

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DO INPA**

**Proteínas plasmáticas na estimativa da variabilidade  
genético-populacional da tartaruga da Amazônia  
(*Podocnemis expansa* Schweigger, 1812)**

**ARLISSON SILVA DE MOURA**

**Manaus-Amazonas  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ARLISSON SILVA DE MOURA**

**Proteínas plasmáticas na estimativa da variabilidade  
genético-populacional da tartaruga da Amazônia  
(*Podocnemis expansa* Schweigger, 1812)**

**ORIENTADOR: AYLTON SATURNINO TEIXEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Conservação e Biologia Evolutiva do INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética da Conservação e Biologia Evolutiva.

**Manaus-Amazonas  
2009**

## Ficha Catalográfica

M929           Moura, Arlisson Silva de  
                  Proteínas plasmáticas na estimativa da variabilidade genético-  
                  populacional da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*  
                  Schweigger, 1812) /  
                  Arlisson Silva de Moura .--- Manaus : [s.n.], 2009.  
                  xii, 69 f. : il. color.

Dissertação (mestrado)-- INPA, Manaus, 2009  
Orientador : Aylton Saturnino Teixeira  
Área de concentração : Genética

1. Proteínas plasmáticas. 2. *Podocnemis expansa*. 3. Estrutura  
genética de populações. 4. Variação temporal. 5. Hipótese de Refúgios.  
I. Título.

CDD 19. ed.

### SINOPSE

O presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial das proteínas plasmáticas na identificação dos estoques da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa* Schweigger, 1812). Foram analisados por meio da técnica de eletroforese em gel de amido três sistemas protéicos e quatro enzimáticos extraídos do plasma sanguíneo de três amostras populacionais (Uatumã-AM, Trombetas-PA e Tapajós-PA). As zonas de atividade eletroforética reveladas foram codificadas presumivelmente por 11 locos, dos quais, sete mostraram-se monomórficos (*PG-1*, *PG-2*, *EST-1*, *EST-2*, *PGM-1*, *SOD-1* e *SOD-2*) e quatro polimórficos (*Tf*, *Alb*, *MDH* e *PGM-2*). Uma estruturação genética moderada foi detectada entre as amostras. Os dados foram ainda tentativamente interpretados a luz da hipótese de Refúgios.

À minha esposa Fabiana Oliveira, aos meus pais Francisco de Lima e Maria Luiza, dedico esta dissertação.

Aprendendo se ensina, e ensinando se aprende.

Provérbio latino

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter me abençoado, amparado e sempre me mostrado a saída nos momentos adversos.

Ao Dr. Aylton pela orientação, incentivo e confiança, e sua família pela amizade.

Agradeço de forma especial a minha esposa pelo amor, carinho, compreensão e por estar sempre me animando e apoiando nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Maria Luiza e Francisco de Lima, meus tios Maria de Nazaré, Raimundo Moura, Edinelza e João, meus irmãos, Adélisson, Maiza, e Marlisson, aos membros de toda minha família paraense e amazonense, que próximos ou mesmo distantes, pelo apoio, confiança, alegria e maravilhosos momentos compartilhados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEv) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pela aquisição parcial de alguns itens de consumo, e as secretárias Hercília, Alessandra e Elci, que muito colaboraram nos trâmites administrativo-burocráticos.

A Secretaria da Coordenação de Pesquisas em Biologia Aquática (CPBA/INPA), ao Centro de Preservação e Pesquisas de Quelônios Aquáticos (CPPQA) da Usina Hidroelétrica de Balbina, a Reserva Biológica do Trombetas, a Universidade Federal do Pará (UFPA), a Universidade Federal de Roraima (UFRR), pelo apoio e infra-estrutura durante a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), e a Secretária Municipal de Educação (SEMED-Manaus) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Joselita Maria Mendes dos Santos, Dr. Juarez Carlos Brito Pezzuti, Dra. Maria das Neves Silva Viana, Dra. Maria Iracilda da Cunha Sampaio, e Dra. Vera Margarete Scarpassa, pela avaliação crítica e valiosas sugestões.

Ao Dr. José Celso, Dr. Celso Morato, Dr. Carlos Lemos, Dr. Luis Reginaldo, Dra. Eliana Feldberg, Dr. Richard Carl Vogt e Msc. Lígia Costa, que muito contribuíram com material literário e pelo apoio laboratorial.

Ao Paulo Henrique, Nicola Tancredi, Gilmar Klein, Raimundo Cruz, Selbert Jati e suas respectivas equipes de apoio pela ajuda no trabalho de campo.

Ao João Alfredo pelo suprimento de material literário. Em especial, a Cristina Silva por ter me ensinado a técnica de eletroforese e pela incansável ajuda nas análises laboratoriais. Ao Juracy pela ajuda com os programas de análises estatístico-populacionais.

Ao pessoal da coleção de Répteis e Anfíbios do INPA pela colaboração na busca de fontes literárias, ao Sr. Lito pela inestimável ajuda técnica no Laboratório Úmido da CPBA/INPA, e ao Atílio pelo suprimento de ração aos animais.

Ao Sr. Domingos Deonildo Perin pelo fornecimento de amostras de sua fazenda de criação de tartarugas no município do Cantá, Roraima.

Aos colegas de turma Elizabeth, Leila, Rodrigo, Alessandra, Suzana, Fabiola, Izaura, Bárbara, Mariana, Joel, Mauro, Alexandre, Ed, Gracinha, Melina, e muitos outros pela amizade e companherismo em vários momentos durante o curso.

Aos colegas do Laboratório de Genética Animal e Citogenética de Peixes, Renata, Brenda, Carlos Valentin, Leila, Kaka, Rodrigo e Carlos, pela ajuda durante as atividades laboratoriais e pela amizade, Aos meus amigos Andréa, Arino, Luiz, William Rangel e Júnior, pelo apoio, amizade e momentos de descontração.

A todas as pessoas e aos colegas, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.



## Resumo

O presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial das proteínas plasmáticas na identificação dos estoques da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa* Schweigger, 1812). Por meio da técnica de eletroforese em gel de amido três sistemas protéicos: transferrina (Tf), albumina (Alb) e proteínas gerais (PG), e quatro enzimáticos: esterase (EST – EC 3.1.1.1), fosfoglucomutase (PGM – EC 2.7.5.1), malato desidrogenase (MDH – EC 1.1.1.37) e superóxido dismutase (SOD – EC 3.15.1.1), extraídos do plasma sanguíneo de três amostras populacionais: Uatumã-AM, Trombetas-PA e Tapajós-PA, foram analisadas. As zonas de atividade eletroforética nos géis foram codificadas presumivelmente por 11 locos, dos quais, sete mostraram-se monomórficos (*PG-1*, *PG-2*, *EST-1*, *EST-2*, *PGM-1*, *SOD-1* e *SOD-2*) e quatro polimórficos (*Tf*, *Alb*, *MDH* e *PGM-2*). Na comparação da distribuição alélica e genotípica, dos quatro locos polimórficos, assumindo-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg, o *MDH* foi o único que não exibiu um bom balanço genético-populacional. Análises do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para testar a hipótese de segregação independente entre os pares de locos polimórficos examinados, não revelaram diferenças estatisticamente significativas. Tabelas de contingência para cálculo do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) aplicados para examinar a distribuição dos alelos do loco *Tf*, não revelaram variação temporal estatisticamente significativa ( $\chi^2 = 3.05$ ,  $0.70 > P > 0.50$ ) nas áreas amostradas. Mesmo com todas as pressões existentes, sobretudo devido ao alto consumo humano da tartaruga da Amazônia na região, os programas de conservação das populações naturais vêm garantindo a manutenção da variabilidade genética das mesmas ao longo do tempo, pelo menos para o loco *Tf*. As estimativas de variação genética revelaram os maiores valores de polimorfismo (36,36%), número médio de alelos por loco (1,36) e heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) (0,1211), na amostra populacional do Tapajós. Nas estimativas da estrutura genético-populacional, utilizando a estatística  $F$  ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  e  $F_{ST}$ ) de Wright, os valores médios detectados para  $F_{IS}$  e  $F_{IT}$  de 0,1347 e 0,1912, são considerados moderado e moderadamente alto, respectivamente. O valor médio de  $F_{ST}$  foi de 0,0652, indicando uma diferenciação genética moderada entre as amostras populacionais examinadas, onde, os locos que mais contribuíram para essa diferenciação foram o *MDH* e *PGM-2*. A estimativa de fluxo gênico expressa como número de migrantes por geração ( $Nm$ ) entre as amostras populacionais foi de 3,58. O dendrograma baseado no método UPGMA ilustra o menor distanciamento genético entre as amostras populacionais do Uatumã e Trombetas, onde, tais amostras presumivelmente, fazem parte de uma grande população panmítica, i.e. um mesmo estoque, bem como o maior distanciamento genético destas amostras em relação à amostra do Tapajós. Testes exatos de diferenciação populacional das comparações par-a-par entre as amostras populacionais, revelaram diferenças estatísticas altamente significativas, entre todas as comparações feitas com a amostra populacional do Tapajós. Os dados ora apresentados, apontam para uma possível existência de subpopulações “estoques” distintas de *P. expansa* na área amostrada. Recomenda-se, em especial, que a região do Tapajós seja mais pesquisada, e os programas de preservação e manejo da tartaruga da Amazônia mais intensificados em toda região amazônica a fim de manter a variabilidade genética de suas populações. Os dados foram ainda tentativamente interpretados a luz da hipótese de Refúgios.

## Abstract

This study aimed to test the potential of plasma proteins in the identification of the Amazon turtle stocks (*Podocnemis expansa* Schweigger, 1812). Through the starch gel electrophoresis technique three protein systems: transferrin (Tf), albumin (Alb) and general protein (GP), and four enzymes: esterase (EST - EC 3.1.1.1), phosphoglucomutase (PGM - EC 2.7.5.1), malate dehydrogenase (MDH - EC 1.1.1.37) and superoxide dismutase (SOD - EC 3.15.1.1), extracted from blood plasma from three population samples: Uatumã-AM, Trombetas-PA and Tapajós-PA, were tested. The zones of electroforetic activity in the gels were presumably coded by 11 loci, of which seven were monomorphic (*PG-1*, *PG-2*, *EST-1*, *EST-2*, *PGM-1*, *SOD-1* and *SOD-2*) and four polymorphic (*Tf*, *Alb*, *MDH* and *PGM-2*). Comparing the genotypic and allelic distribution of the four polymorphic loci detected, the *MDH* locus was the only one that did not show good genetic balance according to Hardy-Weinberg expectations. The chi-square ( $\chi^2$ ) analyses to test the hypothesis of independent segregation between the pairs of polymorphic loci examined, revealed no statistically significant differences. Contingency tables for calculating the chi-square ( $\chi^2$ ) applied to examine the distribution of alleles of the *Tf* locus, revealed no statistically significant temporal variation ( $\chi^2_{(5)} = 3.05$ ,  $0.70 > P > 0.50$ ) in the areas sampled. Despite all existing pressures due especially to the high human consumption of the Amazon turtle in the region, programs for the conservation of its natural populations are ensuring the maintenance of the genetic variability of this species over time, at least for the *Tf* locus. Estimates of genetic variation showed the highest values of polymorphism (36.36%), average number of alleles per locus (1.36) and mean expected heterozygosity ( $H_e$ ) (0.1211), in the Tapajós sample. From the analysis of population genetic structure using *F* statistics ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  and  $F_{ST}$ ) of Wright the average values detected for  $F_{IS}$  and  $F_{IT}$  of 0.1347 and 0.1912, are considered moderate and moderately high, respectively. The average value of  $F_{ST}$  was 0.0652, indicating a moderate genetic differentiation between population samples examined, where the loci that contributed most to this difference were the *MDH* and *PGM-2*. The estimated gene flow expressed as number of migrants per generation ( $Nm$ ) between population samples was 3.58. The dendrogram based on UPGMA method illustrates the smallest genetic distance between population samples of Trombetas and Uatumã, where such samples are presumably part of a large panmictic population i.e. the same stock, and the largest genetic distance of these samples in relation to the Tapajós sample. Exact test for population differentiation of pairwise comparisons between the population samples, revealed highly significant statistical differences among all comparisons made with the sample of Tapajós. The data presented herein point to a possible existence of distinct subpopulations "stocks" of *P. expansa* in the area sampled. It is especially recommended that the region of the Tapajós must be a further researched and programs for the preservation and management of the *P. expansa* more intensified in the whole Amazon region in order to maintain the genetic variability of its populations. Furthermore the data were tentatively interpreted in the light of the refuge hypothesis.

## Sumário

Ficha Catalográfica .....	ii
Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Tabelas .....	xi
Lista de Figuras.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1. Amazônia e a sua biodiversidade.....	1
1.2. A tartaruga da Amazônia ( <i>Podocnemis expansa</i> ), sua distribuição, abundância e conservação.....	2
1.3. A captura e pesca de quelônios na Amazônia .....	4
1.4. Cariotipia e marcadores genético-moleculares em tartaruga da Amazônia..	6
1.5. Marcadores protéico-isoenzimáticos na caracterização genética dos estoques.....	8
1.6. O porquê do uso de plasma como fonte de proteínas em estudos genético-populacionais? .....	9
1.6.1. Transferrina (Tf) .....	10
1.6.2. Albumina (Alb) .....	11
1.6.3. Proteínas gerais (PG) .....	11
1.6.4. Esterase (EST – E.C.3.1.1.1).....	12
1.6.5. Fosfoglucomutase (PGM – E.C.5.4.2.2).....	12
1.6.6. Malato desidrogenase (MDH – E.C.1.1.1.37).....	13
1.6.7. Sorbitol desidrogenase (SDH – E.C.1.1.1.14) .....	13
1.6.8. Superóxido dismutase (SOD – E.C.1.15.1).....	14
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo geral .....	15
2.2. Objetivos específicos .....	15
3. Material e métodos.....	16
3.1. Inspeção aos locais de coleta das amostras populacionais de tartaruga ...	16
3.2. Coleta e estocagem do material biológico .....	16
3.3. Nomenclatura enzimática.....	17
3.4. Procedimentos eletroforéticos gerais.....	18
3.5. Coloração dos sistemas protéicos.....	19
3.5.1. Transferrina (Tf).....	19
3.5.2. Albumina (Alb) .....	19
3.5.3. Proteínas gerais (PG) .....	20

<b>3.6. Coloração dos sistemas enzimáticos .....</b>	<b>20</b>
<b>3.6.1. Esterase (EST – EC 3.1.1.1) .....</b>	<b>20</b>
<b>3.6.2. Fosfoglucomutase (PGM – EC 5.4.2.2) .....</b>	<b>20</b>
<b>3.6.3. Malato desidrogenase (MDH – EC 1.1.1.37).....</b>	<b>20</b>
<b>3.6.4. Sorbitol desidrogenase (SDH – EC 1.1.1.14).....</b>	<b>21</b>
<b>3.6.5. Superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1) .....</b>	<b>21</b>
<b>3.7. Testes genético-estatísticos .....</b>	<b>22</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1.2. Albumina (Alb).....</b>	<b>28</b>
<b>4.1.3. Proteínas gerais (PG).....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.1. Esterase (EST – EC 3.1.1.1) .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.2. Fosfoglucomutase (PGM – EC 5.4.2.2) .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2.3. Malato desidrogenase (MDH – EC 1.1.1.37).....</b>	<b>32</b>
<b>4.2.4. Sorbitol desidrogenase (SDH – EC 1.1.1.14).....</b>	<b>33</b>
<b>4.2.5. Superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1) .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3. Desequilíbrio de ligação.....</b>	<b>34</b>
<b>4.4. Medidas de variabilidade genética .....</b>	<b>34</b>
<b>4.5. Estrutura genética e teste de homogeneidade populacional.....</b>	<b>35</b>
<b>4.6. Distância genética .....</b>	<b>37</b>
<b>5. Discussão .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1. Padrões eletroforéticos monomórficos .....</b>	<b>38</b>
<b>5.2. Padrões eletroforéticos polimórficos.....</b>	<b>38</b>
<b>5.3. Desequilíbrio de ligação.....</b>	<b>41</b>
<b>5.4. Avaliação temporal do loco Tf .....</b>	<b>42</b>
<b>5.5. Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....</b>	<b>43</b>
<b>5.6. Medidas de variabilidade genética .....</b>	<b>44</b>
<b>5.7. Estrutura genética .....</b>	<b>46</b>
<b>5.8. Distância genética .....</b>	<b>49</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>51</b>
<b>7. Perspectivas futuras .....</b>	<b>52</b>
<b>8. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>53</b>
<b>Anexo I .....</b>	<b>69</b>

