

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE RÉPTEIS E ANFÍBIOS

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - PIBIC/ICMBio

Diversidade Genética da Tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*

Schweigger, 1812) na Bacia Hidrográfica Tocantins-Araguaia

Aluna: Bárbara Beatriz de Sousa Rocha

Orientador: Rafael Antônio Machado Balestra

Brasília (DF)

Julho de 2011

Resumo

As populações da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) vêm sendo sistematicamente reduzidas principalmente em razão da sua sobreexploração que potencializa fatores inerentes à espécie que dificultam sua conservação, destacando-se o baixo índice de recrutamento, a longevidade, o longo tempo para atingir a maturidade reprodutiva e a vulnerabilidade à predação durante o período reprodutivo. Com efeito, a espécie figura no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas (CITES), e é categorizada na IUCN como espécie com baixo risco de extinção em virtude da sua ampla área de distribuição e populações relativamente abundantes, porém vulnerável à extinção em certas regiões/localidades, havendo assim a necessidade da implantação e aprimoramento de programas de conservação direcionados à espécie. Desde 1985 está em execução o manejo conservacionista e monitoramento reprodutivo da tartaruga da Amazônia, conduzido pelo RAN/ICMBio, na APA Meandros do rio Araguaia (GO), médio Araguaia (bacia hidrográfica Tocantins-Araguaia), sendo que apesar dos esforços empregados tem-se constatado um declínio populacional acentuado da espécie nessa região ecótono dos biomas cerrado e amazônico. Com o objetivo de incorporar novas ferramentas para implementar esse programa, este trabalho foi realizado de forma a: (1) criar um banco de amostras biológicas estratégico e de referência da espécie e, a princípio, para a bacia hidrográfica em questão; bem como (2) iniciar análises com marcadores moleculares baseados em polimorfismos do DNA para avaliar a diversidade genética das populações locais e averiguar a existência ou não de estrutura genética na bacia. Desta forma foram amostrados 100 indivíduos no total, sendo 50 provenientes do rio Crixás Açu (afluente do rio Araguaia) e 50 do rio Araguaia. A estratégia de coleta consistiu em amostrar 05 indivíduos de 10 ninhos em cada rio, de forma a ter amostras suficientes para avaliar tanto a diversidade genética como a existência ou não de filopatria intraespecífica nesta região. As amostras coletadas tiveram seu DNA extraído e

mantidos no Banco de DNA e Tecidos do Laboratório de Genética Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília (DF). A metodologia inicial escolhida para testar as hipóteses propostas foi o sequenciamento de parte da região controle do DNA mitocondrial (mtDNA) diretamente de amplicons obtidos pela técnica de PCR, realizada com primers específicos para espécie. Foram sequenciados 519 pares de bases de 69 indivíduos provenientes das duas localidades mencionadas. Nenhum polimorfismo foi identificado entre as duas populações, o que sugere uma homogeneidade dos animais nos rios amostrados, bem como a inexistência de estrutura populacional. Para avaliar a diversidade genética dessa bacia hidrográfica com outras que compõem a abrangência geográfica da espécie, o único haplótipo identificado foi comparado com 294 indivíduos da espécie que apresentam sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para essa mesma região do mtDNA. Nestas comparações foram avaliadas 492 pares de bases que evidenciaram a existência de apenas 08 SNPs/08 haplótipos entre todos os animais, com uma diversidade nucleotídica Pi de 0,0023 e uma diversidade haplotípica Hd de 0,519. O haplótipo identificado no presente estudo é o segundo mais frequente já observado para a espécie (80 dos 294 indivíduos analisados) que, por sua vez, também foi observado nos rios Branco (RR), Purus (AM), Amazonas (AM), Tapajós (PA) e Xingu (PA), além da própria bacia do Araguaia. Todas duas localidades amostradas no presente trabalho são inéditas para este tipo de marcador na bacia em voga. Por essa classe de marcadores é possível sugerir que medidas de translocações/manejo dentro da bacia do Araguaia poderão ser feitas para a espécie, visto a baixa estrutura populacional observada neste trabalho e na literatura. Contudo, para translocações de, por exemplo, animais entre bacias hidrográficas, é necessário a realização de novas coletas mais abrangentes, bem como adição de novos marcadores, talvez genômicos, de forma que a a formulação de medidas de conservação seja realizada de forma mais holística e eficiente.

Abstract

The turtle populations of the Amazon (*Podocnemis expansa*) are being systematically reduced mainly due to their overexploitation that leverages the inherent factors that hinder species conservation, especially the low rate of recruitment, long time for reproducing, longevity and vulnerability during the reproductive period. Indeed, the species in Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES), and is categorized on the IUCN as a species with low risk of extinction because of its wide distribution area, but vulnerable to extinction in certain regions / locations, so there is a pressing need of improvement and implementation of conservation programs targeted to the species. Since 1985 is running the management and monitoring of turtle conservation in the Amazon, led by the RAN / ICMBio, APA Meanders in the river Araguaia (GO), middle Araguaia (Tocantins-Araguaia basin), and despite these efforts has been found a sharp population decline of the species in this ecotone region of the Amazon and Cerrado biomes. In order to incorporate new tools to implement this program, this work was performed in order to: (1) create a database of biological samples and strategic reference of the species and, in principle, for the river basin in vogue, as well as (2) to begin an analysis with molecular markers based on DNA polymorphisms to assess both the genetic diversity of their existing populations and the presence or absence of genetic structure within the basin. Thus, we sampled 100 individuals in total, from 50 Crixás Açu River (a tributary of the Araguaia River) and 50 of the Araguaia River. The collection strategy consisted of 05 individuals sampled at least 10 nests in each river, in order to have enough samples to evaluate both genetic diversity and the existence of philopatry of the species within this region. The samples had their DNA extracted and kept in the DNA and Tissue Bank of the Animal Genetics Laboratory at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasilia (DF). The initial methodology chosen to test the hypotheses proposed sequencing was part of the control region of mitochondrial DNA (mtDNA) directly

from amplicons obtained by PCR performed with primers specific to species. We sequenced 519 base pairs in 69 individuals from the two locations mentioned. No polymorphism was identified between the two populations, suggesting homogeneity of the animals in the rivers sampled, and the absence of population structure. To assess the genetic diversity of this basin with others that make up the geographical range of the species, the only haplotype identified was compared with 294 individuals of the species who have sequences deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) for these same regions of mtDNA. These comparisons were evaluated 492 base pairs that showed the existence of only 08 SNPs/08 haplotypes among all animals, with a nucleotide diversity of 0.0023 and Pi a haplotype diversity of 0.519 Hd . The haplotype identified in this study is the second most frequent already observed for the species (80 of 294 individuals parsed) which, in turn, was also observed in the rivers White (RR), Purus (PM), Amazonas (AM), Tapajós (PA) and Xingu (PA), as well as the Araguaia basin itself. All two locations sampled in this study are unprecedented for this type of item within the basin in question. For this class of markers is possible to suggest that measures of translocations / handling within the Araguaia basin may be made for the species, given the low population structure observed in this work and literature. However, for translocations, for exemplo, animals between river basins is necessary to conduct the most comprehensive collection of new as well as adding new markers, perhaps genome, so that a formulation of conservation measures is done in a more holistic and efficient.

Lista de figuras

Figura 1. <i>Podocnemis expansa</i> em postura. Fonte: Acervo Técnico do RAN (2011).....	9
Figura 2. Gráfico da série histórica do número de matrizes de <i>P. expansa</i> em desova, em sítio reprodutivo da espécie monitorado na APA Meandros do Rio Araguaia (GO). Fonte: Grupo Técnico Quelônios do RAN (2011).....	12
Figura 3. Mapa da região de coleta das amostras de tecido – encontro dos rios Crixás Açu e Araguaia, na divisa dos Estados de Goiás e Mato Grosso. Fonte: Grupo Técnico Quelônios do RAN (2011).....	14
Figura 4. Primeiro teste padrão de PCR com o par de primers PRO e 12SR5.....	33
Figura 5. Teste de PCR via kit com o primer CR.....	33
Figura 6. Amplificação do restante das amostras (Parte 1).....	33
Figura 7. Amplificação do restante das amostras (Parte 2).....	34
Figura 8. Amplificação do restante das amostras (Parte 3).....	34
Figura 9. Eletroferograma do indivíduo 02 amostrado no rio Araguaia primer CR-F...35	
Figura 10. Eletroferograma do indivíduo 02 amostrado no rio Araguaia primer CR-R.36	
Figura 11. Eletroferograma do indivíduo 24 amostrado no rio Crixás primer CR-F.....36	
Figura 12. Eletroferograma do indivíduo 24 amostrado do rio Crixás primer CR-R.....37	
Figura 13. Análise de Network (Median Joining) em populações de <i>Podocnemis expansa</i>	39

Listas de Tabelas

Tabela 1. Protocolo de Extração de DNA.....	16
Tabela 2. Reação Padrão de PCR.....	20
Tabela3. Programas utilizados no termociclador para os primer PRO e 12 SR5; CR-R e CR-F.....	20
Tabela 4. Reação padrão “Kit Master Mix”	21
Tabela 5. Programa usado no termociclador via kit com o par de primers CR-R e CR-F.....	21
Tabela 6. Programa utilizado no termociclador para purificação das amostras.....	22
Tabela 7. Protocolo de reação de sequenciamento.....	22
Tabela 8. Programa utilizado no termociclador para o sequenciamento.....	23
Tabela 9. Reação de purificação da reação de sequenciamento.....	23
Tabela 10. Sequências da região controle da tartaruga da Amazônia obtidas no <i>Genbank</i> para auxiliar as análises.....	25
Tabela 11. Quantificação das amostras de DNA.....	27
Tabela 12. Haplótipos identificados a partir do sequenciamento de parte da região controle do mtDNA de <i>Podocnemis expansa</i> e de seu banco de dados do GenBank.....	38

Sumário

Introdução.....	8
Material e Métodos.....	16
Resultados.....	27
Discussão.....	40
Agradecimentos.....	45
Bibliografia.....	46

Introdução

A ordem TESTUDINES ou CHELONIA, que engloba os quelônios terrestres, marinhos e de água doce, é tida como a mais antiga de todas entre os vertebrados atuais. A mais antiga evidência fóssil data do período Permiano, que ocorreu a cerca de 280 milhões de anos atrás (FERRI, 2002).

Os testudines são diferenciados dos demais vertebrados devido a características primitivas e estruturas altamente especializadas que desenvolveram ao longo do tempo (POUGH *et al.*, 2008).

O Brasil possui 35 espécies de quelônios ocorrentes nos seus diversos ecossistemas terrestres e aquáticos, 29 espécies são de água doce, duas são terrestres (jabutis), e cinco são marinhas. Destas, 16 espécies podem ser encontradas no centro-oeste e norte brasileiro congregadas em cinco famílias, sendo três da sub-ordem Cryptodira (Emydidae, Kinosternidae e Testudinidae) e as demais da sub-ordem Pleurodira (Chelidae e Podocnemididae) (POUGH *et al.*, 2001).

Todas as espécies da Família Podocnemididae têm distribuição restrita à América do Sul, ocupando a bacia Amazônica (*Peltocephalus dumeriliana* (Schweigger, 1812), *Podocnemis erythrocephala* (Spix, 1824), *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812), *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) e *Podocnemis sextuberculata* (Cornalia, 1849), (IVERSON, 1992; POUGH, 2001).

