

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

**ESTUDO DO SISTEMA REPRODUTIVO DE *PODOCNEMIS UNIFILIS*
(TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE, TROSCHER 1848) UTILIZANDO
MARCADORES MICROSSATÉLITES.**

Bolsista: Gabriel Muca do Vale Pereira

Manaus
2009

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

RELATÓRIO FINAL
PIB-B/008/2008

**ESTUDO DO SISTEMA REPRODUTIVO DE *PODOCNEMIS UNIFILIS*
(TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE, TROSCHEL 1848) UTILIZANDO
MARCADORES MICROSSATÉLITES.**

Bolsista: Gabriel Muca do Vale Pereira
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Neves Silva Viana
Colaborador: Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende

Manaus
2009

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>P. unifilis</i>	08
Figura 2. Mapa de distribuição de <i>P. unifilis</i>	08
Figura 3. Gel de produto de PCR do DNA de <i>P. unifilis</i>	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.Quantidade de alelos por <i>primer</i> analisado	19
---	----

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	06
1.1. Família Podocnemididae	07
1.2. <i>Podocnemis unifilis</i>	08
1.3. Sistemas de acasalamento e sistema reprodutivo.....	10
1.4. Marcadores moleculares.....	11
1.5. Marcadores microssatélites	11
1.6. Estudos de paternidade no gênero <i>Podocnemis</i>	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Coleta do material	15
3.2. Extração de DNA	15
3.3. Amplificação <i>in vitro</i> via PCR.....	15
3.4. Reação de Genotipagem.....	17
3.4. Análise Genotípica	17
3.5. Análises Estatísticas – Paternidade Múltipla	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	25

1. INTRODUÇÃO

A ordem Testudines compreende os répteis terrestres e aquáticos se que desenvolveram a 200 milhões de anos, na Era Mesozóica, um sistema de proteção e defesa diferenciado. Eles apresentam o corpo envolvido por duas conchas ósseas, uma carapaça dorsal e um plastrão ventral, que estão ligados lateralmente por uma ponte óssea; as suas mandíbulas são desenvolvidas, assumindo a forma de um bico córneo; ausência de dentes; língua não extensível; presença de pálpebras; pescoço geralmente retrátil e com oito vértebras cervicais; membros basicamente pendáctilos; são ovíparos e não apresentam cuidados parentais; podendo ser encontrados nas regiões tropicais e temperadas (Orr, 1986).

Estes animais são conhecidos popularmente como quelônios, e são vertebrados amniotas, anapsidos e ectotérmicos (regulam a temperatura corpórea mediante a exposição direta aos raios solares). 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 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 entre onze a quinze anos para as fêmeas (IBAMA, 1989).

Os quelônios são classificados em duas subordens de acordo com a maneira que recolhem a cabeça para dentro do casco. Os Cryptodira (*crypto* = escondido, *dire* = pescoço) retraem a cabeça curvando o pescoço na forma de um S vertical, enquanto os Pleurodira (*pleuro* = lado) retraem a cabeça curvando o pescoço horizontalmente (Pough *et al.*, 2003). Divididos nestas duas subordens existem quatorze famílias, e a América do Sul possui uma rica fauna de quelônios, onde podemos encontrar representantes de nove destas famílias (Rueda – Almonacid *et al.*, 2007).

1.1 Família Podocnemididae

Dentro da subordem Pleurodira se encontra a família Podocnemididae, que reúne três gêneros de quelônios dulcícolas: *Erymnochelys* (Baur, 1888) que é monoespecífico, sendo *Erymnochelys madagascariensis* encontrada somente na ilha de Madagascar; *Peltocephalus* (Duméril & Bibron, 1835), também monoespecífico, *Peltocephalus dumerilianus* é amplamente distribuído pelas bacias dos rios Orinoco e Amazonas, sudoeste da Venezuela, leste da Colômbia, nordeste do Peru e sudeste da Guiana Francesa (Vogt, 2008); e *Podocnemis* (Wagler, 1830), que é o mais representativo, pois apresenta seis espécies viventes, sendo quatro destas encontradas na Amazônia: *P. expansa* (Schweigger, 1812), *P. erythrocephala* (Spix, 1824), *P. unifilis* (Troschel, 1848) e *P. sextuberculata* (Cornalia, 1849).