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Locais e datas de coletas das amostras (animais e sangue).....	17
Tabela 2. Frequências alélicas em 11 locos protéico-isoenzimáticos examinados no plasma sanguíneo de três amostras populacionais da tartaruga da Amazônia ( <i>Podocnemis expansa</i> ).....	23
Tabela 3. Distribuição genotípica e alélica dos quatro locos polimórficos em <i>P. expansa</i> . Testes do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e de verossimilhança máxima (G) foram aplicados assumindo-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	25
Tabela 4. Testes de homogeneidade utilizando a tabela de contingência para cálculo do $\chi^2$ aplicados na análise da distribuição das frequências alélicas nos locos polimórficos entre as amostras populacionais de <i>Podocnemis expansa</i> .....	26
Tabela 5. Frequência temporal dos alelos ( $T^a$ e $T^b$ ) no loco de transferrina em <i>P. expansa</i> de três áreas da Amazônia.....	27
Tabela 6. Teste de contingência para avaliação temporal da distribuição dos alelos ( $T^a$ e $T^b$ ) de transferrina em amostras populacionais de <i>Podocnemis expansa</i> , de três áreas da Amazônia. Entre parêntese os valores esperados.....	27
Tabela 7. Análise de desequilíbrio de ligação entre os locos polimórficos detectados nas amostras populacionais de <i>P. expansa</i> .....	34
Tabela 8. Variabilidade genética de 11 locos examinados em entre três amostras populacionais de <i>Podocnemis expansa</i> .....	35
Tabela 9. Estimativas do $F_{ST}$ e $Nm$ por loco em todas as amostras populacionais de <i>P. expansa</i> .....	36
Tabela 10. Comparação par a par dos testes exatos de diferenciação populacional (Raymond e Rousset, 1995), com base na distribuição das frequências alélicas dos locos polimórficos nas amostras populacionais de <i>P. expansa</i> . Acima da diagonal as estimativas de $F_{ST}$ com $Nm$ entre parênteses.....	36
Tabela 11. Distância de Roger (1972) modificado por Wright (1978) entre as amostras populacionais de <i>Podocnemis expansa</i> .....	37

## Lista de Figuras

Figura 1. Posição taxonômica da tartaruga da Amazônia <i>Podocnemis expansa</i> (Schweigger, 1812) baseada na checklist mundial dos taxa terminais de tartarugas modernas disponibilizada pelo Grupo de Trabalho sobre Taxonomia de Tartarugas (Bickham <i>et al.</i> , 2007).....	3
Figura 2. Locais onde as amostras populacionais de <i>Podocnemis expansa</i> foram coletadas. Mapa modificado de Teixeira <i>et al.</i> (1996).....	17
Figura 3. Eletroferograma de transferrina do plasma confirmando o polimorfismo para o loco <i>Tf</i> em <i>P. expansa</i> .....	24
Figura 4. Eletroferograma de albumina do plasma revelando o polimorfismo para o loco <i>Alb</i> em <i>P. expansa</i> .....	28
Figura 5. Eletroferograma de proteína geral do plasma revelando polimorfismo para o loco <i>Pa</i> em <i>P. expansa</i> .....	29
Figura 6. Zimograma de esterase do plasma revelando o monomorfismo para os locos <i>EST-1</i> , <i>EST-2</i> em <i>P. expansa</i> .....	30
Figura 7. Representação esquemática do monomorfismo no loco <i>PGM-1</i> , e zimograma do polimorfismo no loco <i>PGM-2</i> , na enzima fosfoglucomutase do plasma de <i>P. expansa</i> .....	31
Figura 8. Zimograma de malato desidrogenase do plasma revelando polimorfismo para o loco <i>MDH</i> em <i>P. expansa</i> .....	32
Figura 9. Zimograma de superóxido dismutase do plasma revelando o monomorfismo para os locos <i>SOD-1</i> e <i>SOD-2</i> em <i>P. expansa</i> .....	33
Figura 10. UPGMA usando a distância de Roger modificada por Wright (1978) das amostras populacionais de <i>Podocmenis expansa</i> .....	37

## **1. Introdução**

### **1.1. Amazônia e a sua biodiversidade**

A Amazônia constitui-se na maior e mais diversa floresta tropical do mundo (Silva *et al.*, 2005). Com uma vegetação não uniforme, constituída de floresta por terra firme, várzea, savana, campina e até áreas abertas com pedras (Vogt *et al.*, 2001). Essa região abriga a maior biodiversidade do planeta (Magalhães *et al.*, 2001). Com seus rios descarregando cerca de 20% de toda água doce, que é despejada nos oceanos pelos rios existentes no globo terrestre, a Amazônia é importante para a estabilidade ambiental do planeta (MMA, 2002; Correia *et al.*, 2007). Como resultado de inúmeras associações entre a floresta amazônica e os diversos corpos d'água (rios de diversos tamanhos e qualidade de nutrientes, igarapés, igapós e poços d'água), surgem na Amazônia uma grande diversidade de habitats, favorecendo desse modo, o isolamento de populações e a formação de novas espécies (Vogt *et al.*, 2001).

A Amazônia é possuidora de aproximadamente 1/3 do estoque genético planetário, e embora não sejam dados conclusivos, especula-se que existem na região cerca de 40 a 60 mil espécies de plantas (Albagli, 2001) das quais, 30 mil são endêmicas à região (Mittermeier *et al.*, 2003). A Amazônia possui uma alta biodiversidade de invertebrados (Overal, 2001). Segundo Albagli (2001) estima-se que existam na região aproximadamente 2,5 milhões de espécies de artrópodes (insetos, aranhas, centopéias, etc). Considerada a área do planeta que possui a ictiofauna de água doce mais rica e diversificada (Lowe-McConnell, 1999), com um número estimado de espécies variando de 2.500 a 3.000 (Goulding, 1980), a Amazônia congrega aproximadamente 30% das espécies de peixes de água doce do mundo. Uma fauna de vertebrados superiores riquíssima é estimada para região amazônica, com 427 espécies de anfíbios, 371 espécies de répteis, 1.300 espécies de aves (Mittermeier *et al.*, 2003) e 300 ou mais espécies de mamíferos (Albagli, 2001; Silva *et al.*, 2001; Mittermeier *et al.*, 2003).

A perda direta da biodiversidade nos ecossistemas brasileiros, em especial na região amazônica, causada pelas mais variadas ações antropogênicas, tais como: poluição e eutrofização, agricultura e pecuária, assoreamento, construção de barragens (hidroelétricas) e controle de cheias, pesca e introdução de espécies

exóticas, hidrovias, mineração, petróleo, entre outras, tem sido motivo de grande preocupação (Barthem, 2001; Agostinho *et al.*, 2005). Além disso, a fragmentação dos habitats naturais, pode dificultar o fluxo gênico entre as populações, proporcionando o endocruzamento e perda de diversidade genética em longo prazo (Fonseca *et al.*, 2008). Neste contexto, a perda da biodiversidade genética no ecossistema amazônico torna-se fator relevante, havendo uma necessidade premente de implementação de ações estratégicas visando à manutenção da adaptabilidade e perpetuidade das populações naturais da região. Sabe-se que, uma vez iniciada essa erosão genética, as populações tornam-se mais frágeis e suscetíveis à extinção. Sendo assim, o estudo da variabilidade genética dos organismos passa a desempenhar um papel importante no fornecimento de informações cientificamente embasadas, que venham efetivamente auxiliar na elaboração das políticas de conservação, manejo e uso sustentável do patrimônio genético da biota amazônica.

## **1.2. A tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*), sua distribuição, abundância e conservação.**

A *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812), espécie nominada tradicionalmente como tartaruga da Amazônia, pertence à ordem Testudines, subordem Pleurodira, família Podocnemididae (Figura 1). É reconhecida como o maior quelônio de água doce do gênero *Podocnemis* na América do Sul. As fêmeas dessa espécie podem medir de 50 a 89 cm de comprimento, 60 cm de largura (Alfinito, 1975; Pritchard e Trebbau, 1984; IBAMA, 1989) e pesar de 15 a 80 kg (Mittermeier, 1978; Alho e Pádua, 1982; Pritchard e Trebbau, 1984; IBAMA, 1989). A tartaruga da Amazônia encontra-se amplamente distribuída, podendo ser encontrada, desde os rios Araguaia e Tocantins (Mittermeier *et al.*, 1980; Ferreira Júnior e Castro, 2003), desembocadura do rio Amazonas, até pelo menos o rio Morona e rio Marañón, no Peru. Sua área de distribuição abrange também os rios Orinoco e Essequibo, ambos na Venezuela (Mittermeier *et al.*, 1980; Pritchard e Trebbau, 1984; Iverson, 1992), incluindo ainda Bolívia, Colômbia e Guianas. No Equador tem-se observado uma diminuição no número de *P. expansa* na região do rio Tiputini (Cisneros-Heredia, 2006).

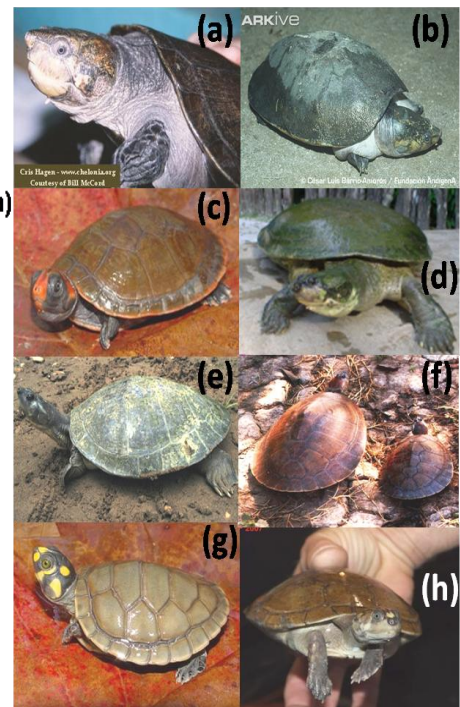
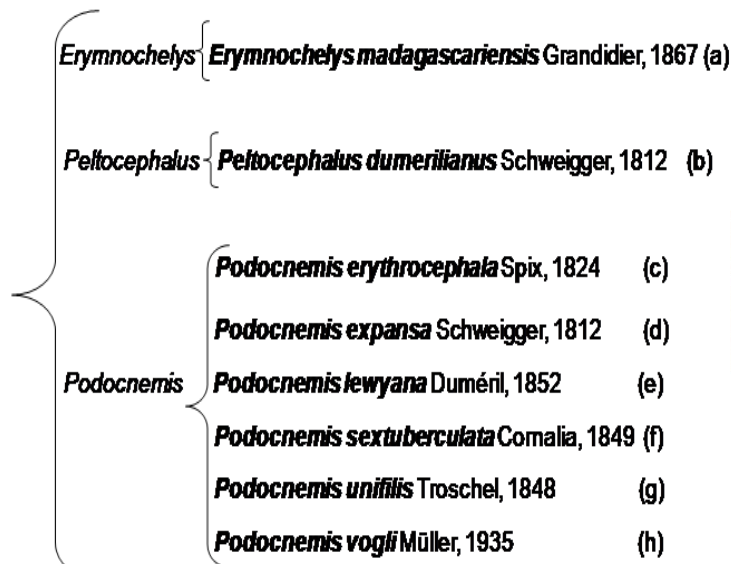


Muitos aventureiros e viajantes que percorreram a América do Sul nos séculos que se sucederam ao seu descobrimento, destacaram vários espetáculos naturais da Amazônia, entre os quais, o que mais impressionava eram as grandes aglomerações da tartaruga da Amazônia nas extensas praias das bacias dos rios Amazonas e Orinoco. A desova em grandes grupos, com dezenas de milhares de fêmeas subindo às praias ao mesmo tempo era um fiel registro da abundância e exuberância das populações de tartarugas do Novo Mundo (Ferreira Junior, 2003).

Testudines

Pleurodira

Podocnemididae ou Podocnemidae<sup>1</sup>



**Figura 1.** Posição taxonômica da tartaruga da Amazônia *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) baseada na checklist mundial dos taxa terminais de tartarugas modernas disponibilizada pelo Grupo de Trabalho sobre Taxonomia de Tartarugas (Bickham *et al.*, 2007). As fotos: (a); (b); (c); (f); (g) e (h) e autores foram extraídos dos sites que estão apresentados ao final das referências bibliográficas. Fotos (d) (Alves e Santana, 2008) e (e) (Vargas-Ramírez *et al.*, 2007).

<sup>1</sup> De acordo com a anotação N° 104 feita por Bickham *et al.* (2007), Cope (1868) usou o nome Podocnemididae para se referir a esse clado, enquanto que, Baur (1893) referiu-se a esse grupo como sendo Podocnemidae.

Após várias décadas de intensa exploração a *Podocnemis expansa* já foi considerada pela União Internacional para Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) como ameaçada de extinção. Atualmente, devido aos programas de proteção implementados pelo governo federal e conduzidos sob as responsabilidades do Instituto Chico Mendes da Biodiversidade (ICMBIO) e do Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios (RAN), esta espécie não se encontra mais ameaçada, porém, ainda apresenta baixo risco de extinção, portanto, dependente de conservação pelos critérios da IUCN. Todas as espécies de *Podocnemis* estão listadas no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Fauna e da Flora Selvagens em Perigo de Extinção (CITES), que se encontra publicado como Anexo II na Instrução Normativa nº 11, de 17 de maio de 2005 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

No que diz respeito aos aspectos relacionados a sustentabilidade e alternativas adequadas ao manejo de quelônios na Amazônia, em especial, na bacia do rio Negro, Rebêlo e Pezzuti (2000) afirmam que a exploração desses recursos na região por produtores e consumidores, envolve questões de interesse local (consumo, preferência alimentar, postura ética, atitudes políticas, entre outras), atreladas à conservação da biodiversidade global. Esses autores entre várias outras iniciativas para o consumo sustentável dos quelônios na região sugerem o estímulo as pesquisas acadêmicas sobre os mais variados aspectos do manejo desses recursos (nas áreas de biologia populacional, ecologia, parasitologia, genética, ecologia humana, economia ecológica, legislação, engenharia de alimentos, zootecnia e outras), visando apoiar e avaliar os seus efeitos conservacionistas.

### **1.3. A captura e pesca de quelônios na Amazônia**

Após a ocupação europeia da Amazônia, a utilização da tartaruga da Amazônia como atividade de subsistência transformou-se em um sistema de produção extrativista com característica mercantilista (1700-1900 aproximadamente), onde, os principais produtos eram o óleo e a manteiga produzidos a partir dos ovos, ambos utilizados para fritura de alimentos, iluminação domiciliar e pública (Bates, 1863; Smith, 1974). Nessa época, os ovos eram amassados numa canoa para quebrar as cascas. A água era adicionada e feita uma mistura que ali ficava ao sol

por várias horas para a extração do óleo que ficava na superfície. O óleo era retirado da superfície com conchas e fervido antes de ser armazenado em potes de barro (Smith, 1974; 1979; Redford e Robinson, 1991), enquanto que, a gordura extraída era misturada a resina, sendo usada para calafetação de barcos (Smith, 1974; 1979). No século XVIII, *P. expansa* desovava em algumas praias próximas a cidade de Itacoatiara, onde, devido a interesses comerciais dos portugueses passaram denominá-las de praia real (Pesqueiros Reais de Tartaruga). A carne era destinada para o consumo local, abastecendo apenas o mercado regional e tropas da Capitania do Rio Negro em Barcelos, para maiores detalhes veja Smith (1979).

A comunidade de quelônios aquáticos da Amazônia constituída de 14 espécies de tartarugas, não se enquadra no esteriótipo da alta biodiversidade normalmente atribuída para essa região (Vogt, 2008), onde, o gênero *Podocnemis* em especial, é comercialmente explorado pelo homem (Alho, 1985, Vogt, 2008). As espécies brasileiras de *Podocnemis*, *P. expansa* (tartaruga); *P. unifilis* (tracajá); *P. sextuberculata* (pitiú) e *P. erythrocephala* (irapuca) são todas exploradas em algum grau. Tartaruga e tracajá são as espécies mais procuradas para o consumo de carne e ovos (Alho, 1985). Na bacia do rio Negro (médio e baixo rio Jaú, Novo Airão e Manaus) constatou-se que o tracajá, ao invés da tartaruga, é a espécie mais procurada e mais consumida (Rebêlo e Pezzuti, 2000). Assim, como outros quelônios, essas espécies acima mencionadas, têm sido tradicionalmente caçadas, pescadas e seus ovos colhidos há muitas gerações pelas populações indígenas e ribeirinhas da Amazônia (Smith, 1979; Rebêlo e Pezzuti, 2000).