A história de vida de muitos quelônios faz com que sejam vulneráveis ao declínio populacional. As baixas taxas de crescimento e os longos períodos necessários para que atinjam a maturidade são características deste grupo em geral e, particularmente, das espécies de grande porte, caso da tartaruga da Amazônia. Além disso, um longo período de vida geralmente está associado a uma baixa taxa de substituição de indivíduos na população. Essas características podem predispor as espécies ao risco de extinção (POUGH *et al.*, 2003).

Os quelônios estão entre os animais mais ameaçados do mundo (BONIN, 2006). Segundo Viana (2005) existem poucos trabalhos relacionados a padrões genéticos de populações e fluxo gênico com quelônios de água doce, e os estudos existentes são focados especialmente na espécie *Podocnemis expansa*, no entanto ainda ocorrem grandes lacunas de conhecimento neste tema.

Podocnemis expansa (Figura 1) é considerada o maior quelônio de água doce da América do sul, pode atingir até 107 cm de comprimento de carapaça e 90 kg de peso (PRITCHARD, 1979), e pode ser encontrada em rios e lagos (MOLINA, 1996). VOGT (2008) relata que na época de cheia dos rios, indivíduos de todas as faixas etárias penetram em florestas alagadas e lagos a procura de alimento, e quando são estabelecidos períodos de seca, juvenis e sub-adultos tendem a permanecer nesses locais enquanto os adultos retornam aos rios. Tais animais são altamente influenciados por fatores ambientais (temperatura, água e trocas gasosas) que, segundo POUGH; HEISER; JANER (2008), entre outros, influenciam seu desenvolvimento embrionário. Vale ressaltar que a determinação sexual também é influenciada por tais condições (MALVASIO, 2001).



Figura 1. *Podocnemis expansa* em postura. Fonte: Acervo Técnico do RAN (2011).

P. expansa é vulnerável à redução populacional devido a intensa colheita de seus ovos e carne (PEARSE *et al.*, 2006), fontes de proteínas para povos que vivem ao longo dos rios de planície tropical (PRITCHARD & TREBBAU 1984). Sua população vem sendo drasticamente reduzida com a super exploração (MOLL & MOLL, 2004), passando a ser regulamentada no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas (CITES), e listada segundo a IUCN como espécie com baixo risco, no entanto, dependente de programas de conservação (IUCN, 2011). Com isso, avaliar sua estrutura populacional, bem como o fluxo gênico, se torna um grande desafio já que as populações, em geral, não se encontram em equilíbrio (WHITLOCK & MCCAULEY, 1999).

No período de 1960 a 1970, a intensa predação dos quelônios despertou atenção do Governo Federal Brasileiro. Em 1967 foi publicada a Lei nº 5.197, dispondo sobre a proteção à fauna, proibindo a livre captura, caça ou apanha de animais silvestres em qualquer fase de seu desenvolvimento, bem como seus ninhos, abrigos e criadouros naturais, empregando de forma legal o trabalho de proteção aos quelônios. Em 1979, o Governo Federal, com o propósito de conservar os quelônios de água doce, estabeleceu um programa de proteção, originando o Projeto de Proteção e Manejo dos Quelônios da Amazônia coordenado pelo extinto Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF), substituído em janeiro de 1989 pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

Em 1990 devido à necessidade de uma melhor estruturação dos projetos de conservação e manejo da fauna silvestre no Brasil, vários projetos foram distribuídos em Centros Técnicos Especializados e, entre eles, foi criado o Centro Nacional de Quelônios da Amazônia (CENAQUA). Este ficou responsável pelo Projeto Quelônios da Amazônia (PQA) durante 11 anos, porém, devido à necessidade de ampliação da área de atuação do Centro com a inclusão de outras espécies da herpetofauna (anfíbios e outros grupos de répteis) no

território brasileiro, foi criado em 2001 o Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios (RAN) através da portaria n° 58, que revogou a portaria n° 870 de 1990. Após esta transição, as atividades do CENAQUA foram absorvidas pelo RAN, cuja denominação atual é Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios, Unidade do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), que é co-responsável pelo PQA juntamente com o Ibama desde 2007, desenvolvendo ações pertinentes ao escopo funcional e diretrizes institucionais do ICMBio.

O Projeto de Proteção e Manejo dos Quelônios da Amazônia, um dos projetos do Programa Nacional de Conservação dos Quelônios Continentais Brasileiros do RAN, tem como meta identificar e proteger áreas de reprodução, principalmente de *P. expansa*. O objetivo principal é obter através de manejos conservacionistas a recuperação gradativa dos estoques populacionais, considerando à perspectiva de viabilizar um uso responsável e de valorização do potencial da espécie, e ainda conciliar com outros animais também consumidos como o tracajá (*P. unifilis*) e o iaçá ou pitiú (*P. sextuberculata*). Com a crescente demanda por alimentos e a rápida industrialização da pesca, a predação dos recursos aquáticos aumentou assustadoramente, tornando-se evidente a necessidade da conservação desses animais (CANTARELLI, 1997). Conseqüentemente, conhecimentos mais profundos e detalhados sobre a biologia e a dinâmica das populações fazem-se necessários para que tais recursos possam ser preservados e até explorados de forma racional e auto-sustentável.

Dessa forma o RAN busca assegurar e fortalecer o manejo, proteção e o monitoramento das espécies de quelônios amazônicos, inserindo as comunidades locais, instituições de pesquisa, iniciativa privada, organizações sociais e as Unidades de Conservação no processo de co-gestão. Com sede na cidade de Goiânia, de onde coordena, em âmbito nacional, todas as ações de conservação dos répteis e anfíbios continentais, o Programa Nacional de Conservação dos Quelônios Continentais Brasileiros é um braço

executivo do RAN que atua, entre outras várias localidades, nas áreas de ocorrência natural das tartarugas, monitoradas nas bacias Amazônica e Araguaia/Tocantins.

Nos últimos anos, a exploração de matrizes de tartaruga, principalmente pela comunidade ribeirinha, vem causando o desaparecimento desta espécie em alguns trechos do Rio Araguaia, com a diminuição de fêmeas em postura, caso da região do médio Araguaia, área de transição entre os Estados de Goiás, Mato Grosso e Tocantins.

Desde 1985 está em execução o manejo conservacionista e monitoramento reprodutivo da tartaruga da Amazônia, realizado pelo RAN na Área de Proteção Ambiental (APA) Meandros do rio Araguaia (GO), médio Araguaia, sendo que apesar destes esforços tem-se constatado um declínio populacional acentuado da espécie nessa região ecótono dos biomas cerrado e amazônico (Figura 2).

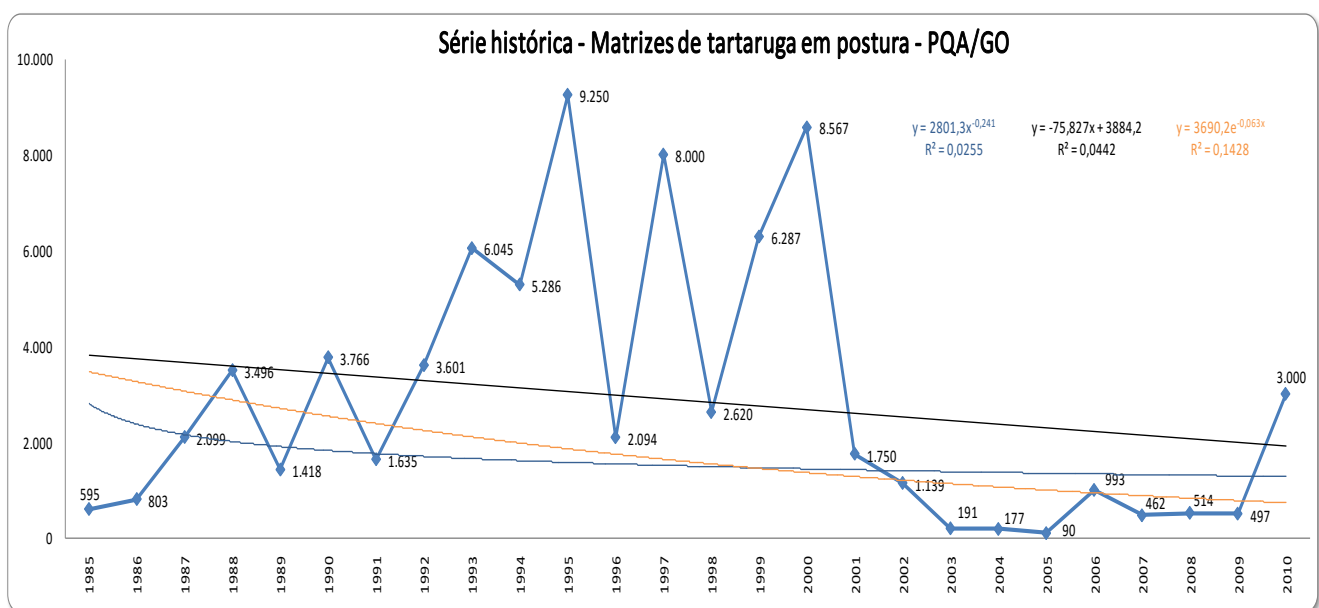


Figura 2. Gráfico da série histórica do número de matrizes de *P. expansa* em desova, em sítio reprodutivo da espécie monitorado na APA Meandros do rio Araguaia (GO). Fonte: Grupo Técnico Quelônios do RAN (2011).

A APA Meandros do Rio Araguaia, compreende as várzeas situadas nos rios Araguaia, Crixás-Açu, Verde e Cristalino, abrange os Estados de Goiás, Mato Grosso e Tocantins, nos municípios de Nova Crixás e São Miguel do Araguaia (GO), Cocalinho (MT) e Araguaçu (TO). Essa APA foi criada em 1998 com o intuito de proteger a fauna e a flora da região de transição entre os biomas cerrado e amazônico, notadamente as espécies tartaruga-da-Amazônia, o boto-cinza (*Sotalia fluviatilis*) e o jacaré-açu (*Melanosuchus niger*) dados seus desaparecimentos na região, e as espécies categoricamente ameaçadas de extinção, tais como: o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), o veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*), o bugio (*Alouatta fusca*), a lontra (*Lutra longicaudis*), a jaguatirica (*Loepardus pardalis*) e a onça pintada (*Panthera onca*).

Os municípios de Luiz Alves e São José dos Bandeirantes (GO) possuem uma área de desova de tartarugas (*P. expansa* e *P. unifilis*) denominada popularmente “Remansão”, com aproximadamente 40 km de extensão, onde se localizam dez praias que anualmente são selecionadas para a nidificação dessas espécies (Figura 3), sítio reprodutivo de onde foram coletadas as amostras analisadas neste trabalho, sendo uma localidade no rio Araguaia propriamente e outra em um de seus afluentes, rio Crixás Açu.

Antes do século XXI, poucos estudos tinham sido realizados para avaliar a diversidade genética, estrutura populacional ou outros indicadores genéticos de *P. expansa* (VALENZULELA, 2001). Devido a migração de ambos os sexos entre áreas de nidificação e alimentação, a filopatria é facilitada e com isso o estudo com o DNA mitocondrial como finalidade de identificação da estrutura genética da população se torna viável (PEARSE *et al.*, 2006). Segundo os autores citados anteriormente, trabalhos realizado com a espécie demonstraram haver padrões consistentes de estrutura genética, limitados geograficamente pelas grandes bacias hidrográficas.



Figura 3. Mapa da região de coleta das amostras de tecido – encontro dos rios Crixás Açu e Araguaia, na divisa dos Estados de Goiás e Mato Grosso.