Esse grupo de tartarugas se caracteriza por retrair o pescoço lateralmente debaixo da carapaça, ausência de um escudo nugal e possuir o dorso da cabeça coberto com escamas grandes justapostas. Na maior parte das espécies da família, a cabeça dos machos é mais escura que a das fêmeas e quase sempre os adultos conservam as manchas que apresentam quando juvenis (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007).

Os podocnemidídeos sul-americanos constituem um grande recurso para os habitantes da região, sendo explorados para o uso de sua carne, ovos, óleo, e outros valiosos produtos para a sobrevivência de comunidades que vivem as margens dos rios. Entre suas espécies, a mais apreciada é a tartaruga-da-amazônia, que é a maior tartaruga de água doce do continente, e da qual se chegou a capturar, em um só ano, mais de 50 milhões de indivíduos (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007).

1.2 *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848)

Podocnemis unifilis (Figura 1), conhecida popularmente na região amazônica como tracajá, é encontrada amplamente distribuída no norte da América do Sul, na Guiana Francesa, Guiana, Suriname, leste da Colômbia e do Equador, nordeste do Peru e ao longo das bacias dos rios Amazonas e Orinoco e seus afluentes (Vogt, 2008) (Figura 2). Este quelônio é essencialmente aquático, não possui hábito migratório, e é facilmente encontrado em rios de água preta, clara e branca, em lagos e reservatórios.



Figura 1. Filhote de *Podocnemis unifilis*.

Fonte: <http://www.tc.umn.edu/~gambl007/brturtles.htm>



Figura 2. Mapa de distribuição de *Podocnemis unifilis*.

Fonte: Vogt, 2008

Quanto à alimentação, esta espécie é considerada generalista sendo predominantemente herbívora, ingerindo macrófitas aquáticas como aguapé e gramíneas; e em algumas ocasiões, moluscos e frutos que caem durante a estação chuvosa. No entanto, segundo Fachín-Terán *et al.* (1997), a dieta desta espécie em cativeiro é onívora, tornando-lhe mais bem adaptada ao cativeiro em relação a *P. expansa*.

Diferentemente da tartaruga-da-amazônia, a fêmea de tracajá desova isoladamente em barrancos às margens dos rios e lagos, geralmente antes das enchentes (Pritchard & Trebbau, 1984). Estudos realizados para o acompanhamento desta espécie na Reserva Biológica do rio Trombetas/PA demonstraram que as covas são de aproximadamente 17 cm de profundidade. A quantidade de ovos por cova pode variar de sete a 27, apresentando em média 19 ovos, e o período de incubação de 58 a 66 dias (Haller & Rodrigues, 2005).

Podocnemis unifilis é muito predada por populações ribeirinhas, sendo a segunda espécie mais consumida na região, e esse alto consumo está associado à qualidade de sua carne e por seus ovos terem grande reserva de gordura (Branco, 1997). Devido à intensa exploração pelo homem, esta espécie é tida como vulnerável pela União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) ou World Conservation Union (2008).

Após a publicação da portaria 142/92-P, que regulamentou a criação em cativeiro para comercialização da tartaruga-da-amazônia (*P.expansa*) e do tracajá (*P. unifilis*), houve um aumento da procura por tais espécies. Desta forma, faz-se necessário, além dos estudos ecológicos já existentes, estudos genéticos e sobre o sistema reprodutivo deste animal, para que sirvam de suporte na elaboração de projetos adequados à conservação desta espécie.

1.3 Sistemas de acasalamento

Denomina-se sistema de acasalamento o conjunto de estratégias e interações sociais que ocorrem entre os indivíduos férteis de sexos opostos de uma população e formam um contexto? dentro do qual tem lugar a união de gametas (Carranza, 1994).

O sistema de acasalamento dos vertebrados está intrinsecamente associado à competição por recursos como a disponibilidade de alimento, os locais de reprodução e os parceiros em potencial. Estes recursos afetam diretamente os indivíduos dos dois sexos e, dependendo da distribuição destes recursos, estes darão a um dos sexos a oportunidade de possuir acasalamentos múltiplos, pelo controle de acesso a esses recursos (Emlen & Oring, 1977; Oring, 1982).