Os quelônios encontrados na região amazônica, pertencentes ao gênero *Podocnemis*, constituem um recurso da fauna de grande significado para as populações ribeirinhas da região, sendo utilizados como alternativa alimentar. A carne dessas espécies é uma excelente fonte de proteínas (Mittermeier, 1978; Vogt *et al.*, 1994). As pesquisas com a tartaruga da Amazônia (*P. expansa*) mostram que a sua carne apresenta um alto teor protéico (88 a 94%) em comparação a carne de outros animais: carne bovina (44%), carne suína (44%) e lagosta (82%) (IBAMA, 1989; Rodrigues e Moura, 2007).

De acordo com Gilmore (1986), a captura de tartaruga da Amazônia pode ser considerada a atividade etnozoológica mais importante de toda a região amazônica,

vindo desde o período pré-colombiano até hoje. O consumo de quelônios, em especial, o de tartaruga da Amazônia tem ocorrido na reserva de biosfera do alto Orinoco-Casiquire (Narbaiza *et al.*, 1999) e no médio Orinoco, Venezuela (Hernández e Espín, 2003). No Brasil, na região de Barcelos, rio Negro, a exploração e consumo desses animais são praticados pela população local (Silva e Begossi, 2007). Especificamente, na cidade de Manaus, observa-se em ocasiões importantes a chamada “tartarugada” que é um banquete de carne de tartaruga preparado de diferentes modos. Assim sendo, a exploração, o comércio ilegal e consumo de tartarugas são socialmente importantes para as classes altas, e economicamente importantes para as classes menos favorecidas, que obtêm esses animais para prover essa demanda das classes altas (Alho, 1985). Em Belém, além do comércio da gordura e derivados também se pratica o consumo da carne e ovos da tartaruga da Amazônia (Alves e Santana, 2008).

Outros subprodutos como as carapaças, gordura e vísceras são muito apreciados, além de serem usados na fabricação de pomadas medicinais, sabonetes, cosméticos, utensílios domésticos e adornos (Smith, 1974, 1979; Alho, 1985; IBAMA, 1989; Pantoja-Lima, 2007; Alves e Santana, 2008). A carne desses animais tem sido utilizada como uma iguaria da culinária regional e até mesmo procurado em restaurantes (Wetterberg *et al.*, 1976; Ferrarini, 1980; Redford e Robinson, 1991).

Nos idos de 1980, houve uma mudança no consumo humano da carne de tartaruga, onde, este produto que era tido como item principal e fonte de proteína passou então a ser consumido como uma fina iguaria na dieta amazônica (Alho, 1985).

#### **1.4. Cariotipia e marcadores genético-moleculares em tartaruga da Amazônia**

O cariótipo de *Podocnemis expansa* apresenta 28 cromossomos (Ayres *et al.*, 1969; Huang e Clark, 1969). Estudo genético usando microssatélites obteve resultados, que indicam a existência de múltipla paternidade na tartaruga da Amazônia, onde uma fêmea tem os seus ovos fecundados por dois e três machos (Valenzuela, 2000; Pearse *et al.*, 2006a). Pesquisas enfocando a estrutura genético-populacional dessa espécie, diga-se de passagem, muito reduzidas, já têm sido

realizadas por meio de marcadores protéicos (Teixeira *et al.*, 1996), aloenzimáticos (Bock *et al.*, 2001) e com DNA mitocondrial e microssatélites (Sites *et al.*, 1999; Viana *et al.*, 2004; Pearse *et al.*, 2006b).

A distribuição das frequências alélicas do marcador protéico transferrina em tartaruga da Amazônia, sugeriu um livre fluxo gênico entre amostras populacionais de cinco áreas geográficas da Amazônia (Teixeira *et al.*, 1996). Já os marcadores aloenzimáticos usados por Bock *et al.* (2001), demonstraram estruturação genética entre amostras populacionais coletadas no Brasil e Peru. Os marcadores moleculares (nucleares e mitocondriais) dessa espécie, usados por Sites *et al.* (1999) em amostras coletadas de duas bacias fluviais (Tapajós e Araguaia), revelaram um grande fluxo gênico intra-bacia fluvial (até 275 Km), porém, muito pouco entre bacias (2.400 km). Outro estudo baseado em análise de DNA mitocondrial e macardores microssatélites de uma ampla amostragem de tartaruga da Amazônia na América do Sul, envolvendo 18 locais de coletas distribuídos pelos países: Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela, indicou fortemente a existência de estruturação genética entre as populações (Pearse *et al.*, 2006b). No entanto, ainda existe uma premente necessidade de se gerar mais informações, principalmente, sobre variantes protéicas e isoenzimáticas direcionadas à identificação e delimitação dos estoques dessa espécie. Neste contexto, um programa de manejo da pesca de tartaruga na região amazônica para ser considerado confiável, está na dependência da identificação correta de seus “estoques naturais”, geneticamente diferenciados e adaptados as suas áreas de ocorrência. Sendo assim, é recomendável que cada unidade de manejo da espécie, devidamente identificada, passe a receber um tratamento diferenciado por apresentar um perfil genético único e independente (Ferguson *et al.*, 1995).

O manejo dos quelônios da Amazônia, especialmente o da tartaruga, depende se a espécie constitui um ou vários estoques genéticos. No primeiro caso, os animais podem se reintroduzidos ou transferidos sem se questionar a procedência dos mesmos. No segundo, isto não seria recomendável devido as características genéticas próprias de cada “unidade de manejo da espécie” (estoque) (Teixeira *et al.*, 1996).

## **1.5. Marcadores protéico-isoenzimáticos na caracterização genética dos estoques**

As proteínas e isoenzimas conhecidas como marcadores genéticos, são codificadas por genes estruturais que desempenham a função de determinar a sequência precisa dos aminoácidos presentes em suas cadeias. Dessa maneira, sempre que analisamos uma dada proteína ou isoenzima, estamos lidando com o produto da ação direta do gene que a codificou. Esses marcadores genéticos quando extraídos de diversos tecidos biológicos (músculo, coração, fígado, sangue total, plasma sanguíneo, etc.) dos mais variados organismos biológicos e analisados pela técnica de eletroforese revelam zimogramas (padrões de bandas isoenzimáticas observados nos géis) e/ou eletroferogramas (padrões de bandas protéicas observados nos géis), capazes de gerar valiosas informações, primordialmente, no que tange à identificação correta de espécies, estoques naturais e artificiais (Ferguson, 1980; Ferguson *et al.*, 1995). Mesmo com o advento dos marcadores moleculares de DNA, os marcadores protéico-isoenzimáticos pela relativa simplicidade, rapidez e baixo custo das análises em relação a muitos outros marcadores, continuam sendo aplicados em estudos de estrutura genética populacional em diversos grupos taxonômicos tais como: molusco (Nikiforov e Zvyagintsev, 2008); répteis (Bock *et al.*, 2001), peixes (Batista e Solé-Cava, 2005; Kuz'min e Kuz'mina, 2005, Zawadzki *et al.*, 2008); mamíferos a exemplo de cães (Erdoğan e Özbeyaz, 2004), hamster (Yiğit *et al.*, 2007) e porco (Tao *et al.*, 2007), e em plantas a exemplo do camu-camu (Teixeira *et al.*, 2004) e arroz silvestre (Veasey *et al.*, 2008).

O conhecimento detalhado da distribuição das frequências alélicas de diversos marcadores protéico-isoenzimáticos, constitui-se num pré-requisito básico para identificação e avaliação genética dos estoques de qualquer organismo biológico. No entanto, o sucesso na definição da estrutura genética de populações, com a possível identificação e delimitação de estoques, estão na dependência direta de dois fatores básicos: primeiro, a detecção de locos polimórficos nos marcadores genéticos; e segundo, a constatação de heterogeneidade genética significativa entre as amostras populacionais da espécie examinada, revelada pela aplicação de testes

genético-estatísticos específicos ( $\chi^2$  e/ou verossimilhança máxima G, testes exatos, entre outros) (Jamieson e Turner, 1978; Ferguson *et al.*, 1995).

### **1.6. O porquê do uso de plasma como fonte de proteínas em estudos genético-populacionais?**

Sabe-se que os padrões de proteínas plasmáticas revelam normalmente uma considerável variação no número e na mobilidade de bandas eletroforéticas, devido ao sangue ser um sistema de drenagem e transporte do organismo, e, desse modo, é possível que ocorra essa variação em decorrência do estado fisiológico do indivíduo (Ferguson, 1980). No entanto, a opção no presente trabalho pela coleta de sangue e posterior isolamento de amostras de plasma para o exame eletroforético de marcadores protéicos, em relação a outros procedimentos de extração protéica comumente realizados com outros tecidos biológicos, apresenta inúmeras vantagens, a saber:

1. Com uma razoável habilidade técnica durante a coleta de sangue o pesquisador pode evitar o sacrifício dos animais, principalmente, quando se trata da tartaruga da Amazônia, animal comprovadamente reconhecido por Vanzolini *et al.* (1980), por apresentar grande tenacidade.
2. O sangue além de carrear eritrócitos ricos em hemoglobina e diferentes proteínas e enzimas (Kakhniashvili *et al.*, 2004; Bhasin e Walter, 2007), encerra também o plasma, componente reconhecidamente fácil de se processar análises de variabilidade genética de inúmeras proteínas (pré Albumina, Albumina, transferrina) e, uma série de enzimas (esterases, fosfatases, lactato desidrogenases, entre muitas outras) (Manwell e Baker, 1970; Anderson e Anderson, 2002; Nedelkov *et al.*, 2005). Estima-se que no plasma circulante existam cerca de 300 proteínas (Anderson e Anderson, 2002).
3. As proteínas plasmáticas figuram entre as que apresentam altas taxas de mudanças evolutivas em suas estruturas moleculares (Sarich, 1977) sendo, portanto, consideradas marcadores genéticos apropriados em estudos de caracterização genético-populacional das espécies.

Dentre os inúmeros sistemas protéico-enzimáticos disponíveis no plasma circulante dos vertebrados, oito foram testados no presente estudo, sendo três protéicos: transferrina (Tf), albumina (Alb) e proteínas gerais (PG); e cinco enzimáticos: esterase (EST), malato desidrogenase (MDH), fosfoglucomutase (PGM), sorbitol desidrogenase (SDH) e superóxido dismutase (SOD). É importante enfatizar, que análises eletroforéticas de polimorfismo no loco de transferrina (*Tf*) (Teixeira *et al.*, 1996) e em um dos locos que codifica para a enzima esterase (EST) (Bock *et al.*, 2001) já foram realizadas para se examinar o status populacional de *Podocnemis expansa* na Amazônia. Até o momento, ainda não existe registro do uso de Alb, PG, MDH, PGM, SDH e SOD, na identificação e delimitação dos estoques dessa espécie na região.

#### **1.6.1. Transferrina (Tf)**

Transferrina é uma proteína ligante de ferro presente no plasma sanguíneo de todos os vertebrados (Teixeira e Jamieson, 1985). Devido à simplicidade nos mecanismos de herança genética e baixos coeficientes de seleção, os alelos co-dominantes de transferrinas que segregam num loco gênico único denominado *Tf*, podem ser facilmente usados como marcadores genéticos populacionais (Monostory *et al.*, 1984). Além disso, por apresentar uma alta taxa de mudança evolutiva em sua estrutura molecular, e alto grau de polimorfismo genético em muitas espécies de vertebrados, o loco *Tf* tem sido muito útil em estudos relacionados com a caracterização genética populacional de peixes comerciais, principalmente, em espécies de bacalhau do Atlântico Norte, *Gadus morhua* (Jamieson e Turner, 1978) e *Melanogrammus aeglefinus* (Jamieson e Birley, 1989). As distribuições alélicas e genotípicas desse loco, têm também fornecido valiosas informações sobre a genética populacional de algumas espécies de peixes comerciais da Amazônia, a saber: em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Teixeira e Jamieson, 1985; Calcagnotto e Toledo-Filho, 2000); jaraquis, *Semaprochilodus taeniurus* e *Semaprochilodus insignis* (Teixeira *et al.*, 1990); e pescada, *Plagioscion squamosissimus* (Teixeira *et al.*, 2002); além disso, em da tartaruga da Amazônia, *Podocnemis expansa* (Teixeira *et al.*, 1996).



### **1.6.2. Albumina (Alb)**

A albumina é uma proteína com muitas funções importantes, como a manutenção de equilíbrio osmótico, ligação altamente específica e transporte de metabolitos, hormônios, metais e drogas. A albumina é a mais abundante proteína do plasma em vertebrados adultos e corresponde quase a metade das proteínas circulantes no sangue (Peters, 1996; González e Scheffer, 2002; Lehninger *et al.*, 2006). No entanto, essa abundância pode ser contestada, onde, níveis mais baixos dessa proteína já foram detectados em várias espécies (Manwell e Baker, 1970). Como marcador molecular polimórfico, a albumina ao longo de décadas tem sido examinada sob os mais diferentes aspectos, indo desde a simples descrição fenotípica até o exame da estrutura genético-populacional das espécies como demonstrado em peixes (Morgan II *et al.*, 1972; Kuz'min e kuz'mina, 2005); aves (Haley, 1965) e mamíferos (Ashton, 1964; Kilpatrick e Crowell, 1985; Henkes *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2002; Jiskrová *et al.*, 2002; Erdoğan e Özbeyaz, 2004; Nunes *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2007). Além disso, essa proteína tem sido usada em estudo de ascendência genética de cão da raça Yugoslav Shepherd (Dimitrijević *et al.*, 2007).

### **1.6.3. Proteínas gerais (PG)**

O plasma sanguíneo quando eletroforicamente analisado pode revelar um padrão de aproximadamente cinco, 15, 19 e até mais de 30 bandas protéicas, em géis de acetato de celulose, amido, poliacrilamida e focalização isoeletrica, respectivamente (Ferguson, 1980). Segundo esse autor, os padrões das proteínas gerais do plasma apresentam-se complexos dificultando em muito a interpretação de possíveis polimorfismos de bandas nos eletroferogramas (Ferguson, 1980). No entanto, alguns raros exemplos sobre a utilização de bandas polimórficas dessas proteínas no exame da estrutura genético-populacional das espécies, já tem sido registrados em ganso, *Chen c. caerulescens* da Ilha Wrangel, no Oceano Ártico, Rússia (Kuznetsov *et al.*, 1998) e lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus* da região Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil (De Mattos *et al.*, 2004).

#### 1.6.4. Esterase (EST – E.C.3.1.1.1<sup>2</sup>)

Esterase é uma enzima classificada no grupo das hidrolases, conhecida também como carboxil-esterase, e catalisa a seguinte reação: Um éster carboxílico + H<sub>2</sub>O = um álcool + um carboxilato (NC-IUBMB, 2009). O alto grau de polimorfismo nos locos que codificam as esterases, detectado numa grande quantidade de organismos das mais variadas espécies, é visto como uma das principais vantagens na utilização desses marcadores em estudos genético-populacionais (Ferguson, 1980). Diferentes níveis de polimorfismo em esterases têm sido detectados, especialmente, em peixes marinhos: sardinha do Atlântico, *Clupea harengus* (Ridgway *et al.*, 1970; Andersson *et al.*, 1981); percas da Nova Zelândia, *Chrysophrys auratus* (Smith, 1979) e da Austrália, *Pagrus auratus* (Meggs e Austin, 2003); peixes da Amazônia: tucunarés, *Cichla monoculus*, e *Cichla* sp. (Teixeira e Oliveira, 2005); e piranhas, *Serrasalmus* cf. *rhombeus* (Teixeira *et al.*, 2006); em diversos outros organismos da Amazônia, particularmente, em diferentes espécies de anofelinos (Diptera: Culicidae) (Scarpassa e Tadei, 2000; Santos *et al.*, 2003); e em espécies do grupo *Simulium perflavum* (Diptera: Simuliidae) (Scarpassa e Hamada, 2003), bem como em plantas: camu-camu, *Myrciaria dúbia* (Teixeira *et al.*, 2004).

O polimorfismo de esterase do plasma já tem sido usado em estudos de caracterização e estimativa da estrutura genético-populacional das espécies, com casos registrados em répteis: crocodilo do Nilo (Flint *et al.*, 2000) e tartaruga da Amazônia (Bock *et al.*, 2001); em peixe marinho (Diakov, 1998); em aves: gansos (Kuznetsov *et al.*, 1998; Slavénaité e Sruoga, 2002) e pássaro (Corbin *et al.*, 1974); e em mamíferos: marsupial (canguru) (Bell *et al.*, 1998), cavalos (Díaz *et al.*, 2002; Jiskrová *et al.*, 2002; Vinocur *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2005; Šveistienė e Jatkauskienė, 2006) e cães (Erdoğan e Özbeyaz, 2004).