A identificação de populações evolutivamente significativas e também de unidades de conservação que as abrigam, se combinam de forma a gerar pontos-chaves para a conservação de espécies que se encontram ameaçadas (PEARSE *et al.*, 2006). Os mesmos autores relatam que espécies que possuem distribuição elevada, como peixes, onde juvenis se dispersão em lugares com a presença de poucas barreiras geográficas, é dificultado o estudo da estrutura genética da população. Com isso a utilização de marcadores moleculares nessas populações se torna viável já que permite um estudo mais aprofundado a respeito dos indivíduos favorecendo a proposição de estratégias de conservação de suas populações.

Em razão da descoberta de várias regiões polimórficas ao longo do genoma dos organismos, foram desenvolvidas técnicas capazes de identificar e quantificar esses polimorfismos de forma que hoje as mesmas se tornaram viáveis, para por exemplo, caracterizar a estrutura genética de uma população, bem como de seus indivíduos (FERREIRA e GRATTAPALIA, 1998).

No caso específico de quelônios, já existem trabalhos que comprovam a utilidade dos marcadores moleculares em estudos populacionais (veja, por exemplo, ENGSTROM *et al.*, 2007). No entanto, o desenvolvimento de marcadores moleculares para tartarugas de água doce e cágados ainda não está em nível ideal, devendo nos próximos anos serem desenvolvidas novas técnicas (PARHAM *et al.*, 2001).

A partir desse cenário, no intuito de implementar as ações para o manejo conservacionista e monitoramento reprodutivo da tartaruga da Amazônia desenvolvido pelo RAN na APA Meandros do Rio Araguaia (GO) desde 1985, este trabalho visa incorporar novas ferramentas de aferição de viabilidade populacional para essa espécie, uma vez que nos trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo RAN nesta APA não foram contempladas estudos sobre estrutura genética dos animais monitorados, sendo esta uma importante ferramenta a ser incorporada no aprimoramento de um sistema de manejo para essa espécie (VIANA, 2005).

Para tanto o RAN formalizou em 2009, um Termo de Reciprocidade com a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília (DF), que tem interesse e recursos materiais para estruturar e manter um banco genômico de algumas espécies chave da biodiversidade brasileira; e desenvolver diversos estudos genéticos/moleculares de espécies como a tartaruga da Amazônia, dado o seu relevante papel nos sistemas ecológicos que integra; além do potencial de uso dessa espécie em sistemas de criação *in situ* e *ex situ*.

Face ao exposto, este trabalho foi realizado de forma a: (1) criar um banco de amostras biológicas (tecido cutâneo) estratégico e de referência da espécie e, a princípio, para a bacia hidrográfica de interesse; bem como (2) iniciar análises com marcadores moleculares baseados em polimorfismos do DNA para avaliar a diversidade genética das populações existentes e a existência ou não de estrutura genética na bacia.

Material e Métodos

Coleta, processamento e curadoria das amostras

Foram realizadas coletas de amostras teciduais cutânea de filhotes de tartaruga da Amazônica nos rios Crixás-Açu e Araguaia, interior da APA Meandros do Rio Araguaia (GO), em 2008 (**Autorização SISBIO nº. 13447/2009**), tendo sido amostrado 50 indivíduos em cada um destes rios (100 indivíduos ao todo), sendo 05 indivíduos por ninho, no período reprodutivo da espécie no ano de 2009. As amostras foram mantidas em tubos de eppendorf para extração de DNA. As amostras foram destinadas ao Laboratório de Genética Animal (LGA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Esta instituição é Fiel Depositária do Patrimônio Genético junto ao CGEN de acordo com Deliberação Nº 70 de 2004. No LGA as amostras foram transferidas para novos microtubos, com adição de novo etanol absoluto PA, sendo devidamente etiquetadas, seus dados registrados e em seguida depositados no banco de DNA e Tecidos do LGA.

Extração e quantificação do DNA

Foi extraído o DNA das amostras (protocolo descrito na Tabela 1) seguidamente depositado num freezer a -80°C do banco de DNA do LGA. Após o período de extração as amostras foram quantificadas com o auxílio de espectrofotometria.

Tabela 1. Protocolo de Extração de DNA

Extração de DNA de Tecido
Numerar três conjuntos de tubos do tipo eppendorf de 1,5 ml sendo que o primeiro conjunto poderá ser de 2,0ml, pois facilita na hora da maceração do material;
Cortar pequenos pedaços de tecido utilizado (a quantidade a ser cortada dependerá da quantidade de tecido de amostra que se tiver). Caso os mesmos

estejam fixados em etanol deixar secar os mesmos ao ar livre;
Adicionar 500 microlitros do tampão de extração contendo CTAB e com a ajuda de esferas metálicas, que serão colocadas duas em cada tubo, o material será levado ao macerador de amostras onde deverá ficar por 30 segundos (é sugerido que se macere por 2 vezes);
Incubar os tubos em banho-termostatizado a 60°C por uma hora. A cada 20 minutos de incubação retirar os tubos, passar pelo vortex e retornar ao banho-maria;
Adicionar 20 microlitros de <u>Proteinase k</u> (10 mg/ml) a cada amostra. (Caso a <u>proteínase K</u> esteja em concentração 20mg/ml, ao invés de se adicionar 20 microlitros serão adicionados 10 microlitros);
Deixar em banho-termostatizado a 55°C overnight (16 horas);
Retirar os tubos do banho-maria e centrifugar por 2 minutos a 14.000 rpm;
Adicionar 500 micro-litros de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) no segundo jogo de tubos eppendorf;
Remover o sobrenadante (aproximadamente 450 microlitros) e inserir nos tubos contendo a solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1);
Homogeneizar as soluções gentilmente na horizontal com cuidado para não derramar a solução;
Centrifugar por 15 minutos a 14.000 rpm;
Remover apenas a camada superior e transferir o coletado para o terceiro

<p>conjunto de tubos. Evitar coletar camada que divide o clorofórmio da fração a ser coletada;</p> <p>Adicionar 250 microlitros de isopropanol gelado (-20°C) e homogeneizar a solução gentilmente. Nessa etapa ocorre a precipitação do DNA existente;</p>
<p>Colocar os tubos a -4°C por pelo menos 30 minutos para auxiliar na precipitação;</p>
<p>Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm para formação do pellet;</p>
<p>Descartar o sobrenadante com cuidado para não perder o pellet. Adicionar 1 ml de etanol 75% (- 20°C) para lavar o pellet;</p>
<p>Centrifugar por dois minutos a 14.000 rpm;</p>
<p>Descartar o sobrenadante com cuidado para não perder o pellet. Adicionar 1 ml de etanol 100% (- 20°C) para lavar o pellet;</p>
<p>Centrifugar por dois minutos a 14.000 rpm;</p>
<p>Descartar o sobrenadante com cuidado para não perder o pellet. Secar o pellet à temperatura ambiente overnight ou máquina à vácuo (speed-vac);</p>
<p>Adicionar pelo menos 50 microlitros de TE estéril (Tris-EDTA Ph 8,0) para diluir o pellet (100 microlitros para pellets visíveis) e deixar os tubos a 4°C overnight;</p>
<p>Estocar o DNA a 4°C para uso imediato ou a -20°C para usos menos frequentes.</p>

Soluções utilizadas:

Tampão de extração: 100mM Tris-HCL (Ph 8,0); 1.4 NaCl; 0.2 M EDTA; 2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide); 0.2% 2-mercaptoetanol)

Manter a temperatura ambiente.

Para 200 ml:

A partir de 160 ml de água deionizada adicionar:

16.36g	NaCl
400 microlitros	2- mercaptoetanol
20 ml	1M Tris-HCl (Ph 8.0)
8ml	0.5 M Na ₂ EDTA(Ph 8.0)
4g	CTAB

Padronização da reação de PCR

Foram testados dois pares de primers para amplificar fragmentos no mtDNA. O primeiro par de primers PRO (5'- CCCATCACCCACTCCCAAAGC-3') foi desenvolvido por Sites (comunicação pessoal), e 12SR5 (5'-GTCAGGACCATGCCTTTGTG-3') desenvolvido por Kocher *et al.* (1989) testado em trabalho realizado por Viana (2005). O segundo par de primers testados foi CR-F(AACTCCCATCACCTACTCCCAAAG) e CR-R(TGAACCAGAATGTCCAGCCTCTCA), primer desenhado pela equipe que trabalha no LGA (Laboratório de Genética Animal). A reação padrão para amplificar ambos os fragmentos encontram-se na tabela 2 e o programa concernente utilizado no termociclador (Para os primers PRO e 12SR5, CR-F e CR-R) constam na tabela 3. Ressalta-se que na reação padrão de PCR, o DNA deverá se encontrar a 3 ng/ul, sendo assim as amostras foram diluídas para que atingissem a esse valor. Para a amplificação das amostras via primers CR-R e CR-F,

utilizou-se o kit comercial “Quiagem Master Mix”, essa reação encontra-se na tabela 4 e o respectivo programa utilizado no termociclador, na tabela 5.

Tabela 2. Reação Padrão de PCR

Concentração Final	Concentração das soluções estoque inicial
Primer F- 0,5 micro molar	10 micro molar
Primer R- 0,5 micro molar	10 micro molar
DNTPs- 0,2 micro molar	2,5 micro molar
Taq- 0,5	5 u/microlitro
Tampão- 1X	10X
Água- concentração a ser definida	
MgCl- 1,5 micro molar	25 micro molar obs também poderá estar em concentração 50 micro molar
DNA- dependente do valor da quantificação	3 ng

Tabela3. Programas utilizados no termociclador para os primers PRO e 12 SR5; CR-R e CR-F

Programa Primer Pro e 12SR5		Programa Primer CR-R e CR-F	
94°C	5'	94°C	5'
94°C	30''	94°C	30''
54°C	45''	54°C	45''
72°C	1'	72°C	1'

72°C	7'	72°C	7'
4°C	Infinito	4°C	Infinito

Tabela 4. Reação padrão do “Kit Master Mix”

Master mix	2,5 micro litros
Q. Solucion	0,5 micro litros
H2O	Dependente do volume final
Primer	0,2 r e 0,2 f
DNA	1,5 micro litros

Tabela 5. Programa usado no termociclador via kit com o par de primers CR-R e CR-F

95°C	15'
94°C	30''
62°C	45''
72°C	1'
72°C	7'
4°C	Infinito

Purificação da PCR, reação de sequenciamento e eletroforese

Protocolo de purificação de PCR com exo-sap

Para cada 10ul de volume final de PCR:

Preparar mix com 0,5 unidades de Exo e 0,5 unidades de SAP.

Distribuir nas amostras.

Levar para termociclador com o programa (vide tabela 6 abaixo):

Tabela 6. Programa utilizado no termociclador para purificação das amostras

37°C	30'
80°C	20'
4°	Infinito

Obs.: O produto purificado não foi mantido congelado por mais que uma semana.

Protocolo de reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento pode ser padronizada para cada quantidade de produto de PCR, mas em geral produtos de boa qualidade e quantidade de amplificação seguem o protocolo descrito na tabela 7 abaixo. O programa conexo utilizado no termociclador consta na tabela 8.