O acasalamento pode ser categorizado em monogamia ou poligamia. A monogamia refere-se a uma ligação de parceiros, entre um macho e uma única fêmea. A poligamia refere-se a uma situação na qual um indivíduo tem mais de um parceiro durante uma estação reprodutiva.

A poligamia pode ser exibida tanto pelos machos quanto pelas fêmeas. Quando um macho acasala-se com mais de uma fêmea denomina-se poligamia, enquanto que a poliandria ocorre quando uma fêmea acasala-se com dois ou mais machos (Del Hoyo *et al.*, 1992). Para as fêmeas, a grande vantagem de realizar várias cópulas com diferentes machos é a competição dos espermatozóides pela fecundação do óvulo. Esta competição deve selecionar os melhores espermatozóides, aumentando assim, a aptidão dos filhotes e, portanto, aumentando o sucesso reprodutivo da fêmea (Birkhead, 2000; Madsen *et al.*, 1992; Parker, 1970).

1.4 Marcadores moleculares

A genética nos permite conhecer a diversidade de alelos nos vários locos de uma espécie, e é esta variabilidade gênica que nos permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes. A variabilidade genética, ou diversidade molecular, além de ser muito importante para a evolução, pode ser usada para verificar as afinidades e os limites entre as espécies, para estimar níveis de migração e dispersão nas populações, e para detectar modos de reprodução e estrutura familiar (Viana, 2005).

A variabilidade gênica é a base na qual se fundamenta a evolução adaptativa, devido à seleção natural que atua sobre as variantes ocorrentes dentro das populações em função da adaptação ao ambiente. E esta variabilidade pode ser analisada atualmente, a partir de numerosas técnicas disponíveis que utilizam marcadores moleculares.

O marcador molecular ideal para estudos genômicos seria um de fácil uso e que diferenciase locos com alelos co-dominantes, que fornecesse valores não ambíguos, e preferivelmente com alta variação. Marcador genético é um marcador molecular, definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou uma sequência direta da estrutura do DNA, que segue os padrões mendelianos de herança quanto à sua segregação (Queller *et al.*, 1993; Ferreira e Grattapaglia, 1995).

1.5 Marcadores microssatélites

Diferentes experimentos realizados no início da década de 1980 demonstraram que genomas eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de seqüências repetidas, umas mais complexas e outras mais simples (Hamada *et al.*, 1982; Tautz & Renz, 1984).

Microsatélites consistem em seqüências curtas, repetidas em tandem com um a quatro nucleotídeos de comprimento, distribuídas aleatoriamente no genoma dos eucariotos em frequência alta (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Também são conhecidos como seqüências simples repetidas (SSR), repetições em tandem com número variável (VNTR) e repetições curtas em tandem (STR). Um loco microsatélite tipicamente varia em tamanho entre cinco e 40 repetições, sendo que é possível à ocorrência de séries de repetições mais longas (Selkoe & Toonen, 2006).

Os locos dos microsatélites são multialélicos co-dominantes, e evoluem através de processos mutacionais decorrentes de escorregões da DNA polimerase (*slippage*) durante a replicação ou de *crossing over* desigual (Eisen, 1999). Estes também apresentam uma taxa de mutação de 10^{-2} a 10^{-6} por loco por geração, produzindo assim um alto nível de diversidade alélica necessária para estudos genéticos (Schlötterer 2000). Apesar de suas taxas evolutivas altas, eles são conservativos em suas regiões flangeadoras (DNA ao redor dos locos microsatélites), podendo estas persistir por um longo período sem modificações (Zardoya *et al.*, 1996).

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

Os marcadores microsatélites constituem a classe de marcadores moleculares mais polimórficas conhecida atualmente, podendo ser utilizada em diversos estudos. Entretanto, apresenta uma limitação tecnológica, que se refere à grande quantidade de trabalho envolvida

para o desenvolvimento prévio dos marcadores, aliada ao alto custo de um empreendimento desta natureza (Ferreira e Grattapaglia,1998).