#### 1.6.5. Fosfoglucomutase (PGM – E.C.5.4.2.2)

É uma enzima classificada no grupo das isomerases, que atua especificamente como fosfotransferase (fosfomutase), e catalisa a seguinte reação: α-D-glucose 1-phosphate = D-glucose 6-phosphate (NC-IUBMB, 2009). Devido ao

---

<sup>2</sup> Código da enzima (EC)

seu elevado grau de polimorfismo essa enzima tem sido usada em diversos estudos da estrutura genética de populações: como em molusco bivalves (Nikiforov e Zvyagintsev, 2008), carangueijo (Daniels, 2003), camarão (Gusmão *et al.*, 2006), mosquito, *Anopheles minimus* (Poolprasert *et al.*, 2008), sardinha, *Sardina pilchardus* (Ramon e Castro, 1997), peixe-batata, *Lopholatilus villarii* (Batista e Solé-Cava, 2005), peixe gato, *Hypostamus regani* (Zawadzki *et al.*, 2008), lebre (Vapa *et al.*, 2007) e hamsters (Yiğit *et al.*, 2007).

Polimorfismo de fosfoglucomutase do plasma já foi usado para estimativa de variabilidade genética em populações de gado (Nie *et al.*, 1999) e caracterização genética de cavalo (Panepucci *et al.*, 1993).

#### **1.6.6. Malato desidrogenase (MDH – E.C.1.1.1.37)**

Malato desidrogenase é uma enzima classificada no grupo das oxidoredutases, que catalisa a seguinte reação: (S)-malate + NAD<sup>+</sup> = oxaloacetato + NADH + H<sup>+</sup> (NC-IUBMB, 2009). Apresenta grande polimorfismo motivo pelo qual ela tem sido usada para caracterização e estimativa de variabilidade genético-populacional em salmão, *Salmo salar* L. (Artamonova, 2007), ostras, *Mytilus trossulus* (Nikiforov e Zvyagintsev, 2008), sardinha, *Sardina pilchardus* (Ramon e Castro, 1997), peixe gato, *Hypostamus regani* (Zawadzki *et al.*, 2008), peixe-batata, *Lopholatilus villarii* (Batista e Solé-Cava, 2005), ratos, *Peromyscus maniculatus* (Aquadro e Avise, 1982), hamsters, *Mesocricetus brandti* e *M. auratus* (Yiğit *et al.*, 2007), e lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus* (De Mattos *et al.*, 2004).

#### **1.6.7. Sorbitol desidrogenase (SDH – E.C.1.1.1.14)**

Da mesma forma que MDH, essa enzima é também classificada no grupo das oxidoredutases, e catalisa a seguinte reação: D-iditol + NAD<sup>+</sup> = D-sorbose + NADH + H<sup>+</sup> (NC-IUBMB, 2009). O polimorfismo revelado por essa enzima tem sido útil na avaliação da estrutura genético-populacional de fungo, *Trichoderma harzianum* (Siddiquee *et al.*, 2007), pulgão, *Rhopalosiphum padi* L. (Simon e Hebert, 1995), pequiizeiro, *Caryocar brasiliense* Camb. (Melo júnior *et al.*, 2004), sardinha, *Sardina pilchardus* (Ramon e Castro, 1997), e lebre, *Lepus europaeus* (Vapa *et al.*, 2007). O alto grau de polimorfismo de SDH serviu para demonstrar diferenciação genética intra e interpopulacional de salmão, *Salmo salar* L. (Artamonova, 2007).

#### 1.6.8. Superóxido dismutase (SOD – E.C.1.15.1)

Essa enzima do mesmo modo que MDH e SDH, é classificada no grupo das oxidoredutases, e catalisa a seguinte reação:  $2 O_2^- + 2 H^+ = O_2 + H_2O_2$  (NC-IUBMB, 2009). Em função do seu polimorfismo, a enzima SOD tem sido usada em estudos de estrutura genético-populacional de sardinha, *Sardina pilchardus* (Ramon e Castro, 1997), peixe gato, *Hypostamus regani* (Zawadzki *et al.*, 2008), peixe-batata, *Lopholatilus villarii* (Batista e Solé-Cava, 2005), em rato (Aquadro e Avise, 1982), hamest (Yiğit *et al.*, 2007) e lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus* (De Mattos *et al.*, 2004). Essa enzima foi indicada para caracterização de híbridos entre salmão do Atlântico e truta (Artamonova, 2007), além, de ter sido aplicada para resolver problemas de ordem taxonômica e estrutura genética de molusco (Bivalvia: Veneriidae) (Gallardo *et al.*, 2003).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o potencial das proteínas plasmáticas na identificação e avaliação dos estoques da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*), testando a hipótese ( $H_0$ ) da existência de um único estoque da espécie na região amazônica. Desse modo pretende-se gerar subsídios básicos para uma melhor conservação e manejo racional dessa espécie na região.

### **2.2. Objetivos específicos**

1) Comparar a distribuição das frequências alélicas e genotípicas nos locos polimórficos, entre as amostras populacionais de tartaruga da Amazônia coletadas nas seguintes áreas: Uatumã, rio Uatumã-AM; Trombetas, rio Trombetas-PA; e Monte Cristo, rio Tapajós-PA.

2) Verificar possíveis diferenças temporais estatisticamente significativas na distribuição das frequências alélicas de transferrina, nas áreas acima mencionadas, anteriormente também pesquisadas por Teixeira *et al.* (1996).

3) Ampliar o banco de tecidos biológicos do Laboratório de Genética Animal da CPBA/INPA.

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Inspeção aos locais de coleta das amostras populacionais de tartaruga**

Antes da coleta do material biológico, as bases de apoio do IBAMA localizadas nos rios Trombetas e Tapajós, e o Centro de Preservação e Pesquisas de Quelônios Aquáticos (CPPQA) da Usina Hidroelétrica (U.H.E.) de Balbina foram visitados para avaliação da infra-estrutura física. Concomitantemente, foram realizadas visitas às áreas de desova visando conhecer melhor as características locais, bem como, as pressões (predação por animais e pelo homem) sofridas pela tartaruga da Amazônia e seus possíveis reflexos na composição genético-populacional da espécie.

#### **3.2. Coleta e estocagem do material biológico**

Com a autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) (Nº 13085-1 19/12/2007) filhotes de tartaruga foram capturados manualmente nos locais de desova após eclosão dos ovos. 95 espécimes foram coletados nos seguintes locais: Maracarana, rio Uatumã-AM (30); Trombetas, rio Trombetas-PA (34) e Monte Cristo, rio Tapajós-PA (31) (Figura 2; Tabela 1). Os filhotes recém eclodidos foram transportados para tanques e/ou viveiros localizados nas bases de apoio do IBAMA (amostra do rio Trombetas), no CPPQA (amostra do rio Uatumã) e no Laboratório Úmido da Coordenação de Pesquisas em Biologia Aquática (CPBA) do INPA (amostra do rio Tapajós). Após isso, os filhotes passaram por um período de engorda de sete, oito e dez meses a base de ração balanceada, no CPPQA, Trombetas e CPBA/INPA, respectivamente, até a retirada do sangue. As amostras de sangue foram retiradas da artéria femoral com o auxílio de seringas descartáveis de 3 ou 5 mL, contendo de 0,1 mL a 0,5 mL de citrato de sódio como agente anticoagulante, vertidas em tubos de ensaio de 5 mL e centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos, para a obtenção das amostras de plasma. As amostras de sangue coletadas no campo foram estocadas numa caixa de isopor contendo gelo comum, evitando-se sempre o contato direto das amostras com o gelo, até a centrifugação do material. As amostras de plasma foram mantidas em um freezer (-25 °C) até o momento dos testes eletroforéticos. Após a retirada de

sangue os animais foram devolvidos aos tanques e posteriormente ao meio ambiente.

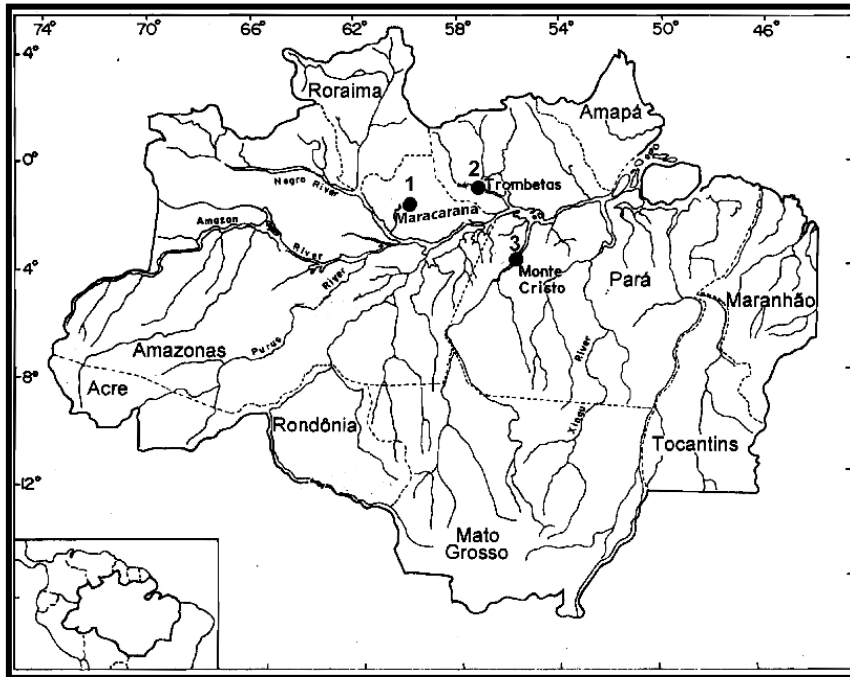


Figura 2. Locais onde as amostras populacionais de *Podocnemis expansa* foram coletadas. Mapa modificado de Teixeira *et al.* (1996).

Tabela 1. Locais e datas de coletas das amostras (animais e sangue).

Local de coleta	Estágio de desenvolvimento	Data de coleta dos espécimes	Data de coleta do plasma	Número de espécimes
Monte Cristo, rio Tapajós, PA (01°20'S e 56°45'W)	Filhote	27 a 30/01/2008	26/11/2008	31
Maracarána, rio Uatumã, AM (02°13'S e 58°15'W)	Filhote	12/2007 a 01/2008	18 e 19/07/2008	30
Trombetas, rio Trombetas, PA (04°04'S e 55°38'W)	Filhote	01/2008 a 02//2008	07/10/2008	34
<b>Total de amostras</b>				<b>95</b>

### 3.3. Nomenclatura enzimática

A nomenclatura das enzimas analisadas seguiu o padrão estabelecido pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) NC-IUBMB (2009). Sendo assim, as enzimas foram classificadas pelos códigos internacionais, onde o nome de cada enzima foi descrito da seguinte maneira: por extenso, e entre parêntese a abreviatura e o código da enzima (EC). Nas análises realizadas foram testadas as enzimas: esterase (EST – EC 3.1.1.1), fosfoglucomutase (PGM – EC 2.7.5.1), malato desidrogenase (MDH – EC 1.1.1.37), sorbitol desidrogenase (SDH – EC 1.1.1.14) e superóxido dismutase (SOD – EC 3.15.1.1).

#### **3.4. Procedimentos eletroforéticos gerais**

Os tampões da cuba (hidróxido de lítio 0,06 M e ácido bórico 0,30 M) e do gel (tris: hidroximetil aminometano 0,03 M e ácido cítrico 0,005 M) contendo 1% de tampão da cuba foram preparados de acordo com Ridgway *et al.* (1970). Esses tampões foram ajustados para o pH 8,20 com hidróxido de lítio a 1 M. Géis de amido da Sigma a 8,33% foram preparados, adicionando-se em um balão de fundo redondo de 2 litros, 340 mL do tampão do gel. O amido foi cozido no balão de fundo redondo, apoiado numa manta aquecedora, por meio de agitação contínua com auxílio de um agitador mecânico, até o ponto de ebulição (aproximadamente 90 °C), posteriormente, desgaseificado com auxílio de uma bomba a vácuo. Os extratos protéicos foram inseridos nos géis após terem sido absorvidos em pedaços retangulares de papéis de filtro Whatman (5 mm x 8 mm). O papel de filtro Whatman 3 MM foi usado para as análises de esterase (EST), fosfoglucomutase (PGM), malato desidrogenase (MDH), sorbitol desidrogenase (SDH) e superóxido dismutase (SOD), e Whatman 17 MM para as análises de transferrina (Tf), albumina (Alb) e proteínas gerais (PG). Nas análises de Tf, Alb e PG, os géis foram submetidos a um potencial de 120 V durante os primeiros 45 minutos, onde, se fez à retirada dos papéis de filtro e, em seguida, um potencial de 250 V foi aplicado aos géis por mais 4 horas aproximadamente, até o aparecimento da linha bórica, a uma distância de 10 cm ou mais, quando necessário, do ponto de aplicação das amostras. Para as análises de esterase, fosfoglucomutase, malato desidrogenase, sorbitol desidrogenase e superóxido dismutase, os géis foram submetidos a um potencial de



150 V por um período de aproximadamente quatro horas, com a retirada dos papéis de filtro na primeira hora de experimento. As migrações eletroforéticas ocorreram em direção ao anodo. Os alelos foram classificados alfabeticamente de acordo com as suas mobilidades eletroforéticas decrescentes em direção ao anodo. Nas análises de Tf, Alb, PG, MDH e PGM, amostras controle de genótipos conhecidos foram inseridas nos géis, onde, dessa forma os espécimes puderam ser genotipados com maior precisão.

### **3.5. Coloração dos sistemas protéicos**

#### **3.5.1. Transferrina (Tf)**

O método de precipitação diferencial por rivanol (2-ethoxy-6,9-diaminoacridine lactate) utilizado para isolamento de transferrina do plasma, antes da corrida eletroforética, foi o descrito por Jamieson e Turner (1978), com modificações de Teixeira *et al.* (1996), onde, as amostras de plasma foram tratadas com uma solução de rivanol (2%) na proporção de 1:1. Para a revelação das moléculas de transferrinas, os géis foram corados com Amido Black a 1%, diluído em uma solução composta de água, metanol e ácido acético (5:5:1), respectivamente, por cinco minutos, de acordo com Jamieson e Turner (1978). Em seguida os géis foram lavados por imersões sucessivas em recipientes de plástico contendo a solução acima mencionada (água, metanol e ácido acético) por um período de aproximadamente 15 horas, onde, os alelos do loco *Tf* foram identificados e classificados de acordo com Teixeira *et al.* (1996).

#### **3.5.2. Albumina (Alb)**

Considerando que geralmente o sobrenadante protéico obtido pelo método de precipitação diferencial por rivanol utilizado para isolamento das moléculas de transferrinas do plasma, contém quantidades significativas de albumina (Boettcher *et al.*, 1958), esse método foi também testado para se isolar essa proteína. Sendo assim, as amostras de plasma foram tratadas com uma solução de rivanol (1%) na proporção de 1:1 (Jamieson e Turner, 1978), com modificações. Para revelação das moléculas de albuminas os géis foram corados com Amido Black a 1% conforme Jamieson e Turner (1978), com exceção do tempo de coloração que durou de cinco

a sete minutos. O método de lavagem dos géis, para identificação de albumina, foi o mesmo descrito anteriormente para transferrina.

### **3.5.3. Proteínas gerais (PG)**

Para a separação das bandas no padrão de proteínas gerais, os géis foram corados com a mesma metodologia apresentada anteriormente para transferrina e albumina.

## **3.6. Coloração dos sistemas enzimáticos**

### **3.6.1. Esterase (EST – EC 3.1.1.1)**

Para a revelação dos padrões isoenzimáticos da enzima esterase foi utilizada a seguinte solução de coloração: 3 mL de  $\alpha$ -naftil acetato 1%, dissolvido em acetona a 50%, 87 mL de água destilada, 100 mg do corante fast blue RR salt e 10 mL de Tampão Tris HCl 0,5 M pH 7.1 (Shaw e Prasad, 1970). Os géis foram imersos nesta solução em um recipiente de plástico, e em seguida, incubados em uma estufa a 37 °C por aproximadamente 30 minutos, ou até o aparecimento das bandas. A solução de coloração foi descartada e os géis após terem sido lavados com água destilada, foram fixados em uma solução composta de água destilada: metanol: ácido acético (5:5:1), respectivamente, contendo glicerol a 10%.