Tabela 7. Protocolo de reação de sequenciamento

Big Dye (v.3, Applied Biosystems)	0,5ul
Tp (5x, Applied Biosystems)	1,75ul
Primer F ou R (1,6 mM)	2,0ul

H ₂ O	4,25ul
DNA	Purificado com Exo-Sap (± 10 hg) = 1,5ul

Tabela 8. Programa utilizado no termociclador para o sequenciamento

96°C	1'
96°C	10'' (25 vezes)
50°C	5''
60°C	4'
4°C	Infinito

Obs.: Após o sequenciamento a amostra foi purificada novamente (protocolo na tabela 9).

Tabela 9. Reação de purificação da reação de sequenciamento

Adicionar 2,5 ul de EDTA (125mM) em cada poço;
Adicionar 25ul de etanol 100% em cada poço;
Tampar a placa e inverter/misturar 4x;
Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos;

Centrifugar a 4°C por 3000g por 30 minutos;
Inverter a placa e dar spin invertido, logo após retirar da centrífuga;
Adicionar 30ul de etanol 70% em cada poço;
Centrifugar a 4°C por 15 minutos a 3000g;
Inverter a placa e dar spin invertido;
Deixar a placa por ± 1 hora em temperatura ambiente para secar ou usar speed-vac por 15 minutos;
Ressuspender as amostras em formamida Hi-Di e guardar a 4°C, na hora de correr, denaturar por 5 minutos e dar choque térmico em gelo.

Edição das sequências e análises estatísticas

Em razão da baixa amostragem experimental e para maior representatividade da análise, foram acrescentadas sequências do *GenBank* correspondentes à região controle já descritos para a tartaruga da Amazônia (Tabela 10). As sequências foram alinhadas e editadas com o programa MEGA v.5.0 (KUMAR *et al.*, 2008) a partir da sequência de referência [DQ352804], publicada por PEARSE *et al.*, (2006). Os dados obtidos após o alinhamento das sequências foram utilizados para vários tipos de análises de maneira a otimizar a informação contida dentro e entre as populações estudadas.

Tabela 10. Sequências da região controle do mtDNA da tartaruga da Amazônia obtidas no *Genbank* para auxiliar as análises

Número de acesso nos bancos de dados	Bacia hidrográfica/ País	Rio/Ponto de Coleta	Referência
DQ352804; DQ352803; DQ352802; DQ352801; DQ352800; DQ352799;	Orinoco/ Venezuela	Orinoco	Pearse et al., 2006

DQ352798; DQ352797; DQ352796; DQ352795; DQ352794; DQ352793; DQ352792; DQ352791; DQ352790; DQ352789; DQ352788; DQ352787			
DQ352786; DQ352785; DQ352784; DQ352783; DQ352782; DQ352781; DQ352780; DQ352779; DQ352778; DQ352777; DQ352776; DQ352775; DQ352774; DQ352773; DQ352772; DQ352771; DQ352770; DQ352769; DQ352768; DQ352767; DQ352766; DQ352765; DQ352764; DQ352763	Amazônica/ Brasil	Branco	Pearse et al., 2006
DQ352762; DQ352761; DQ352760; DQ352759; DQ352758; DQ352757; DQ352756; DQ352755; DQ352754; DQ352753	Amazônica/ Peru	Peru	Pearse et al., 2006
DQ352752; DQ352751; DQ352750; DQ352749; DQ352748; DQ352747; DQ352746; DQ352745; DQ352744; DQ352743; DQ352742; DQ352741	Amazônica/ Brasil	Purus	Pearse et al., 2006
DQ352740; DQ352739; DQ352738; DQ352737; DQ352736; DQ352735; DQ352734; DQ352733; DQ352732; DQ352731; DQ352730; DQ352729; DQ352728; DQ352727; DQ352726; DQ352725; DQ352724; DQ352723; DQ352722; DQ352721; DQ352720; DQ352719	Amazônica/ Brasil	Guaporé	Pearse et al., 2006
DQ352718; DQ352717; DQ352716; DQ352715; DQ352714; DQ352713; DQ352712; DQ352711; DQ352710; DQ352709; DQ352708; DQ352707; DQ352706; DQ352705; DQ352704; DQ352703; DQ352702; DQ352701; DQ352700; DQ352699; DQ352698; DQ352697	Amazônica/ Brasil	Guaporé/ Pimenteiras	Pearse et al., 2006
DQ352696; DQ352695; DQ352694; DQ352693; DQ352692; DQ352691; DQ352690; DQ352689; DQ352688; DQ352687; DQ352686; DQ352685; DQ352684; DQ352683; DQ352682; DQ352681; DQ352680; DQ352679	Amazônica/ Brasil	Uatuma	Pearse et al., 2006
DQ352678; DQ352677; DQ352676; DQ352675; DQ352674; DQ352673; DQ352672; DQ352671; DQ352670; DQ352669; DQ352668; DQ352667; DQ352666; DQ352665; DQ352664; DQ352663; DQ352662; DQ352661	Amazônica/ Brasil	Amazonas, Terra Santa	Pearse et al., 2006
DQ352660; DQ352659; DQ352658; DQ352657; DQ352656; DQ352655; DQ352654; DQ352653	Amazônica/ Brasil	Trombetas	Pearse et al., 2006
DQ352652; DQ352651; DQ352650; DQ352649; DQ352648; DQ352647; DQ352646; DQ352645; DQ352644; DQ352643; DQ352642; DQ352641; DQ352640; DQ352639; DQ352638; DQ352637; DQ352636; DQ352635; DQ352634; DQ352633; DQ352632	Amazônica/ Brasil	Tapajós	Pearse et al., 2006

DQ352631; DQ352630; DQ352629; DQ352628; DQ352627; DQ352626; DQ352625; DQ352624; DQ352623; DQ352622; DQ352621; DQ352620; DQ352619; DQ352618; DQ352617; DQ352616; DQ352615; DQ352614; DQ352613; DQ352612; DQ352611; DQ352610; DQ352609	Amazônica/ Brasil	Xingu	Pearse et al., 2006
DQ352608; DQ352607; DQ352606; DQ352605; DQ352604; DQ352603; DQ352602; DQ352601; DQ352600; DQ352599; DQ352598; DQ352597; DQ352596; DQ352595; DQ352594; DQ352593; DQ352592; DQ352591; DQ352590; DQ352589	Araguaia/ Brasil	Araguaia, Parque Nacional	Pearse et al., 2006
DQ352588; DQ352587; DQ352586; DQ352585; DQ352584; DQ352583; DQ352582; DQ352581; DQ352580; DQ352579; DQ352578; DQ352577; DQ352576; DQ352575; DQ352574; DQ352573; DQ352572; DQ352571; DQ352570; DQ352569; DQ352568; DQ352567	Araguaia/ Brasil	Rio das Mortes	Pearse et al., 2006
AY572984; AY572983; AY572982; AF361994; AF361958; AY572985; AF361976; AF361974; AF361965; AF361953	*	YN	Pearse et al., 2006
AY572981; AF361973; AY572980; AF361992; AF361990; AF361985; AF361980; AF361966; AF361952	*	GN	Pearse et al., 2006
AY572979; AY572978; AF3619 AF361984; AF361983; AF3619 AF361978; AF361959; AF361955	*	CN	Pearse et al., 2006
AF361997; AF361972; AF3619 AF361988; AF361967	*	G	Pearse et al., 2006
AF361996; AF361987; AF3619 AF361991; AF361977; AF3619 AF361962; AF361961; AF361956	*	TDT	Pearse et al., 2006
AF361975; AF361982; AF3619 AF361970; AF361960	*	C	Pearse et al., 2006
AF361957; AF361993; AF3619 AF361968; AF361954	*	Y	Pearse et al., 2006
AF361995; AF361986; AF361971	*	TCO	Pearse et al., 2006
FM165614	Caribben Sia	Magdalena, Cauca, San Jorge, and Sinú Drainagis	Vargas-Ramirez et al., 2008

*** Sequência não publicada em artigo científico de forma que a localização específica não está disponível no GenBank.**

Em razão de alguns problemas técnicos que os métodos de agrupamento por meio de árvores filogenéticas podem gerar em estudos intra-populacionais (POSADA e CRANDALL,

2001), uma análise de *network* pelo método de vetores medianos foi realizada por meio do software Network 4.1.1.2 (www.fluxus-engineering.com acessado em junho 2010). Para estimar os haplótipos foi utilizado o software DNAsp (ROZAS *et al.*, 2010). Adicionalmente, parâmetros básicos de diversidade também foram obtidos por meio do programa DNAsp.

Resultados

Coleta e curadoria das amostras

Algumas amostras coletadas, em razão do transporte, perderam a identificação original e foram identificados como NI (não identificado), gerando um total de 12 amostras. Vale destacar que em um tubo de eppendorf não havia tecido, o que resultou num total de 49 amostras efetivamente analisadas.

Extração e quantificação do DNA

Do período de 26/08/2010 a 16/09/2010 foi extraído o DNA das amostras (protocolo expresso na Tabela 1, em material e métodos), seguidamente depositado em freezer a -80°C do Banco de DNA do LGA. Os dados que apresentam o símbolo (*) na tabela 11 tiveram seus tecidos totalmente extraídos já que eles apresentavam fragmentos muito pequenos, tamanho esse determinado pelo protocolo de extração.

Supôs-se que o pequeno tamanho da amostra, bem como o estado de degradação que muitas delas apresentaram (por ex.: quando chegaram, algumas amostras não se encontravam embebidas em etanol e por isso estavam ressecadas), o que fez com que algumas obtivessem valor de quantificação abaixo de 10 ng/ul (considerado baixo), como mostra a tabela 11, devido a isso não foram diluídas a 3 ng/ul, valor utilizado na reação padrão de PCR no LGA.

Tabela 11. Quantificação das amostras de DNA.

Número da amostra	ng/ul	ABS260/280	Animais sequenciados com sucesso
(Rio Araguaia)			
1	48,89	0,978	Sim
2	1,69	1,89	Sim
3	8,65	1,45	Sim
4	18,39	0,368	Sim
5	41,29	0,826	Sim
6	47,34	0,947	Não
7	9,99	2,10	Não
8	34,99	0,700	Não
9	21,81	1,55	Não
10	54,19	1,64	Sim

12	23,28	1,47	Sim
13	4,93	1,6	Sim
14	33,95	1,68	Sim
16	20,74	1,65	Sim
17	39,98	1,56	Sim
18	30,55	1,83	Sim
19	14,76	1,79	Sim
22	12,01	1,79	Sim
24*	3,02	1,34	Não
26*	19,09	1,65	Não
27	28,03	1,69	Sim
29	1,91	1,81	Sim
32	17,67	1,7	Não
34*	15,67	1,72	Sim
36*	13,55	1,7	Sim
37*	5,62	1,87	Sim
39*	18,38	1,83	Sim
40*	22,72	1,54	Sim

41*	8,86	1,4	Não
42	2,13	3,81	Não
43	2,77	1,38	Não
45	1,43	1,54	Sim
46*	4,11	1,24	Não
47	1,69	0,38	Não
48*	0,27	1,51	Não
49	5,39	2,8	Sim
50*	2,48	1,98	Sim
NI1	2,97	1,71	Não
NI2*	2,54	1,43	Não
NI3	2,67	-0,29	Não
NI4*	-0,02	1,54	Não
NI5	10,77	1,59	Sim
NI6	8,79	1,33	Não
NI7	12,83	1,44	Sim
NI8	12,90	1,61	Sim
NI9	2,72	1,2	Não

