypes under isolation by distance. *Genetics* 140: 365-375.

Fachín, A.T. (1999). Ecologia de *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Pelomedusidae), na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade do Amazonas, pp. 189.

Fachín-Terán, A.; Acosta, A.; Vilchez, I.; Taleixo, G. 1997. Reproducción de la taricaya *Podocnemis unifilis* (Reptilia: Testudinidae), en cautiverio. Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonía. Iquitos, Peru. 207-209.

Haller, E.C.P. & Rodrigues, M.T. (2005). *Podocnemis unifilis* (Yellow-spotted River Turtle). Nests and Nesting. *Herpetological Review*, **36**(1), 60.

Hayashi, J.L.; Tagashira, Y.; Yoshida, M.C. 1985. Absence of extensive recombination between Inter and intraespecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Exp. Cell. Res.*, 160: 387-395.

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 nucleotide sites maintained in a finite population due to steady flux of mutations. *Genetics* 61:893-903.

Pearse, D.E.; Arndt, A.D.; Valenzuela, N.; Miller, B.A.; Cantarelli, V.; Sites, J.W. 2006. Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Molecular Ecology* 15, 985–1006.

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

Rueda-Almonacid, J.V., Carr, J.L., Mittermeier, R.A., Rodríguez-Mahecha, J. V., Mast, R.B., Vogt, R.C., Rhodin, A.G.J., Ossa-Velásquez, J., Rueda, J.N. ; Mittermeier, C.G. (2007). *Las tortugas y los cocodrilos de los países andinos del Trópico*. Conservación Internacional, Bogotá, Colombia.

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.

Sioli, H. 1991. *Amazônia: Fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais*. Editora Vozes. Petrópolis, Rio de Janeiro. 3 ed. 71 pp.

Smith, N. 1979. Destructive exploitation of the south american river turtle *Podocnemis expansa*. *Yearb. assoc. pacific coast geog.* 36: 85-100.

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.

Templeton, A.R.; Crandall, K.A.; Sing, C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic association endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132:619-633.

Viana, M.N.S. 2005. *Genética da Conservação de Quelônios do Gênero Podocnemis (Pleurodira: Podocnemidae) da Amazônia Brasileira*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 155p.