### **3.6.2. Fosfoglucomutase (PGM – EC 5.4.2.2)**

Na revelação dos padrões isoenzimáticos da enzima fosfoglucomutase, utilizou-se a seguinte solução de coloração: 14 mg de NADP<sup>+</sup>, 2,8 mg de PMS, 14 mg de MTT, 28 mg de MgCl<sub>2</sub>, 70 mg de glucose-1-fosfato, 70 mL de Tris HCl 0,2 M pH 8,0 e 28  $\mu$ L de glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), sendo esta adicionada por último (Alfenas *et al.*, 1991), com modificações. Os géis foram colocados em um recipiente de plástico contendo a solução de coloração, e em seguida, incubados em uma estufa a 37 °C por aproximadamente duas horas, ou até o aparecimento das bandas. A solução de coloração foi descartada e os géis após terem sido lavados com água destilada, foram fixados em uma solução aquosa de glicerol a 10%.

### **3.6.3. Malato desidrogenase (MDH – EC 1.1.1.37)**

Os padrões isoenzimáticos da enzima malato desidrogenase foram revelados utilizando-se a seguinte solução de coloração: 5 mg de NAD<sup>+</sup>, 5 mg de PMS, 10 mg

de MTT, 25 mL de ácido málico 0,5 M pH 8,0 e 50 mL de Tris HCl 0,1 M pH 8,5 (Allendorf *et al.*, 1977), com modificações. Os géis foram imersos nesta solução em recipiente de plástico e em seguida, incubados em uma estufa a 37 °C por aproximadamente uma hora, ou até o aparecimento das bandas. A solução de coloração foi descartada e os géis após terem sido lavados com água destilada, foram fixados em uma solução composta de água destilada: metanol: ácido acético (5:5:1), respectivamente, contendo glicerol a 10%.

#### **3.6.4. Sorbitol desidrogenase (SDH – EC 1.1.1.14)**

Na revelação das bandas da enzima sorbitol desidrogenase, os géis foram submetidos a dois métodos de coloração, o primeiro composto de 100 mg de D-sorbitol, 10 mg de NAD, 2,5 mg de MTT, 5 mg de PMS e 70 mL de tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,0 (Allendorf *et al.*, 1977) com modificações, e o segundo composto de 250 mg de D-sorbitol, 10 mg de NAD, 11 mg de MTT, 2 mg de PMS e 70 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 (Shaw e Prasad, 1970), com modificações. A solução de coloração foi descartada e os géis após terem sido lavados com água destilada foram fixados em uma solução composta de água destilada: metanol: ácido acético (5:5:1), respectivamente, contendo glicerol a 10% descartado.

#### **3.6.5. Superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1)**

Para a revelação das bandas da enzima superóxido dismutase, os géis foram corados com a solução: 24 mg de MTT, 7 mg PMS dissolvido em 70 mL de Tris-HCl 0,05 M pH 7,0 (Allendorf *et al.*, 1977), com modificações. Os géis foram imersos nesta solução de coloração em recipiente de plástico, e em seguida, incubados em estufa a 37 °C no escuro por aproximadamente 2 horas, ou até o aparecimento das bandas acromáticas. A solução de coloração foi descartada e os géis em seguida foram lavados com água destilada e fixados em uma solução composta de água destilada: metanol: ácido acético (5:5:1), respectivamente, contendo glicerol a 10%.

### 3.7. Testes genético-estatísticos

Análises genético-populacionais da tartaruga da Amazônia foram realizadas com auxílio dos seguintes programas estatísticos: programa BIOSYS-2 (Swofford *et al.*, 1997), TFPGA 1.3 (Miller, 1997), POPGENE Version 1.32 (Yeh *et al.*, 1999), e cálculo para o teste do qui-quadrado (Preacher, 2001). A relação das análises é apresentada abaixo, e os programas utilizados em cada uma delas aparecem entre parênteses:

1. Testes de verossimilhança máxima (G) e do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) assumindo-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg (POPGENE 1.32 e TFPGA 1.3);
2. Estimativa das frequências alélicas, heterozigosidade média, proporção de locos polimórficos e número médio de alelos por loco (POPGENE 1.32 e TFPGA 1.3);
3. Estimativa das distâncias genéticas segundo o método de Rogers (1972), modificado por Wright (1978) (TFPGA 1.3);
4. Análise de agrupamento das distâncias genéticas usando o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Arithmetic Average) (TFPGA 1.3);
5. Testes exatos para diferenciação populacional segundo Raymond e Rousset (1995) (TFPGA 1.3);
6. Estimativas da estatística  $F$  ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  e  $F_{ST}$ ) de Wright (1978) e fluxo gênico entre as amostras populacionais baseadas em Nei (1978) (POPGENE 1.32);
7. Testes de contingência e da probabilidade exata de Fisher (1935) em tabelas  $2 \times 2$ , para análise da distribuição alélica entre as amostras populacionais (Preacher, 2001);
8. Estimativa da existência de desequilíbrio de ligação entre os locos polimórficos das amostras (BIOSYS 2);
9. Testes de homogeneidade para comparação da distribuição das frequências alélicas entre as amostras populacionais (BIOSYS 2 e POPGENE 1.32).

#### 4. Resultados

As análises eletroforéticas de três sistemas protéicos: transferrina (Tf), albumina (Alb) e proteínas gerais (PG), e quatro enzimáticos: esterase (EST – EC 3.1.1.1), fosfoglucomutase (PGM – EC 2.7.5.1), malato desidrogenase (MDH – EC 1.1.1.37) e superóxido dismutase (SOD – EC 3.15.1.1), extraídas das amostras de plasma sanguíneo da tartaruga da Amazônia, revelaram zonas de atividade eletroforética nos géis presumivelmente codificadas por 11 locos (Tabela 2). Desses locos, sete mostraram-se monomórficos (*PG-1*, *PG-2*, *EST-1*, *EST-2*, *PGM-1*, *SOD-1* e *SOD-2*) e quatro polimórficos (*Tf*, *Alb*, *MDH-1* e *PGM-2*). As descrições detalhadas dos eletroferogramas e zimogramas seguem abaixo.

**Tabela 2.** Frequências alélicas em 11 locos protéico-isoenzimáticos examinados no plasma sanguíneo de três amostras populacionais da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*).

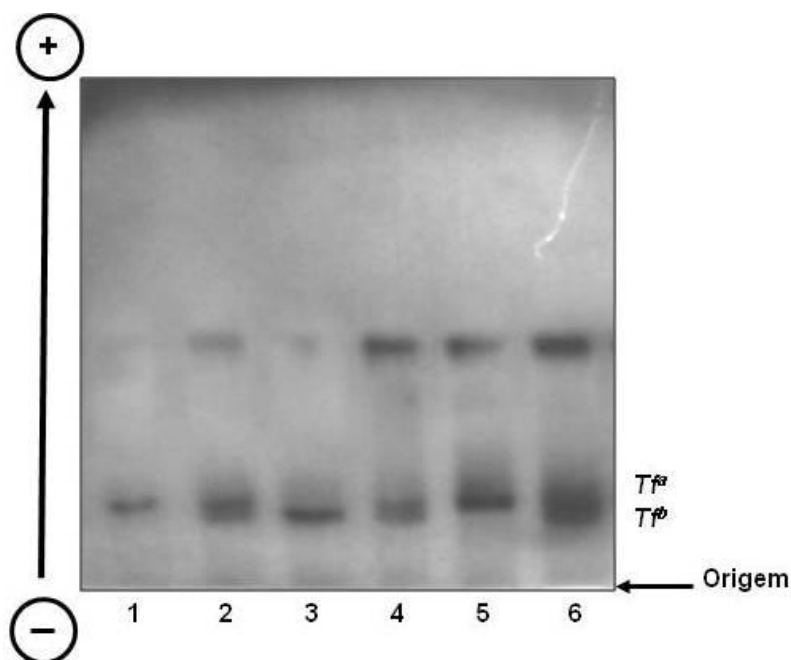
Loco e alelo	Amostras populacionais			Total N=95
	Rio Uatumã* N=30	Rio Trombetas* N=34	Rio Tapajós* N=31	
<i>Tf<sup>a</sup></i>	0,7333	0,8088	0,7903	0,7789
<i>Tf<sup>b</sup></i>	0,2667	0,1912	0,2097	0,2211
<i>Alb<sup>a</sup></i>	0,9167	0,9265	0,9516	0,9316
<i>Alb<sup>b</sup></i>	0,0833	0,0735	0,0484	0,0684
<i>PG-1</i>	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>PG-2</i>	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>EST-1</i>	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>EST-2</i>	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>SOD-1</i>	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>SOD-2</i>	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>MDH<sup>a</sup></i>	0,000	0,000	0,2903	0,0947
<i>MDH<sup>b</sup></i>	1,000	1,000	0,7097	0,9053
<i>PGM-1</i>	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>PGM-2<sup>a</sup></i>	0,7037	0,7273	0,4423	0,6337
<i>PGM-2<sup>b</sup></i>	0,2963	0,2727	0,5577	0,3663

\* Três, um e cinco exemplares não foram genotipados no loco PGM-2, em Uatumã, Trombetas e Tapajós, respectivamente (Veja Tabela 3).

## 4.1. Sistemas protéicos

### 4.1.1. Transferrina (Tf)

O loco *Tf* mostrou-se polimórfico revelando um perfil eletroforético com três genótipos ( $Tf^{aa}$ ,  $Tf^{ab}$  e  $Tf^{bb}$ ) supostamente codificados por dois alelos co-dominantes ( $Tf^a$  e  $Tf^b$ ) (Figura 3), como anteriormente descrito por Teixeira *et al.* (1996). As amostras analisadas demonstraram um bom balanço gênico intra e inter populacional, conforme revelado nas análises do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e de verossimilhança máxima (G), onde, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada (Tabela 3). Testes de homogeneidade com análise pareada entre as amostras, e na amostra total não revelaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 4). As frequências alélicas do loco *Tf* mostraram-se bem próximas dos valores encontrados por Teixeira *et al.* (1996) (Tabela 5). Teste de contingência não revelou nenhuma variação temporal na distribuição dos alelos deste loco nas áreas amostradas, quando os dados foram comparados com os de Teixeira *et al.* (1996), num intervalo de 16 a 24 anos atrás (Tabela 6).



**Figura 3.** Eletroferograma do loco *Tf* em *P. expansa*: 1 e 5 ( $Tf^{aa}$ ); 2, 4 e 6 ( $Tf^{ab}$ ); 3 ( $Tf^{bb}$ ).

**Tabela 3.** Distribuição genotípica e alélica dos quatro locos polimórficos em *P. expansa*. Testes do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e de verossimilhança máxima (G) foram aplicados assumindo-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

<b>Amostras populacionais</b>				
	<b>Rio Uatumã N = 30</b>	<b>Rio Trombetas N=34</b>	<b>Rio Tapajós N = 31</b>	<b>Total N = 95</b>
<b>Genótipos no loco <i>Tf</i></b>				
<i>Tf<sup>aa</sup></i>	16 (16,0339)	22 (22,1642)	20 (19,2787)	58 (57,5556)
<i>Tf<sup>ab</sup></i>	12 (11,9322)	11 (10,6716)	9 (10,4426)	32 (32,8889)
<i>Tf<sup>bb</sup></i>	2 (2,0339)	1 (1,1642)	2 (1,2787)	5 (4,5556)
<b>Frequência alélica em <i>Tf</i></b>				
<i>Tf<sup>a</sup></i>	0,7333	0,8088	0,7903	0,7789
<i>Tf<sup>b</sup></i>	0,2667	0,1912	0,2097	0,2211
<b>Teste de Hardy-Weinberg</b>				
gl	1	1	1	1
$\chi^2$	0,001022	0,0345	0,6332	0,0708
<i>P</i>	0,9745	0,8527	0,4262	0,7902
<b>G</b>	0,001024	0,0355	0,5824	0,0697
<i>P</i>	0,9745	0,8504	0,4454	0,7918
<b>Genótipos no loco <i>Alb</i></b>				
<i>Alb<sup>aa</sup></i>	25 (25,1695)	29 (29,1493)	28 (28,0492)	82 (82,4127)
<i>Alb<sup>ab</sup></i>	5 (4,6610)	5 (4,7015)	3 (2,9016)	13 (12,1746)
<i>Alb<sup>bb</sup></i>	0 (0,1695)	0 (0,1493)	0 (0,092)	0 (0,4127)
<b>Frequência alélica em <i>Alb</i></b>				
<i>Alb<sup>a</sup></i>	0,9167	0,9265	0,9516	0,9316
<i>Alb<sup>b</sup></i>	0,0833	0,0735	0,0484	0,0684
<b>Teste de Hardy-Weinberg</b>				
gl	1	1	1	1
$\chi^2$	0,1953	0,1690	0,0526	0,4707
<i>P</i>	0,6586	0,6810	0,8186	0,4926
<b>G</b>	0,3642	0,3178	0,1017	0,8822
<i>P</i>	0,5462	0,5729	0,7497	0,3476
<b>Genótipos no loco <i>MDH</i></b>				
<i>MDH<sup>aa</sup></i>	0	0	9 (2,5082)	9 (0,8095)
<i>MDH<sup>ab</sup></i>	0	0	<b>0 (12,9836)</b>	<b>0 (16,3810)</b>
<i>MDH<sup>bb</sup></i>	30	34	22 (15,5082)	86 (77,8095)
<b>Frequência alélica em <i>MDH</i></b>				
<i>MDH<sup>a</sup></i>	0	0	0,2903	0,0947
<i>MDH<sup>b</sup></i>	1,000	1,000	0,7097	0,9053
<b>Teste de Hardy-Weinberg</b>				
gl	-	-	1	1
$\chi^2$	-	-	32,5034	100,1114
<i>P</i>	-	-	<b>0,0000**</b>	<b>0,0000**</b>
<b>G</b>	-	-	38,3835	60,5680
<i>P</i>	-	-	<b>0,0000**</b>	<b>0,0000**</b>

Tabela 3. Continuação.

	Rio Uatumã* N = 27	Rio Trombetas* N=33	Rio Tapajós* N = 26	Total* N = 86
<b>Genótipos no loco PGM-2</b>				
<b>PGM-2<sup>aa</sup></b>	15 (13,2642)	16 (17,4545)	5 (4,9608)	36 (34,4211)
<b>PGM-2<sup>ab</sup></b>	8 (11,4717)	16 (13,0909)	13 (13,0784)	37 (40,1579)
<b>PGM-2<sup>bb</sup></b>	4 (2,2642)	1 (2,4545)	8 (7,9608)	13 (11,4211)
<b>Frequência alélica em PGM-2</b>				
<b>PGM-2<sup>a</sup></b>	0,7037	0,7273	0,4423	0,6395
<b>PGM-2<sup>b</sup></b>	0,2963	0,2727	0,5577	0,3605
<b>Teste de Hardy-Weinberg</b>				
<b>gl</b>	1	1	1	1
<b>χ<sup>2</sup></b>	2,6086	1,4359	0,00097	0,5390
<b>P</b>	0,1063	0,2308	0,9751	0,4628
<b>G</b>	2,4752	1,6216	0,00097	0,5353
<b>P</b>	0,1156	0,2029	0,9751	0,4644

gl = graus de liberdade; Os valores esperados entre parênteses; \* Três, um e cinco exemplares não foram genotipados no loco PGM-2, em Uatumã, Trombetas e Tapajós, respectivamente; \*\*  $P < 0,001$ .

Tabela 4. Testes de homogeneidade utilizando a tabela de contingência para cálculo do  $\chi^2$  aplicados na análise da distribuição das frequências alélicas nos locos polimórficos entre as amostras populacionais e na amostra total de *Podocnemis expansa*.

Loco	Todas as amostras	UAT vs TRB	UAT vs TAP	TRB vs TAP
<b>Tf</b>	$\chi^2_2 = 1,124$ ; $P = 0,570$ G=1,105; $P = 0,576$	$\chi^2_1 = 1,037$ ; $P = 0,309$ G=1,035; $P = 0,309$	$\chi^2_1 = 0,546$ ; $P = 0,460$ G=0,547; $P = 0,460$	$\chi^2_1 = 0,069$ ; $P = 0,792$ G= 0,069; $P = 0,792$
<b>Alb</b>	$\chi^2_2 = 0,628$ ; $P = 0,731$ G=0,656; $P = 0,720$	$\chi^2_1 = 0,042$ ; $P = 0,836$ G=0,042; $P = 0,837$	$\chi^2_1 = 0,608$ ; $P = 0,436$ G=0,613; $P = 0,434$	$\chi^2_1 = 0,355$ ; $P = 0,551$ G= 0,359; $P = 0,549$
<b>MDH</b>	$\chi^2_2 = 41,050$ ; $P = 0,000^{***}$ G=44,375; $P = 0,000^{***}$	§	$\chi^2_1 = 20,434$ ; $P = 0,000^{***}$ G=27,392; $P = 0,000^{***}$	$\chi^2_1 = 22,915$ ; $P = 0,000^{***}$ G=29,859; $P = 0,000^{***}$
<b>PGM-2</b>	$\chi^2_2 = 10,315$ ; $P = 0,006^{**}$ G=10,112; $P = 0,006^{**}$	$\chi^2_1 = 0,081$ ; $P = 0,776$ G=0,081; $P = 0,776$	$\chi^2_1 = 6,398$ ; $P = 0,011^*$ G = 6,466; $P = 0,011^*$	$\chi^2_1 = 8,634$ ; $P = 0,003^{**}$ G=8,682; $P = 0,003^{**}$
<b>Total</b>	$\chi^2_8 = 53,117$ ; $P = 0,000^{***}$			

UAT = Uatumã; TRB = Trombetas; TAP= Tapajós. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  ou \*\*\* $p < 0,001$ . § Loco fixado nas amostras.