1.6 Estudos de paternidade em *Podocnemis*

O primeiro estudo que investigou o modo reprodutivo de uma espécie de *Podocnemis* foi realizado por Valenzuela (2000), cujo trabalho comprovou a existência de paternidade múltipla em dois ninhos, de oito analisados, de *Podocnemis expansa* do Rio Caquetá (Colômbia), utilizando oito locos de microssatélites.

Pearse *et al.* (2006), também trabalhando com *P. expansa* utilizou sete locos de microssatélites em 32 ninhos na Venezuela, encontrou paternidade múltipla em apenas 10,3% dos ninhos analisados, mostrando a existência de diferenças no padrão de paternidade entre diferentes populações desta espécie.

Com relação a *P. unifilis*, Fantin *et al.* (2008) evidenciou a presença de paternidade múltipla nesta espécie, em estudos com animais oriundos de Barreirinha (AM), ao analisar seis ninhos com o total de 66 indivíduos recém-eclodidos utilizando oito locos de microssatélites.

Este tipo de reprodução pode estar associado a benefícios com relação à paternidade única, devido ao aumento da variabilidade genética da prole, e diminuição da probabilidade de produção de ovos inférteis.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar o sistema reprodutivo de *Podocnemis unifilis*, para verificar a possível existência de contribuição de mais de um macho em uma ninhada, estudando indivíduos recém-eclodidos.

2.2 Específicos

- Estimar o tipo de sistema reprodutivo de *P. unifilis* em cinco ninhos coletados no Rio Guaporé – Rondônia, utilizando marcadores microssatélites;
- Verificar a existência de paternidade múltipla entre os indivíduos dos ninhos estudados;
- Determinar o nível de parentesco entre os indivíduos dos ninhos estudados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material

Foram estudadas 72 amostras de sangue de *P. unifilis*, coletadas a partir de indivíduos recém-eclodidos de cinco ninhos provenientes do Rio Guaporé - Rondônia. O método utilizado para a coleta do sangue foi à punção da veia femural usando seringa de 1 ml, sendo coletados em torno de 100 µl de sangue, que em seguida foram conservados em microtubos tipo *ependorf* contendo 500 µl de etanol absoluto. Os filhotes foram liberados no próprio local de captura. Após a coleta as amostras de sangue foram catalogadas e adicionadas à Coleção de Tecidos de Genética Animal (CTGA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

3.2 Extração de DNA

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

3.3 Amplificação *in vitro* via PCR

O DNA extraído foi submetido à Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) seguindo o protocolo econômico descrito por Schuelke (2000), onde se adiciona a cauda M13 a um dos *primers* e marca-se somente o *primer* M13 com a fluorescência desejada, neste caso, TET. As condições de termociclagem estão divididas em duas etapas: na primeira etapa, o *primer forward* com sua sequência M13 (-21) é incorporado ao produto de PCR; na etapa seguinte,

quando o *primer forward* tiver sido totalmente utilizado, a temperatura de anelamento é reduzida para que ocorra o anelamento do *primer* universal M13 (-21), que funciona como *forward*, a fim de que seja incorporada ao produto do PCR a fluorescência. Por esta razão, a quantidade de *primer forward* será menor que do *primer reverse*.

Seguindo este protocolo a reação de PCR foi feita num tubo tipo *epENDORF* 0,2 ml, ajustada para um volume final de 10µL, contendo 4,3µL de Água MilliQ, 0,7µL de MgCl₂, 0,8 µL de dNTP, 1,0 µL de Tris-HCL, 0,5µL do *Primer Forward* M13, 0,5 µL do *Primer* M13, 1,0 µL do *Primer Reverse*, 0,2 µL de Taq polimerase e 1,0 µL de DNA. A reação será realizada em um termociclador, onde foi amplificada a região de DNA microssatélite desejada. A temperatura inicial de desnaturação será de 94°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos à 94°C por 50 segundos; 55°C à 64°C, dependendo da temperatura específica de anelamento para cada *primer* por 50 segundos; e 72°C por 1 minuto. Logo após, são realizados 10 ciclos à 94°C por 40 segundos, 53°C por 35 segundos e 72°C por 40 segundos, para anelamento do *primer* M13; com extensão final à 72°C por 20 minutos.