NI10	61,81	1,72	Sim
NI11	12,79	1,72	Sim
NI12	23,14	1,65	Não
(Rio Crixás)			
1	66,56	1,82	Sim
2*	20,54	1,6	Não
3	87,88	1,7	Não
4*	50,56	1,74	Sim
5*	33,26	1,63	Sim
6	9,46	1,37	Não
7	24,07	1,85	Sim
8*	12,23	2,06	Sim
9*	9,91	1,65	Sim
10*	53,19	1,73	Sim
11*	39,21	1,8	Sim
12*	15,57	1,64	Sim
13*	20,54	1,8	Não
14*	100,96	1,79	Sim

15*	19,24	1,65	Sim
16	8,26	1,5	Sim
17	7,35	2,37	Sim
18	4,10	2,32	Sim
19	5,99	2,21	Sim
20*	34,95	1,86	Sim
21	0,87	5,54	Não
22	7,98	1,77	Sim
23	11,01	1,98	Sim
24	20,65	1,94	Sim
25	7,38	1,58	Sim
26	4,45	1,53	Sim
27	4,32	1,82	Sim
28	3,76	1,97	Sim
29	9,70	1,83	Sim
30*	1,64	2,78	Sim
31	2,07	2,64	Sim
32	17,52	1,92	Sim

33*	1,94	2,17	Não
34	2,60	26,72	Sim
35	11,19	1,75	Sim
36	3,07	1,86	Sim
37	12,55	2,25	Não
38	11,43	1,77	Sim
39	15,61	1,92	Sim
40	11,90	1,96	Sim
41	3,37	1,87	Sim
42	7,63	2,01	Sim
43	15,35	1,54	Sim
44	14,30	1,8	Sim
45	5,93	1,67	Sim
46	3,76	2,15	Sim
47*	4,86	1,98	Sim
48*	4,00	1,78	Sim
49	5,96	1,43	Não
50	6,19	1,81	Sim

* amostras que tiveram seus tecidos totalmente processados durante o experimento.

Padronização da reação de PCR

Em relação ao primeiro par de primers PRO e 12SR5, utilizou-se a reação padrão de PCR (Tabela 2) para um total de 06 amostras (sendo a 6ª representada pela água, usada como controle negativo). Após a PCR, uma eletroforese teste em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo foi realizado para verificar as amplificações. Como resultado não obteve-se o sucesso esperado.

Várias tentativas foram realizadas para otimizar esse par de primers (p. ex., variação na concentração de magnésio e temperatura de anelamento) mas nenhuma teve resultado satisfatório. Dessa forma a estratégia adotada foi fazer uma tentativa adicional com kit de PCR comercial, bem como iniciar os testes com segundo par de primers (etapas realizadas em setembro e outubro de 2010).

O resultado obtido revelou novamente insucesso com o par de primers PRO e 12SR5 (Figura 4), mas com o novo primer CR testado foi notada a amplificação das amostras (Figura 5), vale ressaltar que o programa utilizado no termociclador para esse primer se diferenciou como mostra a tabela 5, em material e métodos. Essas etapas foram realizadas nos meses de novembro e início dezembro.

A partir dos resultados descritos acima fez-se a padronização das reações de PCR passando o primer CR a ser utilizado via kit “Quiagem Master Mix” (a aplicação de todas as amostras se encontram nas figura 6, 7 e 8). As amostras que apresentaram amplificação foram purificadas conforme o protocolo apresentado na Tabela 4, em material e métodos, para em seguida serem seqüenciadas. Etapas essas realizadas no período de dezembro de 2010 a janeiro de 2011.

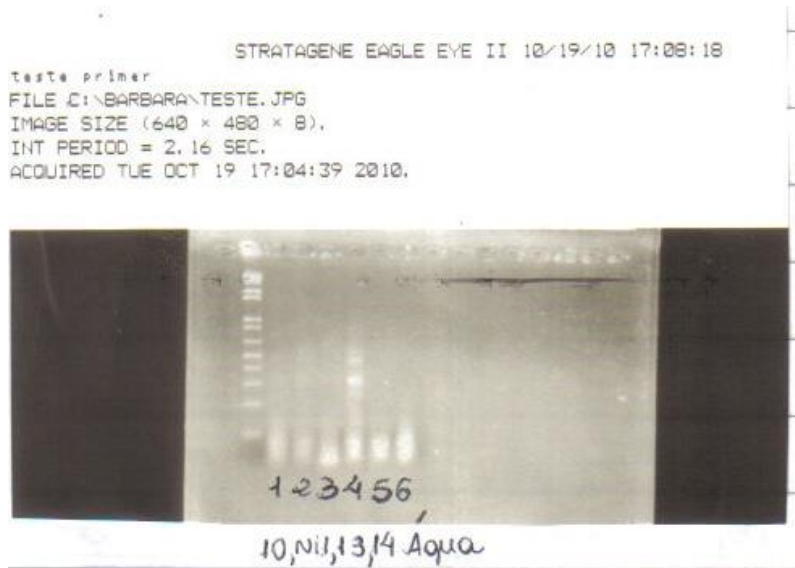


Figura 4. Primeiro teste padrão de PCR realizado com o par de primers PRO e 12SR5.

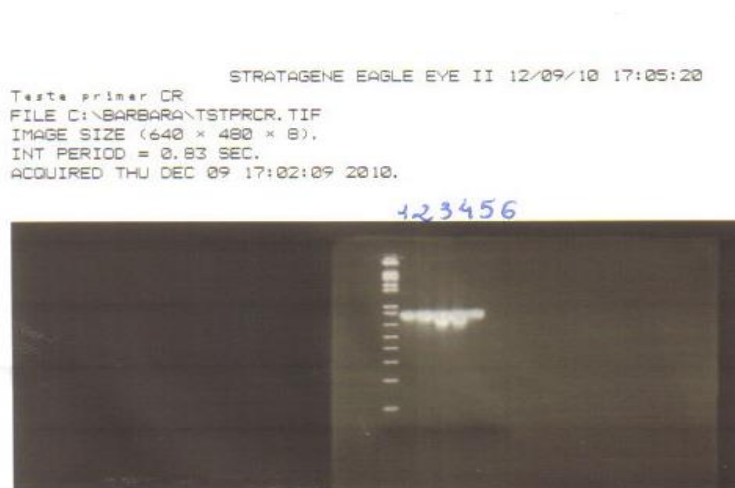


Figura 5. Teste de PCR via kit com o primer CR.



Figura 6. Amplificação do restante das amostras.



Figura 7. Amplificação do restante das amostras (Parte 2).



Figura 8. Amplificação do restante das amostras (Parte 3).

Purificação das amostras

A partir da amplificação das amostras via kit com o primer CR, ele passou a ser utilizado como padrão. Após o teste com o restante das amostras foi constatado um alto índice de não amplificação, principalmente aquelas que não haviam sido diluídas, o que impossibilitou o começo da purificação e sequenciamento, sendo adiado para fevereiro deste ano. Por este resultado, algumas amostras foram diluídas a fim de se fazer um teste via PCR visando a amplificação, onde como resultado de 7 amostras testadas, apenas 1 obteve amplificação na concentração de 1,5 ng/ul. Com efeito as demais amostras foram amplificadas aumentando-se a concentração na reação padrão para 2 ng/ul. Só após a amplificação da maioria elas foram purificadas e seqüenciadas.

Sequenciamento das amostras

Obteve-se sucesso no sequenciamento de 69 indivíduos. Para exemplificar, as figuras 9 e 10 mostram o resultado do sequenciamento de um dos indivíduos amostrados do rio

Araguaia em que obteve-se sucesso no sequenciamento (aproximadamente 450 pares de base aplicados), e as figuras 11 e 12 mostram, para outro indivíduo amostrado do mesmo rio o insucesso no sequenciamento (menos de 100 pares de bases amplificadas).

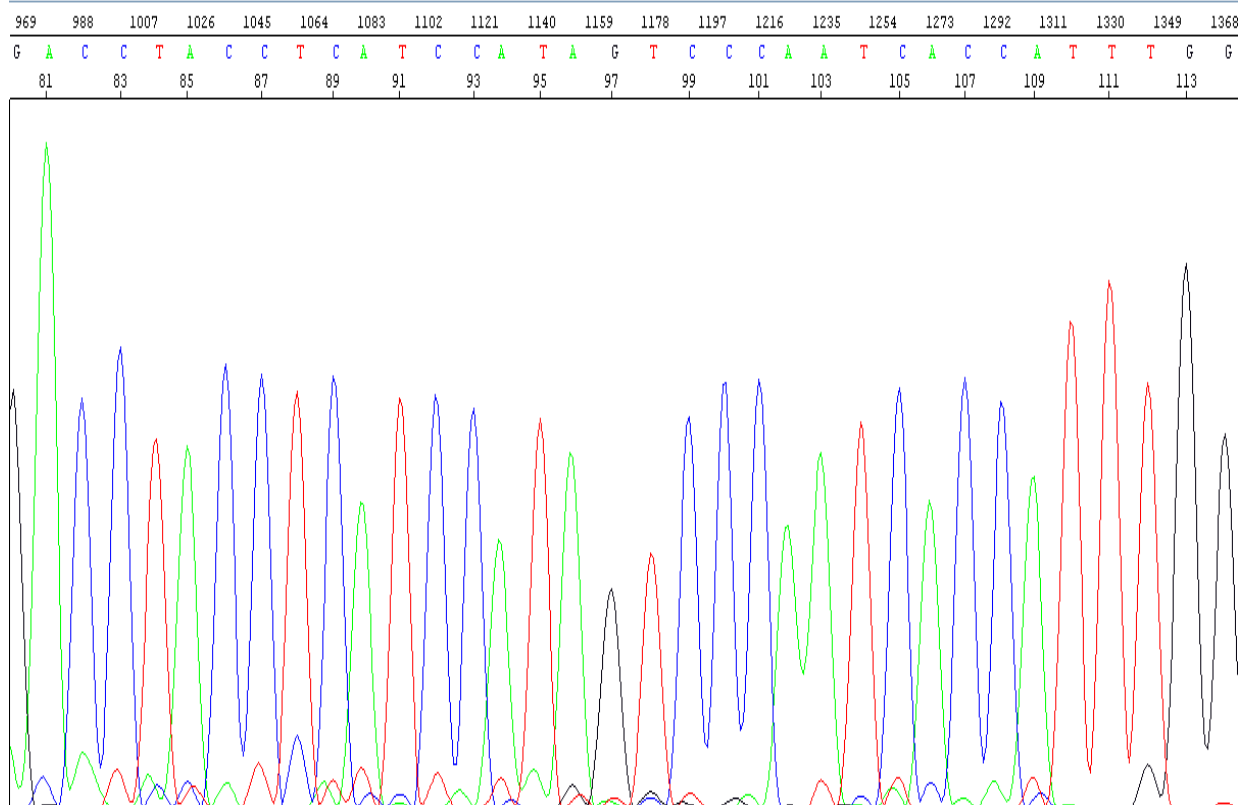


Figura 9. Eletroferograma do indivíduo 02 amostrado no rio Araguaia (primer CR-F).