**Tabela 5.** Frequência temporal dos alelos ( $Tf^a$  e  $Tf^b$ ) no loco de transferrina em *P. expansa* de três áreas da Amazônia.

	Rio Uatumã		Rio Trombetas		Rio Tapajós		
	Teixeira <i>et al.</i> (1996)	Dados atuais	Teixeira <i>et al.</i> (1996)	Dados atuais	Teixeira <i>et al.</i> (1996)	Dados atuais	Total
$Tf^a$	0,7666	0,7333	0,8333	0,8088	0,8166	0,7903	0,7789
$Tf^b$	0,2333	0,2667	0,1666	0,1912	0,1833	0,2097	0,2211

**Tabela 6.** Teste de contingência para avaliação temporal da distribuição dos alelos ( $Tf^a$  e  $Tf^b$ ) de transferrina em amostras populacionais de *Podocnemis expansa*, de três áreas da Amazônia. Entre parêntese os valores esperados.

	Rio Uatumã <sup>1</sup>		Rio Trombetas <sup>2</sup>		Rio Tapajós <sup>3</sup>		
	Teixeira <i>et al.</i> (1996)	Dado atual	Teixeira <i>et al.</i> (1996)	Dado atual	Teixeira <i>et al.</i> (1996)	Dado atual	Total
$Tf^a$	46 (43,756)	44 (46,737)	85 (85,830)	55 (52,968)	98 (100,980)	49 (48,295)	377
$Tf^b$	14 (9,512)	16 (13,263)	17 (16,170)	13 (15,032)	22 (19,024)	13 (13,705)	95
<b>Total</b>	60	60	102	68	120	62	472

$$(\chi^2_{(5)} = 3.05; 0,70 > P > 0,50)$$

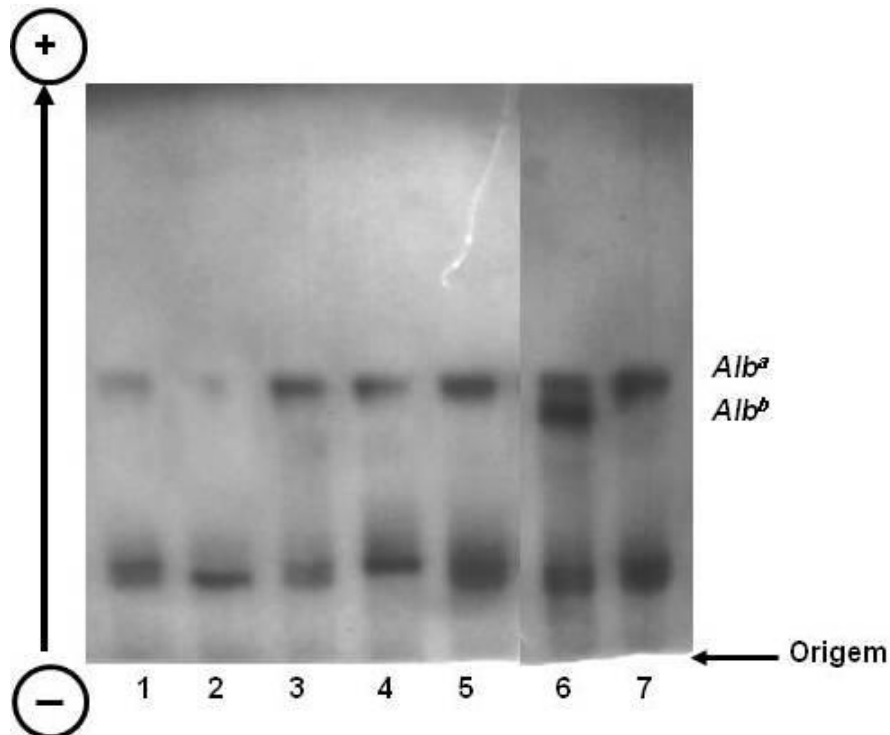
<sup>1</sup> Amostra coletada no rio Uatumã – U.H.E. Balbina (adultos) 13/04 – 22/05/1988.

<sup>2</sup> Amostras coletadas no rio Trombetas em 1984 (juvenis); 24/11/1988 (adultos); 10/01/1990 e 04/01/1992 (filhotes).

<sup>3</sup> Amostra coletada no rio Tapajós em 04/01/1992 (filhotes).

#### 4.1.2. Albumina (Alb)

No eletroferograma de albumina (Figura 4) foi observada a existência de um loco polimórfico denominado de *Alb*, apresentando dois genótipos (*Alb<sup>aa</sup>* e *Alb<sup>ab</sup>*) supostamente codificados pelos alelos co-dominantes (*Alb<sup>a</sup>* e *Alb<sup>b</sup>*). O genótipo (*Alb<sup>bb</sup>*) teoricamente esperado não foi observado em nenhuma das amostras populacionais analisadas. Todas as amostras demonstraram um bom balanço gênico intra e inter populacional, conforme revelado nas análises do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e de verossimilhança máxima (G), onde, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada (Tabela 3). Do mesmo modo que em transferrina, o loco *Alb* nos testes de homogeneidade com análise pareada entre as amostras, e na amostra total, não revelaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 4).

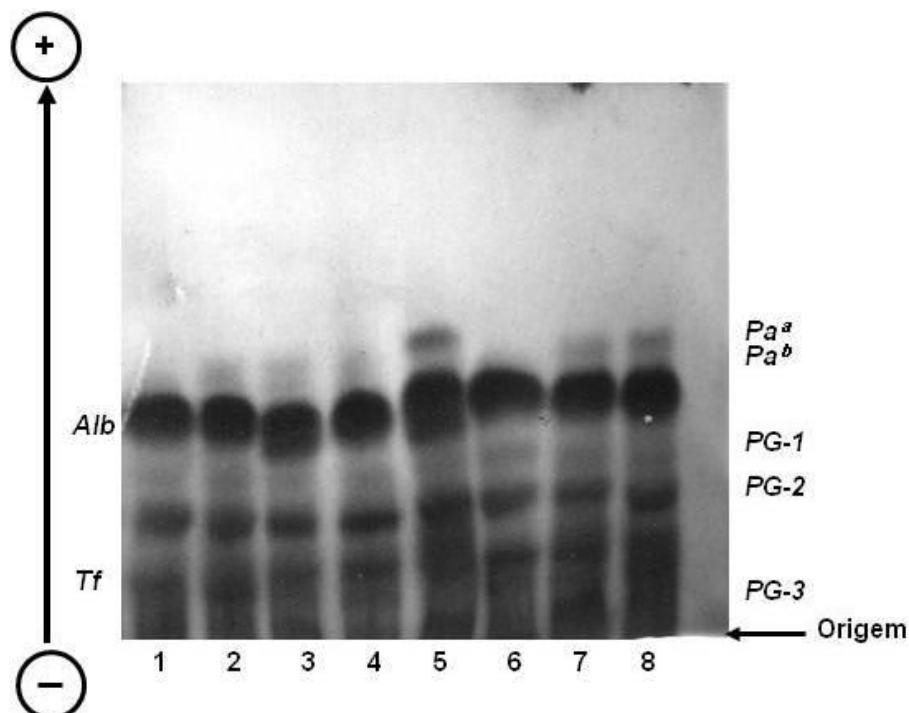


**Figura 4.** Eletroferograma de albumina do plasma revelando o polimorfismo para o loco *Alb* em *P. expansa*: 1 a 5 e 7 (*Alb<sup>aa</sup>*); 6 (*Alb<sup>ab</sup>*).

#### 4.1.3. Proteínas gerais (PG)

Todas as bandas eletroforéticas do plasma, não identificadas como transferrina (Tf) e albumina (Alb), foram consideradas como bandas do padrão de proteínas gerais. As bandas que revelaram migração eletroforética numa zona de atividade eletroforética à frente da albumina foram classificadas como pré-albumina (Pa) (Manwell e Baker, 1970). Esta proteína apresentou um polimorfismo dialélico, onde, três genótipos ( $Pa^{aa}$ ,  $Pa^{ab}$  e  $Pa^{bb}$ ) foram detectados, presumivelmente codificados pelos alelos co-dominantes ( $Pa^a$  e  $Pa^b$ ) no loco  $Pa$  (Figura 5). A utilização desse loco não foi possível, pois, a maioria dos indivíduos analisados não revelou esses alelos nos eletroferogramas, dificultando desse modo, a genotipagem completa dos géis.

Outras bandas foram reveladas, numa zona de atividade eletroforética classificada como pós-albumina, com migração eletroforética imediatamente antes da albumina (Manwell e Baker, 1970), e, supostamente, codificadas pelos locos fixados  $PG-1$  e  $PG-2$  (Figura 5, Tabela 2). Na zona de atividade localizada antes do loco de transferrina foi detecatada uma banda muito difusa ( $PG-3$ ), não sendo possível a sua genotipagem e utilização nas análises genéticas.

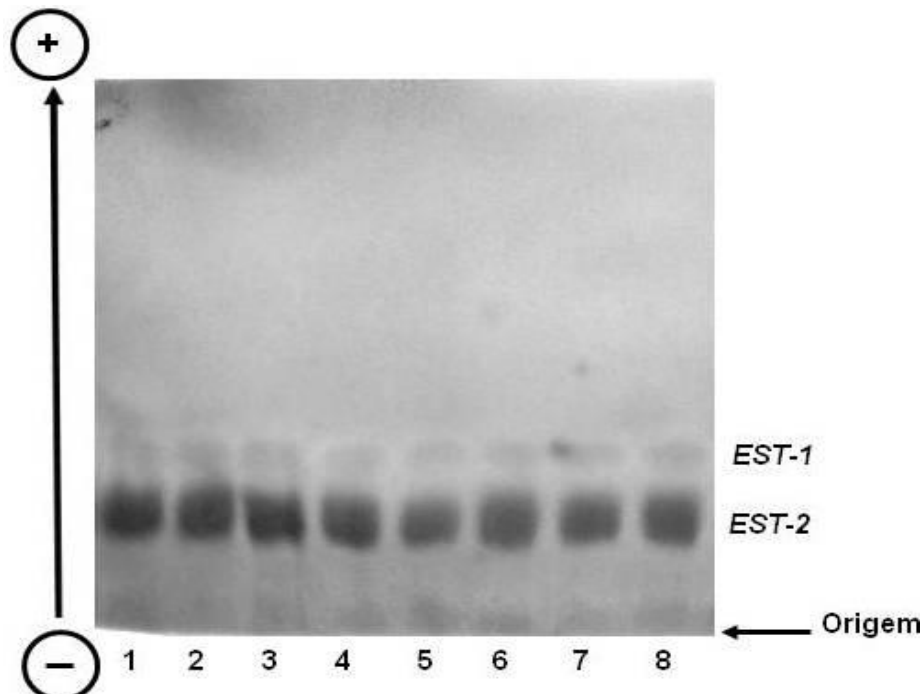


**Figura 5.** Eletroferograma de proteína geral do plasma revelando polimorfismo para o loco  $Pa$  em *P. expansa*: 1, e 6 ( $Pa^{bb}$ ); 3 ( $Pa^{ab}$ ); 2, 5 e 7 ( $Pa^{aa}$ ).

## 4.2. Sistemas enzimáticos

### 4.2.1. Esterase (EST – EC 3.1.1.1)

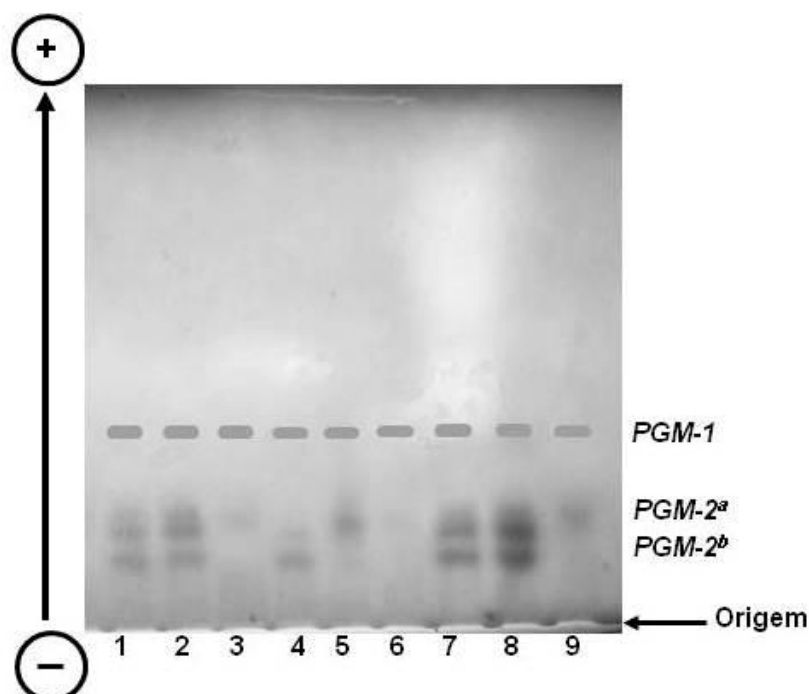
A enzima esterase revelou duas zonas de atividade eletroforética, mostrando um padrão monomórfico de bandas isoenzimáticas, presumidamente codificadas pelos mesmos locos fixados (*EST-1* e *EST-2*) em todas as amostras examinadas da tartaruga da Amazônia (Figura 6, Tabela 2). Os locos (*EST-1* e *EST-2*) foram visualizados no gel numa região mais catódica. O loco *EST-1* apresentou-se fracamente corado, com uma migração eletroforética imediatamente à frente do loco *EST-2*. O loco *EST-2* mostrou-se fortemente corado.



**Figura 6.** Eletroferograma de esterase do plasma revelando o monomorfismo para o loco *EST-1*, *EST-2* em *P. expansa*.

#### 4.2.2. Fosfoglucomutase (PGM – EC 5.4.2.2)

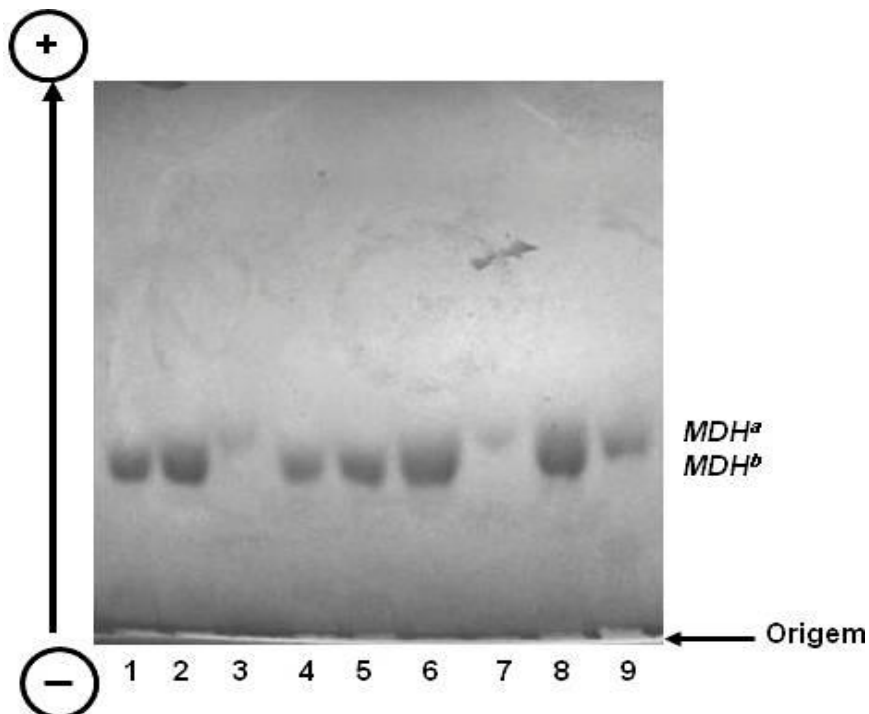
A enzima fosfoglucomutase aprestou dois locos, mostrando um padrão monomórfico para loco fixado *PGM-1* e polimórfico para o loco *PGM-2* (Figura 7). O loco *PGM-2* apresentou os três genótipos teoricamente esperados (*PGM-2<sup>aa</sup>*, *PGM-2<sup>ab</sup>* e *PGM-2<sup>bb</sup>*) presumivelmente codificados pelos alelos co-dominantes (*PGM-2<sup>a</sup>* e *PGM-2<sup>b</sup>*). Os locos (*PGM-1* e *PGM-2*) foram visualizados numa região mais catódica do gel, sendo o loco *PGM-1* o que apresentou uma migração eletroforética mais rápida com uma banda fracamente corada. O loco *PGM-2* apesar de ter apresentado nos zimogramas bandas passíveis de serem genotipadas para a maioria dos exemplares examinados, nove exemplares não puderam ser genotipados, devido à baixa resolução dessas bandas. As amostras analisadas mostraram um bom balanço genético intra e inter populacional, conforme revelado nas análises de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e de verossimilhança máxima (G), onde, não se detectou nenhuma diferença estatisticamente significativa (Tabela 3). No entanto, os testes de homogeneidade com análise pareada entre as amostras revelaram diferenças estatisticamente significativas entre todos os pareamentos feitos com a amostra populacional do Tapajós, bem como na amostra total (Tabela 4).