O produto amplificado foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para que a eficiência da reação seja constatada. Neste procedimento, foram utilizados 2µL do produto de PCR juntamente com 2µL de azul de bromofenol, e um marcador de peso molecular conhecido (100 pb), para posterior comparação e estimativa da concentração do DNA em análise. Após o término da corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e observado em um transluminador de luz ultravioleta VDS.

Neste estudo foram utilizados cinco locos de microssatélites descritos por Fantin *et al.* (2007) para as análises: Puni_1B2, Puni_1D9, Puni_1E1, Puni_2E7, Puni_1H9.

3.4 Reação de Genotipagem

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

3.5 Análise Genotípica

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

3.6 Análise estatística - Paternidade Múltipla

Usando o método mínimo de contagens de alelos (Myers & Zamudio, 2004), que pressupõe uma distribuição Mendeliana dos alelos na progênie, considera-se a presença de cinco alelos por loco amostrado entre os filhotes de cada ninho um indicativo de paternidade múltipla, se nenhum alelo maternal for conhecido (dois alelos maternos, dois alelos de um macho, o quinto de um segundo macho).

Utiliza-se também a análise de paternidade baseada na inferência dos genótipos maternos, os quais são identificados pela presença de filhotes homozigotos por loco dentro de um ninho. Um alelo materno pode ser inferido quando um filhote é homozigoto de um dado locus (AA), e o genótipo maternal completo pode ser inferido, quando filhotes são homozigotos para dois diferentes alelos (AA e BB; genótipo materno = AB). Quando um alelo materno pode ser inferido, estima-se paternidade múltipla para um ninho, se a análise de um loco indicar a presença de quatro alelos; e se os dois alelos maternos puderam ser detectados, a presença de três alelos no loco analisado indica paternidade múltipla no ninho.

A análise de paternidade também se baseia no coeficiente de probabilidade de parentesco (r_{xy}) realizado na versão 1.2 do programa KINSHIP (Goodnight & Queller, 1999). Este tipo de análises não é dependente do conhecimento dos alelos maternos ou paternos. Este programa necessita das frequências alélicas de cada loco analisado da população, que será obtida através do Programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

No cálculo dos valores de (r), assume-se que não existe desequilíbrio de ligação, endocruzamento e taxas de mutação. O programa estima dois valores de verossimilhança para cada par de indivíduos dentro da agregação para duas hipóteses, a primeira hipótese considera algum nível de relacionamento, e a hipótese nula considera que não existe nenhum tipo de relacionamento, onde os valores de P_{xm} , P_{ym} , P_{xp} e P_{yp} são as frequências alélicas da população, e X e Y são os indivíduos testados. A partir destes valores, é calculada uma taxa para os pares de indivíduos que resulta em uma matriz simétrica dos valores de relacionamento entre eles. Os coeficientes de parentesco são: $\leq 0,12$ (os indivíduos são considerados primos); $= 0,25$, (meio irmãos) e $\geq 0,50$ (irmãos verdadeiros).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As reações de PCR foram realizadas para os cinco locos com todos os indivíduos. Após a amplificação, foi feita uma eletroforese, em gel de agarose, do produto da PCR para verificar a qualidade da reação (Figura 3). Em seguida, estes locos foram genotipados e adicionados ao banco de dados. Todas as reações que falharam foram refeitas para que continuassem as análises.

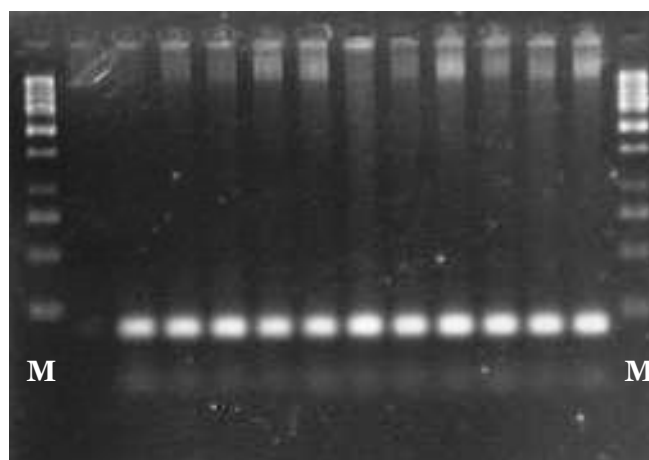


Figura 3. Gel de produto de PCR do loco 1E1 de *P. unifilis*.