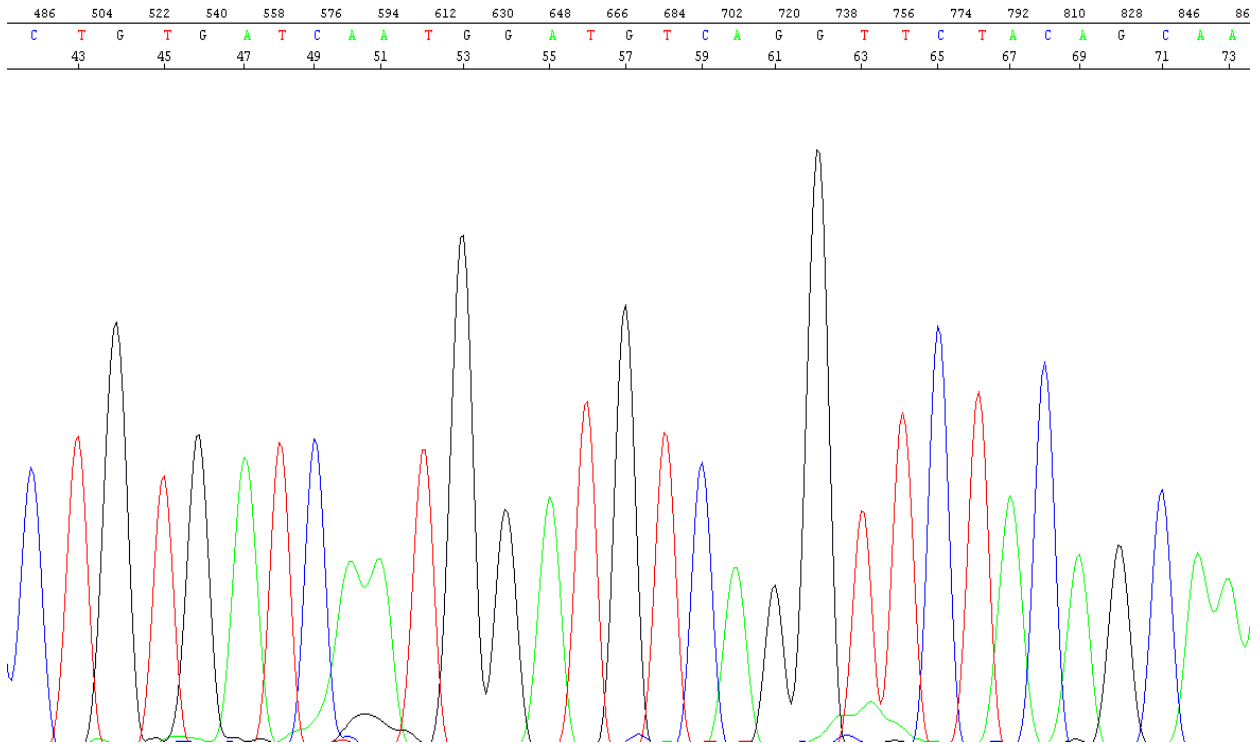


Figura 10. Eletroferograma do indivíduo 02 amostrado no rio Araguaia (primer CR-R).

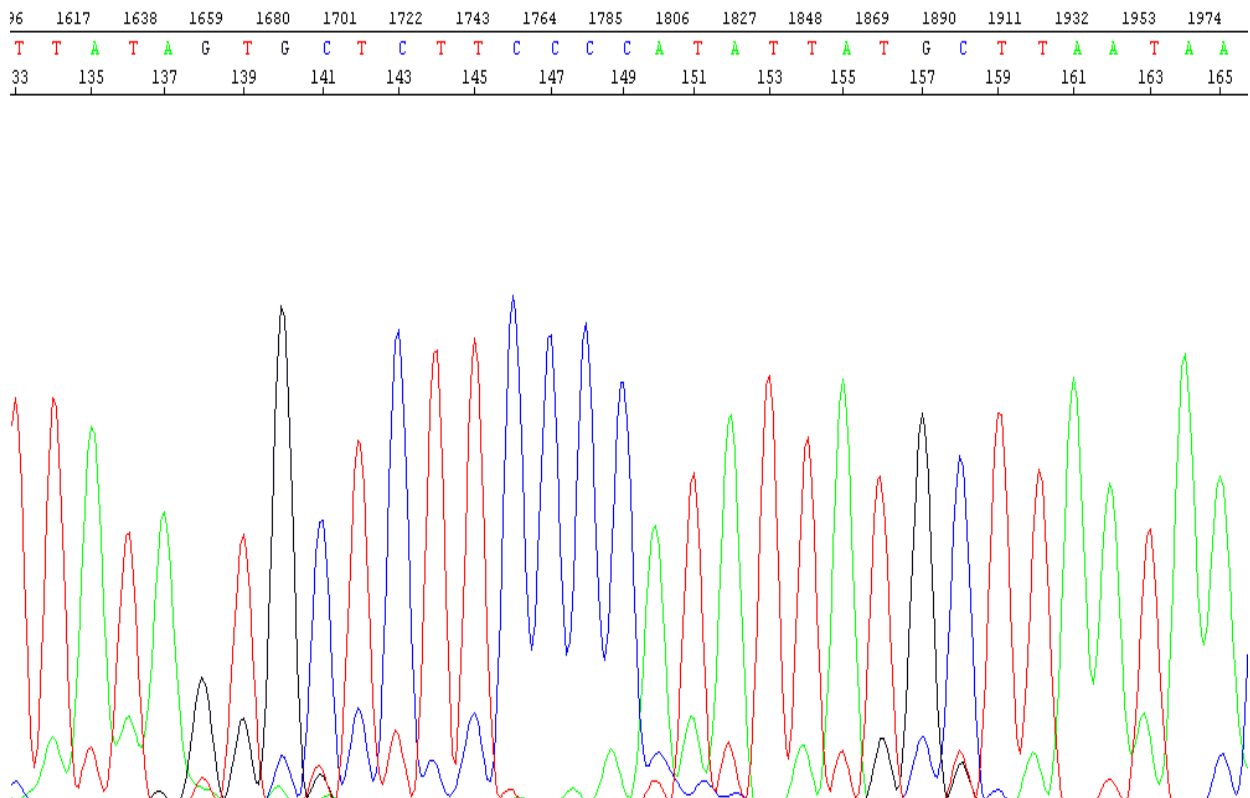


Figura 11. Eletroferograma do indivíduo 24 amostrado no rio Crixás Açú (primer CR-F).

2254	2277	2300	2323	2346	2369	2392	2415	2438	2461	2484	2507	2530	2553	2576	2599	2622	2645	2668																	
A	A	T	C	T	A	G	A	T	T	A	G	T	G	G	G	T	C	C	A	T	G	A	A	G	T	T	T	A	C	A	A	A	A	C	C
189	191	193	195	197	199	201	203	205	207	209	211	213	215	217	219	221	223																		

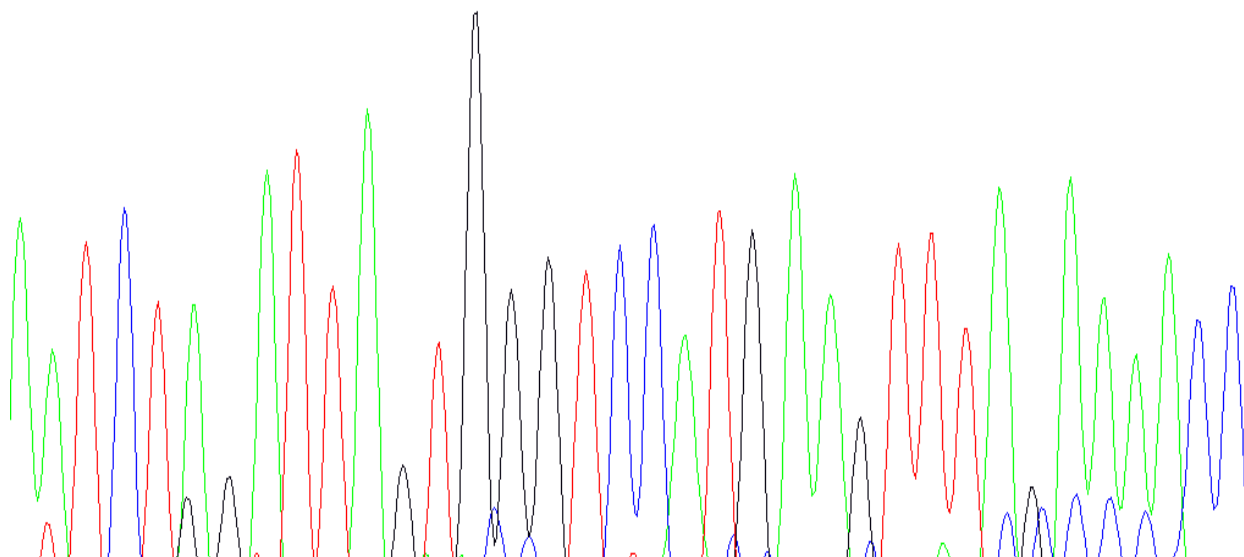


Figura 12. Eletroferograma do indivíduo NI4 amostrado no rio Crixás Açu (primer CR-R).

Foram sequenciados 519 pares de bases de regiões do mtDNA de 69 indivíduos provenientes das duas localidades pesquisadas. Nenhum polimorfismo foi identificado entre as populações dessas localidades. Para avaliar a diversidade da bacia hidrográfica pesquisada com outras que compõem a abrangência geográfica da espécie, o único haplótipo identificado foi comparado com 294 indivíduos da espécie que apresentam sequencias depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para essas mesmas regiões do mtDNA. Nestas comparações foram avaliadas 492 pares de bases que evidenciaram a existência de apenas 08 SNPs/08 haplótipos entre todos os animais (Tabela 12), com uma diversidade nucleotídica Pi de 0,0023 e uma diversidade haplotípica Hd de 0,519. O haplótipo identificado no presente estudo é o segundo mais frequente já observado para a espécie (80 dos 294 indivíduos analisados do GenBank) que, por sua vez, também foi observado nos rios Branco (RR), Purus (AM), Amazonas (AM), Tapajós (PA) e Xingu (PA), além da própria bacia do Araguaia.

Todas duas localidades amostradas no presente trabalho são inéditas para este tipo de marcador na bacia em pauta.

A análise de Network obtida a partir do modelo de *Median Joining* (Figura 13) evidenciou um padrão em formato de “estrela” esperado para populações que estão em expansão demográfica recente. Tal padrão foi formado em relação ao haplótipo 1, que por sua vez foi o mais comum e abundante dentro da espécie.

Tabela 12. Haplótipos identificados a partir do sequenciamento de parte da região controle do mtDNA de *Podocnemis expansa* e de seu banco de dados do GenBank.

Pontos significam mesma base em relação a referencia.