**Figura 7.** Representação esquemática do monomorfismo no loco *PGM-1*, e zimograma do polimorfismo no loco *PGM-2*, na enzima fosfoglucomutase do plasma de *P. expansa*: 3, 5, 6 e 9 (*PGM-2<sup>aa</sup>*); 1, 2, 7 e 8 (*PGM-2<sup>ab</sup>*); 4 (*PGM-2<sup>bb</sup>*).

#### 4.2.3. Malato desidrogenase (MDH – EC 1.1.1.37)

Os zimogramas de MDH revelaram uma zona de atividade eletroforética situada na região mais catódica do gel, supostamente controlada pelo loco *MDH* (Figura 8). Esse loco mostrou-se polimórfico na amostra populacional do Tapajós, com os genótipos ( $MDH^{aa}$  e  $MDH^{bb}$ ) produzidos pela ação presumível dos alelos co-dominantes ( $MDH^a$  e  $MDH^b$ ), porém, com ausência do genótipo teórico  $MDH^{ab}$ . Nas amostras populacionais do Uatumã e Trombetas este loco demonstrou-se fixado para o alelo  $MDH^b$  (Tabela 3). Como pode ser observado o alelo  $MDH^a$  e genótipo  $MDH^{aa}$  foram detectados apenas na amostra do Tapajós. Devido à enorme deficiência de heterozigotos, a amostra populacional do Tapajós e a amostra total não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, conforme demonstrado nas análises do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e de verossimilhança máxima (G) (Tabela 3). Os testes de homogeneidade com análise pareada entre as amostras revelaram diferenças estatísticas altamente significativas entre todos os pareamentos feitos com a amostra populacional do Tapajós, e na amostra total (Tabela 4).



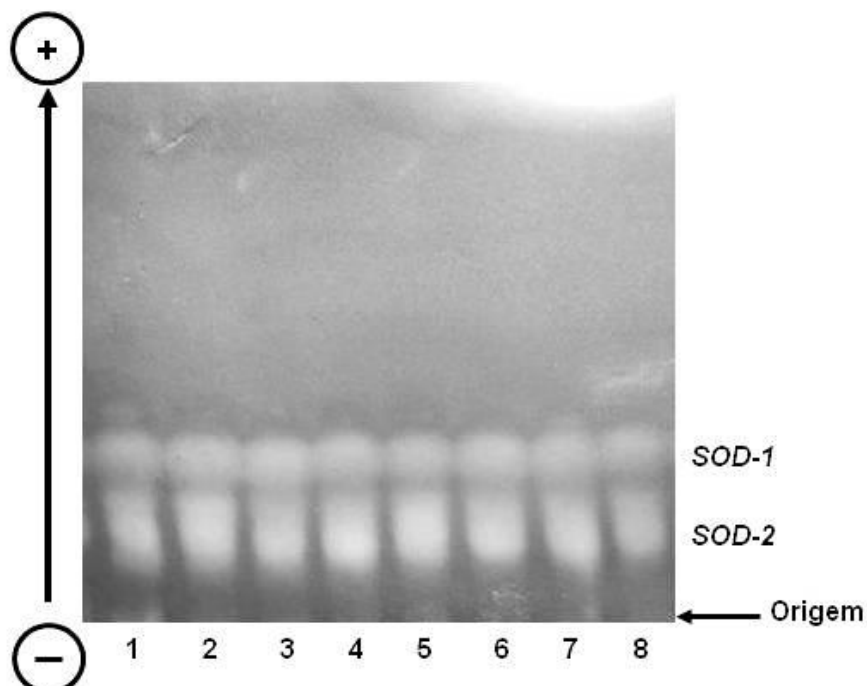
**Figura 8.** Zimograma de malato desidrogenase do plasma revelando polimorfismo para o loco *MDH* em *P. expansa*: 1, 2, 4, 5, 6 e 8 ( $MDH^{bb}$ ); 3, 7 e 9 ( $MDH^{aa}$ ).

#### 4.2.4. Sorbitol desidrogenase (SDH – EC 1.1.1.14)

Em ambos os sistemas de coloração baseados nos métodos de Allendorf *et al.* (1977) e Shaw e Prasad (1970) com modificações, esta enzima apresentou um padrão de bandas de baixa resolução eletroforética, i.e., fracamente coradas, inviabilizando a sua genotipagem, não sendo desse modo, incluída nas análises genéticas.

#### 4.2.5. Superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1)

As análises realizadas com a enzima superóxido dismutase revelaram duas zonas de atividade eletroforética, com um padrão monomórfico de bandas isoenzimáticas, presumivelmente codificadas pelos locos fixados (*SOD-1* e *SOD-2*), em todas as amostras examinadas (Figura 9, Tabela 2). Os locos (*SOD-1* e *SOD-2*) foram detectados numa região mais catódica do gel. O loco *SOD-1* migrou um pouco à frente do loco *SOD-2*. Eventualmente, notou-se a presença de bandas satélites posicionadas à frente do loco *SOD-1*.



**Figura 9.** Zimograma de superóxido dismutase do plasma revelando o monomorfismo para os locos *SOD-1* e *SOD-2* em *P. expansa*.

### 4.3. Desiquilíbrio de ligação

A hipótese de segregação independente entre os pares dos locos polimórficos detectados em *P. expansa* foi testada por meio das estimativas do qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Das seis possíveis combinações entre os pares de locos, não se detectou diferenças estatisticamente significativas (Tabela 7).

**Tabela 7.** Análise de desequilíbrio de ligação entre os locos polimórficos detectados nas amostras populacionais de *P. expansa*.

<b>Locos comparados</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>gl</b>	<b>P</b>
<b><i>Tf e Alb</i></b>	0,38	1	0,5353
<b><i>Tf e MDH</i></b>	0,76	1	0,3836
<b><i>Tf e PGM-2</i></b>	0,21	1	0,6505
<b><i>Alb e MDH</i></b>	2,98	1	0,0841
<b><i>Alb e PGM-2</i></b>	0,96	1	0,3261
<b><i>MDH e PGM-2</i></b>	2,03	1	0,1538

### 4.4. Medidas de variabilidade genética

Usando o critério de polimorfismo 0,95 (alelo comum com uma frequência igual ou menor que 0,95) as amostras populacionais de Uatumã e Trombetas apresentaram um polimorfismo de 27,27%, enquanto que, Tapajós e amostra total 36,36% (Tabela 8). Esse ganho de polimorfismo revelado na amostra populacional do Tapajós e na amostra total, deveu-se ao polimorfismo do loco *MDH* detectado apenas na amostra do Tapajós. O número médio de alelos por loco nas amostras do Uatumã e Trombetas foi de 1,27, e na amostra do Tapajós 1,36. A heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) na amostra populacional do Uatumã foi de 0,0785, Trombetas 0,0869 e Tapajós 0,0771. A heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) na amostra do Uatumã foi de 0,0874, Trombetas 0,0766, e Tapajós 0,1211. Como pode ser notado Tapajós apresentou um valor de  $H_e$  bem mais elevado em relação às outras duas amostras.



**Tabela 8.** Variabilidade genética de 11 locos examinados entre três amostras populacionais de *Podocnemis expansa*.

	Rio Uatumã	Rio Trombetas	Rio Tapajós	Total
<b>Nº médio de amostra por loco</b>	29,6	33,9	30,5	94
<b>Nº de locos</b>	11	11	11	11
<b>Polimorfismo</b>	27,27	27,27	36,36	36,36
<b>Nº médio de alelos por loco</b>	1,27	1,27	1,36	1,36
<b>Nº de locos polimórficos</b>	3	3	4	4
<b>Ho média</b>	0,0785 (0,1442)	0,0869 (0,1668)	0,0771 (0,1553)	0,0811 (0,1533)
<b>*He média</b>	0,0874 (0,1632)	0,0766 (0,1439)	0,1211 (0,1933)	0,1004 (0,1631)

Entre parêntese os valores do desvio padrão. \* Heterozigidade esperada de (Nei, 1973).

#### 4.5. Estrutura genética e teste de homogeneidade populacional

As estimativas da estrutura genético-populacional (Tabela 9), usando a estatística  $F$  de Wright nas amostras populacionais examinadas, revelaram valores médios de  $F_{IS}$  e  $F_{IT}$  de 0,1347 e 0,1912, que são considerados moderado e moderadamente alto, respectivamente, de acordo com os valores arbitrários definidos por Wright (1978). O loco que contribuiu fortemente para isso foi o *MDH*, onde, se detectou uma grande deficiência de indivíduos heterozigotos na amostra populacional do Tapajós (Tabela 3). O loco *Alb* foi o único a apresentar valores negativos, devido ao pequeno excesso de indivíduos heterozigotos nas amostras. O valor médio de  $F_{ST}$  foi de 0,0652, indicando uma diferenciação genética moderadamente baixa entre as amostras populacionais, usando os valores arbitrários de Wright (1978). Os locos que mais contribuíram para a diferenciação genética entre as amostras foram *MDH* e *PGM-2*, em função da diferença estatisticamente significativa na distribuição dos alelos desses locos, como demonstrado nos testes de homogeneidade (Tabela 4). A estimativa de fluxo gênico expressa como número de migrantes por geração ( $Nm$ ) entre as amostras populacionais foi de 3,58 (Tabela 9).

**Tabela 9.** Estimativas do  $F_{ST}$  e  $Nm$  por loco em todas as amostras populacionais de *P. expansa*.

Locos	Nº Amostrai	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	*Nm
<i>Tf</i>	190	0,0174	0,0233	0,0060	41,65
<i>Alb</i>	190	-0,0771	-0,0734	0,0034	73,31
<i>PG-1</i>	190	-	-	0,0000	-
<i>PG-2</i>	190	-	-	0,0000	-
<i>EST-1</i>	190	-	-	0,0000	-
<i>EST-2</i>	190	-	-	0,0000	-
<i>MDH</i>	190	1,000	1,000	<b>0,2143</b>	0,92
<i>PGM-1</i>	190	-	-	0,0000	-
<i>PGM-2</i>	172	0,0198	0,0895	<b>0,0711</b>	3,27
<i>SOD-1</i>	190	-	-	0,0000	-
<i>SOD-2</i>	190	-	-	0,0000	-
<b>Média</b>	188	0,1347	0,1912	<b>0,0652</b>	3,58

\*Nm= estimativa do fluxo gênico a partir de  $F_{ST} = 0.25(1 - F_{ST})/F_{ST}$ .

A comparação par-a-par das estimativas do coeficiente de diferenciação genética ( $F_{ST}$  de Wright) entre as amostras populacionais revelou uma estruturação moderadamente baixa entre as comparações feitas com Tapajós. Não se detectou estruturação entre Uatumã vs Trombetas. A comparação par-a-par realizada por meio dos testes exatos de diferenciação populacional entre as amostras populacionais demonstrou uma diferença estatística altamente significativa, entre todas as comparações feitas com a amostra populacional do Tapajós (Tabela 10). Os resultados dos testes exatos corroboraram com os resultados obtidos pelos testes de homogeneidade (Tabela 4).

**Tabela 10.** Comparação par-a-par dos testes exatos de diferenciação populacional (Raymond e Rousset, 1995), com base na distribuição das frequências alélicas dos locos polimórficos nas amostras populacionais de *P. expansa*. Acima da diagonal as estimativas de  $F_{ST}$  com Nm entre parênteses.

	Uatumã	Trombetas	Tapajós
Uatumã	-	0,0035 (71,15)	<b>0,061</b> (3,62)
Trombetas	$\chi^2_{(6)} = 2,230$ ; $P = 0,897$	-	<b>0,066</b> (3,54)
Tapajós	$\chi^2_{(8)} = 31,230$ ; $P = 0,0001^*$	$\chi^2_{(8)} = 33,023$ ; $P = 0,0001^*$	-

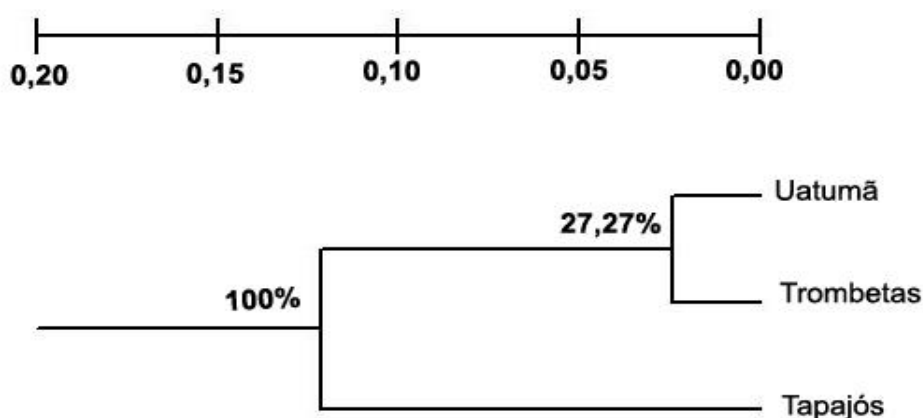
\*p < 0,001.

#### 4.6. Distância genética

As estimativas das distâncias genéticas segundo o critério de Rogers (1972) modificado por Wright (1978), revelaram uma menor distância entre as amostras populacionais de Uatumã vs Trombetas, ao contrário dos maiores valores encontrados entre essas amostras *versus* Tapajós (Tabela 11). O dendrograma com base no método UPGMA ilustra o menor distanciamento genético entre Uatumã e Trombetas, bem como o maior distanciamento destas amostras com relação a amostra do Tapajós (Figura 10). Os valores de consistência interna de cada nó obtidos pelo método de bootstrap são apresentados, onde, o nó que inclui as amostras populacionais de Uatumã e Trombetas, apresentou um suporte baixo de 27,27%, enquanto o nó que inclui as amostras de Uatumã, Trombetas e Tapajós um suporte de 100%.

**Tabela 11.** Distância de Rogers (1972) modificado por Wright (1978) entre as amostras populacionais de *Podocnemis expansa*.

	Uatumã	Trombetas	Tapajós
Uatumã	-	-	-
Trombetas	0,0240	-	-
Tapajós	0,1195	0,1230	-



**Figura 5.** UPGMA usando a distância de Rogers modificada por Wright (1978) das amostras populacionais de *Podocnemis expansa*.

## 5. Discussão

### 5.1. Padrões eletroforéticos monomórficos

Os locos *PG-1*, *PG-2*, *EST-1*, *EST-2*, *SOD-1*, *SOD-2* e *PGM-1* apresentaram padrões eletroforéticos monomórficos em todas as amostras populacionais de tartaruga da Amazônia (*P. expansa*) examinadas (Tabela 2), porém, existe a possibilidade de alguns ou mesmo todos esses locos serem polimórficos em outras amostras populacionais dessa espécie como demonstrado por Bock *et al.* (2001) no loco de esterase, e, também, no presente estudo para o loco *MDH*. A enzima esterase analisada por Bock *et al.* (2001), apresentou um único loco monomórfico (*EST*) para as amostras populacionais de *P. expansa* coletadas no Brasil, diferentemente, da amostra populacional coletada no Peru, que se mostrou polimórfica para esse mesmo loco. A detecção de dois locos monomórficos de esterase (*EST-1* e *EST-2*) nas amostras populacionais de tartaruga da Amazônia analisadas no presente trabalho, contrasta com os resultados de Bock *et al.* (2001), possivelmente, em razão das diferentes técnicas eletroforéticas e tipos de tecidos biológicos usados por esses autores.