Após os locos serem amplificados, foi verificada a eficiência da genotipagem através de uma análise no programa *Fragment Profiler*, que nos disponibiliza os números e tamanhos dos alelos dos indivíduos amostrados.

A montagem do banco de dados foi realizada com todas as amostras, sendo o número máximo de alelos encontrado de quatro, enquanto que o mínimo foi um. Estes resultados encontram-se discriminados na Tabela 1 para todos os ninhos.

Tabela 1. Quantidade de alelos por loco analisado.

<i>Primer's</i>	<i>Ninho 1</i>	<i>Ninho 2</i>	<i>Ninho 3</i>	<i>Ninho 4</i>	<i>Ninho 5</i>
Puni_1B2	2	1	3	4	4
Puni_1E1	2	1	2	1	1
Puni_1H9	3	1	3	4	3
Puni_2E7	2	2	2	1	2
Puni_2F6	3	4	3	3	3

Com estes dados, podemos indicar através do método de contagens de alelos, a existência da contribuição genética de apenas um macho para cada um dos ninhinhos analisados, demonstrando que, para estes locos, não foi detectada a paternidade múltipla nos ninhinhos analisados.

Fantin *et al.* (2008), trabalhando com 66 indivíduos de seis ninhinhos coletados em uma praia do município de Barreirinha – AM, em análises com oito locos, detectou a participação de até seis machos em cada ninho, comprovando assim a existência de poliandria para as fêmeas de tracajá nesta região. Embora este comportamento não tenha sido encontrado nos ninhinhos analisados no Rio Guaporé pode-se considerar a existência de poliandria para a espécie, mas que esse comportamento pode não ser uma regra.

Comparando os dados de Pearse *et al.* (2006), que analisou 32 ninhinhos de *P. expansa* provenientes da Venezuela com sete locos de microssatélites e encontrou paternidade múltipla em apenas 10,3% dos ninhinhos, com os de Fantin *et al.* (2008) que encontrou paternidade múltipla em 100% dos ninhinhos analisados de tracajá provenientes de Barreirinha/AM podemos considerar a que existem diferenças no padrão de paternidade entre as espécies do gênero.

O único trabalho de paternidade, realizado anteriormente, para tracajá detectou paternidade múltipla em 100% dos ninhinhos (Fantin *et al.*, 2008). Relacionando este estudo ao presente, onde constatamos a participação de apenas um macho na fertilização dos ovos, pode indicar que pode ser que não exista um padrão no sistema de acasalamento para esta espécie, ou, a existência de algum fator externo, como a proporção entre machos e fêmeas na localidade estudada, poderia estar influenciando o resultado encontrado.

A ausência de poliandria na amostra populacional estudada evidenciou um padrão diferente dos estudos já realizados sobre o sistema de acasalamento para este gênero. Deste

modo, fazem-se necessários o desenvolvimento de outros trabalhos com amostras de localidades diferentes das já estudadas, pois somente assim, poderemos confirmar se *P. unifilis* segue, ou não, um padrão com relação à estratégia reprodutiva, bem como, se esta população pode ser uma exceção. Associando estes dados a informações ecológicas poderemos verificar também se algum fator externo está influenciando o sistema de acasalamento como, por exemplo, a proporção macho/fêmea na população estudada.