Haplótipo	Posição (referencia DQ352804)								Frequencia
	51	95	152	174	218	336	407	412	
H1	T	C	T	A	A	T	T	T	180
H2	C	1
H3	.	.	C	C	164
H4	.	T	C	C	8
H5	C	4
H6	C	.	.	1
H7	G	.	.	.	3
H8	G	.	1

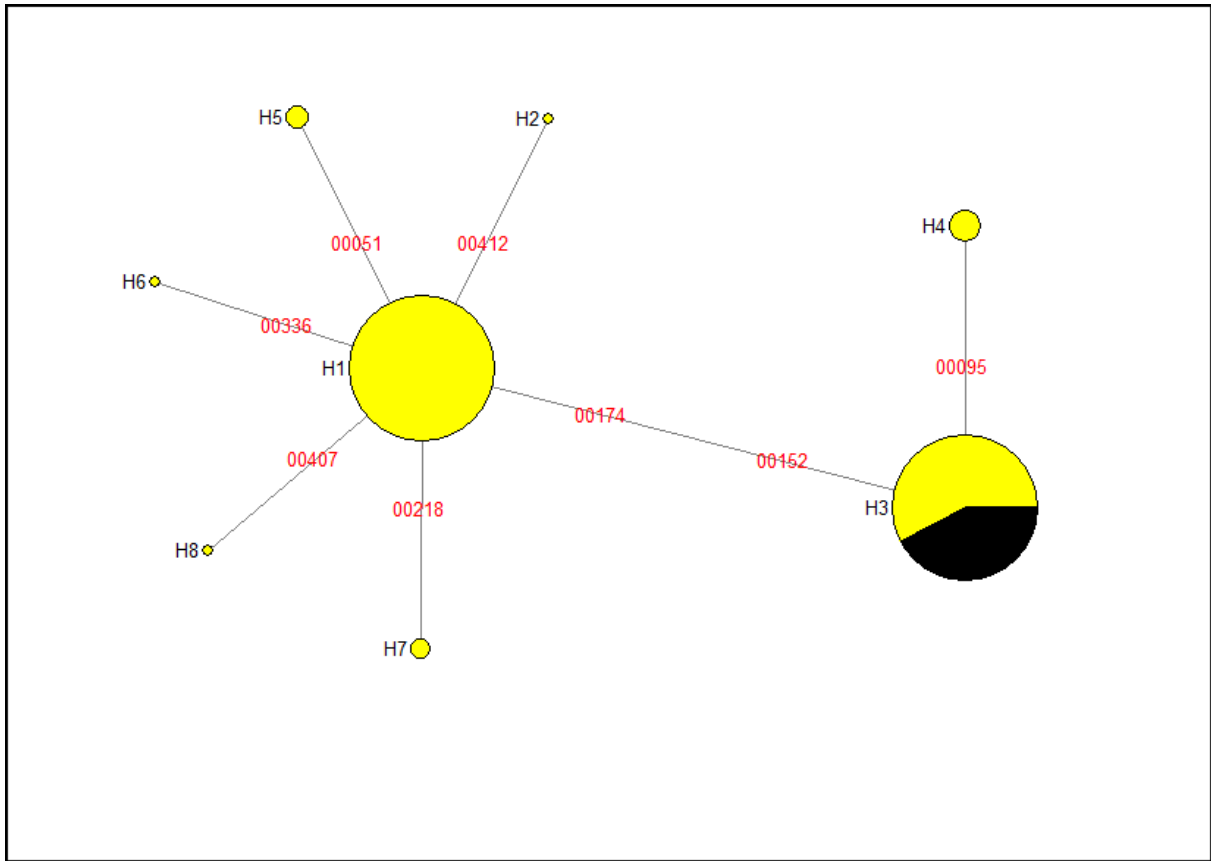


Figura 13. Análise de Network (Median Joining) em populações de *Podocnemis expansa*. Em negro estão destacados os animais sequenciados neste estudo.

Discussão

Os quelônios sempre constituíram um recurso da fauna silvestre de grande importância para as populações que vivem às margens dos rios e lagos amazônicos. Sua carne, excelente fonte de proteína, bem como os seus ovos, gordura e vísceras são de grande interesse às comunidades ribeirinhas (ALHO, 1991). O consumo indiscriminado de algumas espécies amazônicas, somado à destruição ou ocupação desordenada de seu ambiente natural, vêm provocando um declínio acentuado de suas populações.

A maior ameaça natural para as populações de quelônios é a predação de seus ovos e juvenis (WILSON, 1998; FERRI, 2002). Por séculos, os quelônios têm sido uma fonte de proteína na dieta de populações humanas que vivem em locais hostis e ambientes isolados, e ainda hoje em várias partes do mundo (PEZZUTI, 1998).

A gama de potenciais predadores para esse grupo animal é imensa, estendendo-se de invertebrados (formigas, por exemplo, podem invadir os ninhos e gradualmente devorar os embriões; moscas podem depositar seus ovos, que se desenvolvem em larvas, reduzindo a taxa de sobrevivência dos filhotes recém-eclodidos), pequenos e grandes mamíferos (carnívoros em sua maioria, mas também roedores e insetívoros utilizam dessa fonte de proteínas, predando ninhos, geralmente de postura recente), os filhotes são predados por aves e lagartos (geralmente quando abandonam o ninho). Nos cursos d'água os filhotes, juvenis e adultos podem ser predados por anuros, peixes carnívoros, mamíferos aquáticos (ariranhas, botos) e crocodilianos (jacarés e crocodilos) (ERNST & BARBOUR, 1989; PEZZUTI, 1998; FERRI, 2002; MALVASIO, 2001; FERREIRA Jr., 2003).

Os ninhos estão sujeitos às variações ambientais, como inundações. A seleção do local de nidificação pode diretamente influenciar as probabilidades do sucesso de um dado ninho (WILSON, 1998), e o sucesso também depende da variação climática anual (PEZZUTI &

VOGT, 1999). Alguns relatos indicam que as taxas de sobrevivência até a idade adulta de muitas espécies de quelônios ficam entre 1% e 2% (FERRI, 2002).

Além dos aspectos naturais que dificultam a sobrevivência dos quelônios, encontram-se também diversos fatores antrópicos. As várias alterações do hábitat, através das queimadas, desmatamento das matas ciliares, canalização de cursos d'água, aterramento de áreas alagadas, entre outras, causam impactos significativos sobre as populações de quelônios (FERRI, 2002; POUGH *et al.*, 2001; FERREIRA Jr., 2003).

Poucos são os relatos na literatura sobre as populações de quelônios para as regiões Centro-oeste e Norte do Brasil. Para *P. expansa*, pode-se citar o trabalho de BATAUS (1998), realizado na bacia do Araguaia (GO) e o de FACHIN-TERÁN & VOGT (2004) no Rio Guaporé (RO) e seus tributários.

Quando a população é muito pequena, catástrofes localizadas, doenças, desigualdades entre sexos e idade, e até mesmo cruzamento consanguíneo podem ameaçar sua viabilidade (SCHONEWALD-COX *et al.*, 1983).

O deslocamento dos quelônios após a desova é pouco conhecido. O estudo do uso do hábitat e da movimentação dos indivíduos na fase vegetativa do seu ciclo vital pode revelar a importância da conservação da região onde eles ocorrem (JOYAL *et al.*, 2001). No entanto, diante da dificuldade de estimar a dispersão de uma população de quelônios, visto que os indivíduos deslocam-se através de distantes áreas (citado por SITES *et al.*, 1999), determinar a fidelidade às áreas de desova através de estudos de marcação, incluindo marcadores genéticos, podem ser ideais para conhecer a estrutura metapopulacional da tartaruga da Amazônia em sua área de vida (SITES *et al.*, 1999). Análises de DNA mitocondrial podem revelar aspectos geográficos e históricos da dispersão dos quelônios, qual é a intensidade do fluxo gênico intra e inter-populações entre as bacias hidrográficas, e quais são os relacionamentos históricos entre as colônias de tartarugas (BOWEN *et al.*, 1993).

No caso específico das tartarugas, que são animais de vida longa, tardia maturidade sexual, e com crescimento e tamanhos populacionais de difícil estimativa em função de seus hábitos aquáticos e extensão das áreas de Cerrado e Amazônia, requerem-se vários anos contínuos de pesquisa para se obter dados sobre sua população (BATAUS, 1998). Segundo ODUM (1975), o tamanho populacional é o fator biológico que praticamente afeta toda a ecologia e as características de vida dos organismos.

Em 30 anos de execução do Programa Nacional de Conservação dos Quelônios Continentais conduzido pelo RAN, originário do Projeto Quelônios da Amazônia (PQA), foram manejados mais de 60 milhões de quelônios nos estados do Centro-oeste e Norte, destacando-se as espécies: tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*), tracajá (*P. unifilis*), pitiú ou iacá, (*P. sextuberculata*), e muçã (*Kinosternon scorpioidis*). Essa ação tem proporcionado a conservação e a recuperação das populações naturais dessas espécies e, conseqüentemente, da sóciobiodiversidade a elas associadas, haja vista que graças aos esforços deste Programa nenhuma dessas espécies foi listada em algum grau de ameaça no território brasileiro. Além da preservação e recuperação populacional destes frágeis e sobrexplorados animais, esse Programa tem subsidiado diversos estudos voltados à implementação de metodologias e normatização do uso sustentável deste importante recurso, como estratégia de conservação que ofereça alternativas de alimentação e renda para as comunidades residentes/usuárias de Unidades de Conservação.

O mtDNA pode ser encontrado em grande quantidade em todas as células e apresenta alta taxa de evolução, o que lhe implica grande variabilidade genética (ENGSTROM *et al.*, 2002). No presente estudo foram desenvolvidos testes com a região controle do DNA mitocondrial (d-loop), cuja função é de extrema importância já que ela é responsável por toda a sua regulação e transcrição. Devido a sua alta taxa de mutação, a região controle passou a

ser utilizada em populações em níveis intraespecíficos (STEWART e BARKER, 1994; STARKEY *et al.*, 2003).

Segundo pesquisa realizada por Viana *et al.* (2005) para o gênero *Podocnemis*, o par de primers PRO (5'-CCCATCACCCACTCCCAAAGC-3'), desenvolvido por Sites (comunicação pessoal, 2009), e 12SR5 (5'-GTCAGGACCATGCCTTTGTG-3'), desenvolvido por Kocher *et al.* (1989), foram bem sucedidos na amplificação de amostras, bem como na caracterização molecular dos indivíduos. Conexo, estes primers foram utilizados inicialmente neste estudo, no entanto, não se obteve sucesso de amplificação para as amostras testadas. Não foi possível afirmar que as amostras não amplificadas não tiveram resultado positivo no sequenciamento em virtude da baixa concentração de DNA, já que em algumas amostras, a saber, 03, 13, 39 do rio Araguaia e 09,18 e 19 do rio Crixás Açu, dentre outras, que apresentaram baixas concentrações na purificação do DNA, obteve-se êxito no sequenciamento (Tabela 11). Destaca-se que para a maioria das amostras obteve-se baixas concentrações de DNA.

Para avaliar a diversidade genética dessa bacia hidrográfica com outras que compõem a abrangência geográfica da espécie, o único haplótipo identificado foi comparado com 294 indivíduos da espécie que apresentam sequencias depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para essas mesma regiões do mtDNA. Nestas comparações foram avaliadas 492 pares de bases que evidenciaram a existência de apenas 08 SNPs/08 haplótipos entre todos os animais, com uma diversidade nucleotídica Pi de 0,0023 e uma diversidade haplotípica Hd de 0,519.

Nenhum polimorfismo foi encontrado entre as populações dos locais pesquisados, com efeito, sugere-se uma homogeneidade dos animais amostrados nestas localidades, bem como a inexistência de estrutura populacional.

O haplótipo identificado no presente estudo é o segundo mais frequente já observado para a espécie (80 dos 294 indivíduos analisados) que, por sua vez, também foi observado nos rios Branco (RR), Purus (AM), Amazonas (AM), Tapajós (PA) e Xingu (PA), além da própria bacia do Araguaia.

As duas localidades amostradas neste estudo são inéditas para este tipo de marcador dentro da bacia em pauta. Sendo assim é possível hipotetizar futuras ações de translocação visando o revigoramento populacional da tartaruga da Amazônia na bacia do Araguaia, como forma de mitigar o processo de homogeneização gênica (homozigose) para a espécie nesta região, visto a baixa estrutura populacional observada neste trabalho e na literatura consultada. Contudo, para translocações de, por exemplo, animais entre Bacias hidrográficas, é necessário a realização de novas coletas mais abrangentes, bem como adição de novos marcadores, talvez genômicos, de forma que a a formulação de medidas de conservação seja realizada de forma mais holística e eficiente favorecendo, balizada por conclusões mais sólidas.