5. REFERÊNCIAS

- Birkhead, T. R. 2000. Promiscuity: an evolutionary approach of sperm competition. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Branco, S. M. O desafio Amazônico. 17ª Edição. São Paulo: Editora Moderna, Coleção Polêmica. 1997.
- Carranza, J. 1994. Introducción a la ciencia del comportamiento. Universidade de Extremadura, Cáceres.
- Del Hoyo, J., Elliot, A. S. & Sargatal, J. 1992. Handbook of the birds of the world. Lynx Edicions, Barcelona.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13 – 15.
- Eisen, J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds Goldstein, D.B. & Schlötterer, C.). Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 34–48.
- Emlen, S. T. & Oring, L. W. 1977. Ecology, sexual selection and the evolution of mating systems. *Science*, **197**, 215-223.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Fachín-Terán, A.; Vogt, R. C.; Thorbjarnarson, J. B. 2003. Estrutura Populacional, Razão Sexual e Abundância de *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemididae) na Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, Amazonas, Brasil.
- Fantin, C.; Carvalho, C. F.; Hrbek, T.; Sites JR, J. W.; Monjeló, L. A. S.; Astolfi-Filho, S.; Farias, I. P. 2007. Microsatellite DNA markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle. *Molecular Ecology Notes*
- Fantin, C.; Viana, L. S.; Monjeló, L. A. S.; Farias, I. P. 2008. Polyandry in *Podocnemis unifilis* (Pleurodira; Podocnemididae), the vulnerable yellow-spotted Amazon River turtle. *Amphibia-Reptilia* 29 (2008): 479-486
- Ferreira, M. E. e Grattapaglia, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília. EMBRAPA-CENARGEM, pp. 220.
- Goodnight, K. F. & Queller, D. C. 1999. Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology*, 8, 1231-1234.
- Hamada, H., Petrino, M. G. & Kakunaga, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA forming potencial is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6465-6469.

IBAMA. 1989. Projeto Quelônios da Amazônia, 10 anos. Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília.

IUCN 2007. 2007 IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em <www.iucnredlist.org>. Acessado em: 29 Março de 2008.

Madsen, T., Shine, R., Loman, J. & Hakansson, T. (1992). Why do female adders copulate so frequently? *Nature*, **355**, 440-441.

Myers, E. M. & Zamudio, K. R. (2004). Multiple paternity in an aggregate breeding amphibian: the effect of reproductive skew on estimates of male reproductive success. *Molecular Ecology*, **13**, 1951-1963.

Oring, L. W. (1982). Avian mating systems. In *Avian Biology*, eds. D. S. Farner, J. R. King & K. C. Parkes, Vol. 6, Academic. New York, pp. 1-92.

Orr, Robert T. *Biologia dos Vertebrados*. 5ª Edição. São Paulo: Editora Roca Ltda., 1986.

Parker, G. A. (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol. Rev.*, **45**, 525-567.

Pearse, D. E., Dastrup, R. B., Hernandez, O. & Sites Jr, J. W. (2006). Paternity in an Orinoco Population of Endangered Arrau River Turtles, *Podocnemis expansa* (Pleurodira; Podocnemididae), from Venezuela. *Chelonian Conservation and Biology*, **5**(2), 232-238.

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

Queller, D. C., Strassmann, J. E. and Hughes, C. R. 1993. Microsatellites and kinship. *TREE* **8**: 285-298.

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.

Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, **109**, 365-371.

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

Selkoe, K. A. & Toonen, R. J. 2006. Reviews and syntheses - Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite marks. *Ecology Letters* **9**(5): 615-629.

Tautz, D. & Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, **12**, 4127-4138.

Troschel, F. H. 1848. Amphibien. (In: PRITCHARD, P. C. H., e TREBBAU, P. 1984. *Turtles of Venezuela*. Soc. Stud. Amphib. Rept. p: 65)

Valenzuela, N. 2000. Multiple paternity in side-neck turtles *Podocnemis expansa*: evidence from microsatellite DNA data. *Molecular Ecology* 9: 99-105.

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.

Vogt, Richard C. Tartarugas da Amazônia. Gráfica Bíblos, 2008.

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

6. Cronograma de Atividades

Nº	Descrição	Ago 2008	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2009	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
01	Extração de DNA das Amostras	R	R	R	R								
02	Amplificação do Material através de PCR				R	R	R	R	R				
03	Genotipagens				R	R	R	P	R				
04	Organização do Banco de Dados das Genotipagens					R	R	R					
05	Análise dos Resultados							R	R	R	R	R	
06	Levantamento Bibliográfico	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
07	Elaboração do Resumo e Relatório Final									R	R	R	
08	Preparação da Apresentação Final para o Congresso											R	P

R = Realizada; P = Prevista.