Os dados desta pesquisa corroborarão com novos trabalhos correlatos no intuito de inferir se o número baixo de desovas (população em desequilíbrio) está relacionado à diminuição da variabilidade genética na região. Além disso, subsidiará também a análise comparativa entre as duas populações, no sentido de se avaliar se há fluxo gênico entre elas, quantificando-o, caso existente. Para isso será necessário a adição de mais marcadores para confirmar o padrão observado por este presente estudo.

Agradecimentos

- Ao ICMBio/PIBIC pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa de apoio à pesquisa que viabilizou a realização deste trabalho.
- Ao RAN pela proposição deste trabalho, coleta das amostras biológicas e supervisão técnica para o desenvolvimento da pesquisa e realização deste relatório monográfico.
- À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disponibilização do Laboratório de Genética Animal (LGA) e dos recursos materiais usados neste trabalho, e em especial pelo apoio técnico do Dr. Samuel Rezende Paiva, responsável pelo LGA.

Bibliografia

- ALHO, C.J.R. & PÁDUA, L.F.M. Early growth of pen-reared Amazon turtles (*Podocnemis expansa*) (Testudinata, Pelomedusidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v.42, n.4, p.641-646. 1982.
- BATAUS, Y.S.L. Estimativa de Parâmetros Populacionais de *Podocnemis expansa* (SCHWEIGGER, 1812) no Rio Crixas-açu (GO) a Partir de Dados Biométricos. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ecologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 58p. 1998.
- BONIN, F., DEVAUX, B., AND DUPRÉ, A. Toutes les Tortues du Monde. Paris: Delachaux and Niestle, 416 pp. 2006.
- BOWEN, B.B., NELSON, W.S., AND AVISE, J.C. A molecular phylogeny for marine turtles: Trait mapping, rate assessment, and conservation relevance. *Proceedings of the National Academy of Science* 90:5574-5577. 1993.
- CANTARELLI, V.H. The Amazon Turtles – Conservation and Management in Brazil. Em Van Abbema, J. (Ed) *Proceedings: Conservation, Restoration, and Management of Tortoises and Turtles – An International Conference*. New York: New York Turtle and Tortoise Society. p. 407-410. 1997.
- DALE, G.; CHAPARRO, J. Integration of molecular markers into tree breeding and improvement programs. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF.1997.
- ENGSTROM, T.N., H.B SHAFFER, AND W.P. MCCORD. Phylogenetic diversity of endangered and critically endangered southeast Asian softshell turtles (Trionychidae: Chitra). *Biological Conservation* 104:173-179. 2002.
- ENGSTROM, T. N., EDWARDS. T., OSENTOSKI, M. F., and MYERS, E. M. A compendium of PCR primers for mtDNA, microsatellite, and other nuclear loci for freshwater turtles and tortoises. In: Shaffer, H.B., FitzSimmons, N.N., Georges, A., and Rhodin, A.G.J.

- (Eds.). Defining Turtle Diversity: Proceedings of a Workshop on Genetics, Ethics, and Taxonomy of Freshwater Turtles and Tortoises. Chelonian Research Monographs No. 4, pp. **xx-xx**. 2007.
- ERNST, C.H. & BARBOUR, R.W. Turtles of the World. Washington, Smithsonian Institution Press. 313p.1989.
- FACHÍN-TERÁN, A.; & VOGT,R.C. Estrutura populacional, tamanho e razão sexual em *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) no Rio Guaporé (RO), norte do Brasil. Phyllomedusa, Journal of Neotropical Herpetology, v.3, n.1, p.29-42. 2004.
- FERREIRA JR. P.D. Influência dos processos sedimentológicos e geomorfológicos na escolha das áreas de nidificação de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-amazônia) e *Podocnemis unifilis* (tracajá), na bacia do rio Araguaia. 2003. 296p. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Minas. Departamento de Geologia, Ouro Preto. (Contribuições às Ciências da Terra, vol. 3).
- FERRI, V. Turtles & Tortoises: A Firefly Guide. Firefly Books. 256p. 2002.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPALIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ed. EMBRAPA-CENARGEN: Brasília. 220p. 1998.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Projeto Quelônios da Amazônia - 10 anos. Ministério do Interior- IBAMA- Brasília. 1989.
- IUCN - International Union for Conservation of Nature and Natural Resources – 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em:<<http://www.redlist.org>> Acessado em 27 out. 2004.
- IVERSON, J.B. Patterns of survivorship in turtles (order Testudines). Can. J. Zool., v.69, p.385-391. 1991.

- JOYAL, LA; MCCOLLOUGH, M.M.L; HUNTER, J.R. Ecologia da paisagem abordagens para áreas úmidas conservação das espécies: um estudo de caso de duas tartarugas espécies no sul do Maine. *Conservation Biology* 15:1755-1762. 2001.
- KOCHER,T.D.; THOMAS, W.K.; MEYER,A., EDUARDES, S.V.; PAABO, S.; VALLABLANCA, F.X.; WILSON, A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86: 6196-6200.1989.
- KUMAR, S.; J. DUDLEY; M. NEIM & K. TAMURA.K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 299-306. 2008.
- MALVASIO, A. Aspectos do mecanismo alimentar e da biologia reprodutiva em *Podocnemes expansa* (Schweigger, 1812), *Podocnemes unifilis* (Troschel, 1848) e *P. sextuberculata* (Cornalia, 1809)(Testudines, Pelomedusidae). 2001.199p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Faculdade de zoologia, Instituto de biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- MOLL, D.;MOLL,E.O.The ecology, exploitation and conservation of river turtles. New York: Oxford University Press.420p.2004.
- MOLINA, F.B; ROCHA, M.B. Identificação, caracterização e distribuição dos quelônios da Amazônia brasileira. Apostila da aula ministrada no mini-curso “Metodologia de pesquisa e classificação de quelônios” IN: Encontro sobre quelônios da Amazônia. 1996. Belém. Anais... CENAQUA/IBAMA. p.1-25. 1996.
- ODUM, E. Fundamentos da ecologia. Filadélfia, PA: Saunders.1975.
- POSADA D. and CRANDALL K.A.. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 13757-13762, 2001.

- PEZZUTI, J.C.B. Reprodução de iacá, *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Pelomedusidae), na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas, concentração em Ecologia) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Universidade do Amazonas, Manaus. 66p. 1998.
- PARHAM, J. F., SIMISON, W. B., KOZAK, K. H., FELDMAN, C. R., and SHI, H. T. New Chinese turtles: endangered or invalid? A reassessment of two species using mitochondrial DNA, allozyme electrophoresis and known-locality specimens. *Animal Conservation*. 4:357-367.2001.
- PEARSE, D.E., ARNDT, A.D., VALENZUELA, N., MILLER, B.A., CANTARELLI, V., AND SITES, J.W., JR. Estimating population structure under non-equilibrium conditions in a conservation context: continent- wide population genetics of the giant Amazon river turtle *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemidae). *Molecular Ecology* 15:985-1006. 2006.
- PEZZUTI, J.C.B. & VOGT, R.C. Nesting ecology of *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Pelomedusidae) in the Japurá river, Amazonas, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology*, v.3, n.3, p.419-424. 1999.
- POUGH, F.H.; ANDREWS, R.M.; CADLE, J.E.; CRUMP, M.L.; SAVITZKY, A.H. & WELLS, K.D. *Herpetology*. 2.ed. Prentice Hall, New Jersey. 612p. 2001.
- POUGH, F.H.; JANIS, C.M. & HEISER, J.B, *A Vida dos Vertebrados*. Atheneu Editora – São Paulo (SP), 699p. 2003.
- POUGH,F.H.; ANDREWS, R. M.; CADLE,J.E.; CRUMP, M.L.; SAVITSKY,A.H.; WELLS,K.D. *Herpetology*. 3rd ed. New Jersey: Pearson prentice hall.736p. 2003.
- POUGH, F.H.; HEISER, J.B.; JANIS,C.M. *A vida dos vertebrados*. 4.ed. São Paulo: Atheneu Editora. 684p. 2008.

- PRITCHARD, P.C.H. & TREBBAU, P. The Turtles of Venezuela. Caracas, Society for Study of Amphibians and Reptiles. 403p. 1984.
- PRITCHARD, P.C.H. Encyclopedia of Turtles. New Jersey: T.F.H. Publications, 1979. 285p.
- RAMÍREZ, M.V; CHIARI. Y; CASTAÑO-MORA, O.V; MENKEN, S.B.J. Low genetic variability in the endangered Colombian endemic freshwater turtle *Podocnemis lewyana* (Testudines, Podocnemididae). Contributions to Zoology, 76 (1) 1-7. 2007.
- ROZAS.J ; LIBRADO. P; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C; MESSEGUER, X & ROZAS.R. DnaSP v5. Universitat de Barcelona. 2010.
- SBH- Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2005. Lista Brasileira de Répteis. Disponível em:<[Http://sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm](http://sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm)>. Acessado em 04 de março de 2011.
- STARKEY, D.E., H.B. SHAFFER, R.L. BURKE, M.R.J. FORSTNER, J.B. IVERSON, F.J. JANZEN, A.G.J. RHODIN, AND G.R. ULTSCH. Molecular systematics, phylogeography, and the effects of Pleistocene glaciation in the painted turtle (*Chrysemys picta*) complex. Evolution 57:119-128. 2003.
- SCHONEWALD-COX, C. M., S. M. CHAMBERS, B. MacBRYDE, and W. L. THOMAS. Genetics and Conservation - a reference for managing wild animal and plant populations. Benjamin/Cummings, Menlo Park, California. 1983.
- STEWART, D.T. AND A.J. BAKER. Evolution of mtDNA Dloop sequences and their use in phylogenetic studies of shrews in the subgenus *Otrisorex* (Sorex: Soricidae: Insectivora). Molecular Phylogenetics and Evolution 3:38-46. 1994.
- SITES JW, NN FITZSIMMONS, SILVA NJ, CANTARELLI VH .Conservation genetics of the Giant Amazon River Turtle (*Podocnemis expansa*, Pelomedusidae) - inferences from two classes of molecular markeres. Chelon. Conserv. Biol. 3: 454-463. 1999.

- VALENZUELA, N. Genetic differentiation among nesting beaches in the highly migratory giant river turtle (*Podocnemis expansa*) from Colombia. *Herpetologica*, **57**, 48–57. 2001
- VERÍSSIMO, J. A pesca na Amazônia. Monografias Brasileiras III. Rio de Janeiro: Livraria Clássica de Alves. 207p. 1895.
- VIANA, M.N.S. Ecologia Molecular de Quelônios do Gênero *Podocnemis* (Pleurodira: Pelomedusidae) da Amazônia Brasileira. Defesa de tese para aquisição de título de doutorado em genética e biologia molecular. UFPA. Belém - PA. 2005.
- VOGT, R.C. Tartarugas da Amazônia. Lima, Peru: Gráfica Biblos. 104p. 2008.
- WHITLOCK, M.C.; MCCAULEY, D.E. Indirect measures of gene flow and migration, $F_{ST} \neq 1/(4Nm + 1)$. *Heredity*, **82**, 117–125. 1999.
- WILSON, D.S. Nest-site selection: Microhabitat variation and its effects on the survival of turtles embryos. *Ecology*, v.79, n.6, p.1884-1892. 1998.