### 5.2. Padrões eletroforéticos polimórficos

O padrão eletroforético do loco *Tf* em *P. expansa*, demonstrou o mesmo polimorfismo descrito por Teixeira *et al.* (1996), com a presença dos alelos  $Tf^a$  e  $Tf^b$  (Figura 3; Tabela 3).

O padrão eletroforético de albumina (Figura 4; Tabela 3), revelou a ausência do genótipo  $Alb^{bb}$ , o que não significa que este genótipo não exista na população. Caso semelhante foi descrito para o loco *Tf* por Teixeira *et al.* (1996), onde o genótipo  $Tf^{bb}$  não foi observado em três amostras, porém em novas amostragens o mesmo foi detectado. Acredita-se que o mesmo possa estar ocorrendo com o loco *Alb*, onde, em uma futura amostragem populacional o genótipo  $Alb^{bb}$  poderá ser encontrado.

A não genotipagem do loco polimórfico pré-albumina (*Pa*), ocorreu, possivelmente, devido a quatro fatores: 1 - baixa concentração de pré-albumina no plasma; 2 - sobreposição com a zona de atividade da albumina; 3 - influência do estado fisiológico dos indivíduos; e 4 - ambiental, ou mesmo todos esses fatores

combinados podem dificultar o estudo desse loco (Manwell e Baker, 1970). Desse modo, desde que se aplique uma outra técnica de isolamento e coloração, esse loco talvez possa ser futuramente usado em estudos genético-populacionais dessa espécie, como demonstrado em babuínos (Shotake *et al.*, 1977), cavalo (Gahne, 1965) e frango (Brodacki *et al.*, 2003).

A enzima PGM foi identificada como dialélica (polimórfica) para o loco *PGM-2* nas três amostras populacionais, com a presença de todos os genótipos teoricamente possíveis (*PGM-2<sup>aa</sup>*, *PGM-2<sup>ab</sup>* e *PGM-2<sup>bb</sup>*) (Figura 7; Tabela 3). Observou-se uma variação na frequência alélica desse loco na amostra do Tapajós, onde, o alelo mais frequente *PGM-2<sup>b</sup>*, quase que dobrou em frequência em relação as outras amostras examinadas. Adicionalmente, verificou-se um aumento na frequência de indivíduos heterozigotos *PGM-2<sup>ab</sup>* observados ( $\approx 50\%$ ) nas amostras do Trombetas e Tapajós em relação a amostra do Uatumã. Esse aumento pode ser atribuído, possivelmente, a mistura de material genético, dado ao transporte realizado por técnicos do Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF), à época, de 130 fêmeas poederas da tartaruga da Amazônia do Trombetas para o Tapajós, ocorrido entre os anos de 1970 e 1974, visando a preservação da espécie (Alfinito *et al.*, 1976). Além disso, no loco *PGM* de camarão marinho, *Palaemon elegans* já foi registrado a ação seletiva do mercúrio (Hg), onde, esse metal agiu na seleção de genótipos, promovendo um aumento da frequência do heterozigoto MS nesse loco (Nevo *et al.*, 1984). Esses autores sugeriram a possibilidade de se usar marcadores alozímicos polimórficos como indicadores de poluição ambiental. Na região do rio Tapajós existem registros de contaminação por Hg em peixes (Sampaio da Silva *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2003), humanos (Pinheiro *et al.*, 2006), e simultaneamente, nesses dois organismos (Bidone *et al.*, 1997), bem como em quelônios aquáticos da Amazônia: *Peltocephalus dumerilianus*, *Chelus fimbriatus*, *Podocnemis erythrocephala*, *P. expansa* e *P. unifilis* (Schneider, 2007; Schneider *et al.*, 2009). Essa contaminação ocorre, principalmente, devido a presença de "garimpos" na região, onde, o mercúrio é utilizado no processo de extração do ouro; além do desmatamento por meio de queimadas com emissão de Hg na atmosfera e posterior contaminação dos ambientes aquáticos (Veiga *et al.*, 1994). A região do Trombetas embora não seja considerada uma área específica de garimpo na Amazônia, apresenta também registro de contaminação de peixes por Hg (Faial *et*

*al.*, 2005). Sendo assim, não se pode descartar a seleção do genótipo heterozigoto  $PGM^{ab}$  pelo Hg em *P. expansa*, e a utilização desse loco como possível indicador genético de poluição na região.

A enzima MDH apresentou-se monomórfica nas amostras do Uatumã e Trombetas com a presença do genótipo  $MDH^{bb}$ , e polimórfica na amostra do Tapajós com os genótipos ( $MDH^{aa}$  e  $MDH^{bb}$ ), e total ausência de indivíduos heterozigotos  $MDH^{ab}$  (Figura 8; Tabela 3). A completa ausência de heterozigotos em um sistema de polimorfismo dialélico em locos protéico-isoenzimáticos é relativamente rara, porém, existe na literatura registros dessa ausência em diversos estudos realizados com amostras populacionais de vários organismos: árvores (Shimizu *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001), peixes (Steenkamp *et al.*, 2001; Buth e Mayden, 2001), rã (Case, 1978), toupeira (Paulauskas e Starodubaité, 2003) e hamsters (Yiğit *et al.*, 2007). Destaca-se ainda o fato de Buth e Mayden (2001) terem detectado essa ausência no loco *MDH-B*. Entre os fatores que presumivelmente poderiam estar contribuindo para ausência de heterozigotos no loco *MDH* da amostra populacional do Tapajós, estão: 1. diferenças adaptativas entre genótipos (Nevo *et al.*, 1984); 2. existência de outros locos que estejam em desequilíbrio de ligação com o loco ora examinado, já que, esse tipo de associação entre locos é bem passível de ocorrer (Futuyma, 1997); 3. seleção contra indivíduos heterozigotos (Gillespie, 1998; Beiguelman, 2008); 4. endocruzamento (Wright, 1921); 5. efeito Wahlund (mistura física de duas populações geneticamente distintas) (Smith *et al.*, 1981); e 6. produção de uma proteína não funcional, i.e., alelo nulo (Ferguson, 1980), levando a uma falsa observação de homozigotos (exclui-se nessa amostra essa possibilidade em função da presença dos dois alelos nos géis).

A observação do alelo  $MDH^a$  e genótipo  $MDH^{aa}$  apenas na amostra do Tapajós pode ser atribuída, possivelmente, aos seguintes processos evolutivos: mutação, recombinação, deriva gênica, seleção natural, migração e efeito gargalo na população (Ayala e Kiger, 1980; Frankham *et al.*, 2008). Certamente que não se pode atribuir a associação do alelo  $MDH^a$  e genótipo  $MDH^{aa}$  com o tamanho e idade dos indivíduos analisados, pois, todas as amostras eram de filhotes eclodidos praticamente na mesma época (Tabela 1), e, além disso, análises preliminares de alguns exemplares adultos provenientes do rio Branco, AM, também apresentaram

esse mesmo alelo e genótipo (pesquisa em andamento no Laboratório de Genética Animal do CPBA/INPA).

A razão sexual da tartaruga da Amazônia já foi estimada na região do rio Caquetá na Colômbia, por Valenzuela *et al.* (1997), com valores divergentes dos apresentados por Alho *et al.* (1985), na região do Trombetas. No entanto, devido a maior similaridade climatológica entre as regiões do Trombetas e Tapajós, por estarem inseridas no corredor da seca (Vanzolini, 1992), adotou-se a razão de um macho para 30 fêmeas ( $\approx 34^{\circ}\text{C}$  em covas descobertas) (Alho *et al.*, 1985), como sendo presumivelmente a mesma na região do Tapajós, onde, as covas estavam igualmente descobertas. Sendo assim, a análise da distribuição dos alelos ( $MDH^a$  e  $MDH^b$ ) e dos genótipos ( $MDH^{aa}$  e  $MDH^{bb}$ ) entre machos e fêmeas da amostra do Tapajós examinada, por meio de testes da probabilidade exata de Fisher (1935) em tabelas  $2 \times 2$ , não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa. Considerando os nove espécimes de  $MDH^{aa}$  observados na amostra do Tapajós, as probabilidades estimadas na hipótese ( $H_1$ ) de termos nessa amostra um macho e oito fêmeas com o genótipo  $MDH^{aa}$  e 22 fêmeas  $MDH^{bb}$ , utilizando-se a distribuição dos alelos  $MDH^a$  e  $MDH^b$  e dos genótipos  $MDH^{aa}$  e  $MDH^{bb}$  entre os sexos, foram:  $P = 0,0809$  e  $P = 0,2903$ , respectivamente; e na outra hipótese ( $H_2$ ) de termos um macho  $MDH^{bb}$ , nove fêmeas  $MDH^{aa}$  e 21 fêmeas  $MDH^{bb}$ , utilizando-se a distribuição desses alelos e genótipos entre os sexos, foram:  $P = 0,7079$  e  $P = 0,5003$ , respectivamente (Anexo I). No entanto, apenas a sexagem e genotipagem da enzima  $MDH$  dos indivíduos amostrados permitiriam examinar com maior precisão uma possível associação do alelo  $MDH^a$  e genótipo  $MDH^{aa}$  com o sexo, porém, isso só seria possível mediante uma nova autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), prevendo o sacrifício dos animais.

### 5.3. Desequilíbrio de ligação

Em estudos genético-populacionais onde normalmente se utiliza um sistema de locos múltiplos exibindo polimorfismo, faz-se necessário submetê-los a testes do desequilíbrio de ligação gênica, já que, a coadaptação genética pode existir entre alguns alelos, mas, não em outros dentro da mesma população. Nessas

circunstâncias, certos alelos de um dado loco podem também estar coadaptados com outros de locos distintos (Ayala e Kiger, 1980; Allendorf e Luikart, 2007).

Considerando que os alelos dos diferentes locos aqui examinados em *P. expansa* não estão associados (Tabela 7), e, presumivelmente, estão segregando independentemente (ausência de epistasia), os mesmos podem ser utilizados em subsequentes estudos genético-populacionais, que requeiram o equilíbrio gamético entre locos, como pressuposto básico. Desse modo, a aplicação desses locos como marcadores genético-populacionais, provavelmente, não deve influenciar na estimativa de parâmetros sobre a estrutura genética populacional dessa espécie. Em contra partida, ressalta-se a possibilidade de alguns desses locos estarem em desequilíbrio de ligação com outros locos ainda não examinados, devido a processos evolutivos, a saber: endogamia, deriva gênica, seleção, efeito gargalo da população e efeito Wahlund (Ayala e Kiger, 1980; Durand *et al.*, 2003; Hartl, 2008).

#### **5.4. Avaliação temporal do loco Tf**

Pesquisas envolvendo variação temporal das frequências alélicas de marcadores genético-moleculares, podem ser extremamente úteis para se investigar variabilidade genética, tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ), efeito fundador e processos associados com a colonização e estruturação genético-populacional (Waples, 1989; Kambhampati *et al.*, 1990; Shikano *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2003; Jacquemyn *et al.*, 2006; Chevolot *et al.*, 2008; Lucentini *et al.*, 2009).

A ausência de variação temporal no loco *Tf* em *P. expansa*, quando os dados do presente estudo foram comparados com os de Teixeira *et al.* (1996), num período de 16 a 24 anos (Tabela 6), revela que embora essas amostras durante esse tempo venham sofrendo algum nível de predação para subsistência e/ou comercialização (Alho, 1985; Silva e Begossi, 2007; Alves e Santana, 2008), esse loco tem preservado a sua integridade num período de no mínimo duas gerações, já que, de acordo com Vogt (2008) essa espécie leva de oito a 12 anos para atingir a sua maturidade reprodutiva. Isso significa dizer que, em tese, nesse intervalo mínimo de tempo (duas gerações), nem a ação antropogênica acima citada, nem os processos evolutivos que normalmente contribuem para alteração da composição genética das populações: mutação, migração, deriva gênica, seleção natural, entre outros (Ayala e Kiger, 1980; Hartl, 2008) foram suficientes para causar alterações significativas no



loco *Tf* de *P. expansa*. Desse modo, recomenda-se pesquisas com séries históricas dos marcadores genético-moleculares já examinados em *P. expansa*: transferrina (Teixeira *et al.*, 1996); aloenzimas (Bock *et al.*, 2001); DNA nuclear e mitocondrial (Sites *et al.*, 1999; Pearse *et al.*, 2006b) sejam realizadas rotineiramente a fim de se obter informações sobre a composição genética dos estoques naturais, visando o monitoramento, preservação e manejo da espécie. Essas informações poderão nortear as ações protecionistas ora conduzidas pelo Instituto Chico Mendes da Biodiversidade (ICMBIO) e Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios (RAN).

### 5.5. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O teste de Hardy-Weinberg é um método estatístico simplificado normalmente usado para descrever as características genéticas de uma população por meio da expansão binomial de Hardy-Weinberg. Esse método permite descrever uma população pelas frequências alélicas e genótípicas exibidas em cada loco, também usado para descrever os efeitos da seleção natural. O principal pressuposto da Lei de Hardy-Weinberg é que, em uma população infinitamente grande na ausência dos processos evolutivos: mutação, migração, deriva e seleção natural, as frequências gênicas permanecerão constantes ao longo das gerações. Essa lei diz ainda que, se os cruzamentos ocorrerem ao acaso, as frequências genótípicas estarão relacionadas as frequências gênicas por meio da expansão do binômio:  $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = (1^2) = 1$ , onde,  $p$  e  $q$ , correspondem as frequências dos dois diferentes alélicos numa suposta população em equilíbrio genético (Ayala e Kiger, 1980; Ferguson, 1980; Allendorf e Luikart, 2007).

Dos quatro locos polimórficos analisados (*Tf*, *Alb*, *MDH*, *PGM-2*) apenas o loco *MDH* mostrou-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra populacional do Tapajós, com repercussão na amostra total (Tabela 3). Testes do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e de verossimilhança máxima (G), para examinar a distribuição alélica e genotípica no loco *MDH*, revelaram resultados altamente significativos com  $P < 0,001$ . Como já discutido anteriormente (item 5.2), dentre os fatores que podem estar causando o desequilíbrio genético no loco *MDH* listam-se: diferenças adaptativas entre genótipos, desequilíbrio de ligação, seleção contra heterozigotos,

endocruzamento, efeito Wahlund, e presença de alelo nulo. Entre esses fatores enumerados, com exceção do alelo nulo, possibilidade descartada na amostra do Tapajós, um ou mais fatores atuando de forma combinada, podem estar afetando a distribuição alélica e genotípica no loco *MDH* nessa amostra. Sendo assim, deverá ser realizada uma amostragem populacional mais abrangente na área de ocorrência da *P. expansa* será necessária, com análise preferencialmente dos locos examinados no presente estudo, além de outros, no intuito de melhor compreender esse peculiar desequilíbrio genético detectado na amostra do Tapajós. Adicionalmente, como já mencionado (item 5.4), faz-se necessário prementemente a realização de estudos futuros com séries históricas dos marcadores genético-moleculares já investigados em *P. expansa*, para avaliar quais os alelos em determinados locos poderiam estar aumentando ou diminuindo em frequência, ao longo de subsequentes gerações.

#### **5.6. Medidas de variabilidade genética**

O conhecimento da distribuição das frequências alélicas, em pesquisas da variabilidade genética, é fundamental em estudos genético-populacionais. Esse tipo de pesquisa contribui significativamente para o conhecimento da história evolutiva de uma dada população, pois, pode indicar a ação de determinados mecanismos evolutivos sobre a população em estudo, tais como: endogamia, deriva gênica, efeito fundador e gargalos populacionais. Adicionalmente, com a comparação de frequências alélicas, é possível demonstrar se determinadas populações apresentam ou não histórias evolutivas similares (Hartl, 2008).

A variação genética de uma população é geralmente medida pela proporção de locos polimórficos ( $P$ ), heterozigosidade média por loco ( $H$ ), número de locos polimórficos e número médio de alelos por loco (Nei, 1975).

Dentre essas medidas, a heterozigosidade é a mais informativa, sendo portanto, a preferida pela maioria dos geneticistas populacionais, e menos afetada pelo tamanho amostral (Ayala e Kiger, 1980). Segundo esses autores, essa medida de variabilidade genética é considerada boa porque estima a probabilidade de que dois alelos retirados ao acaso de uma população sejam diferentes. Argumentam ainda esses autores que um loco com dois alelos, e outro com 20 alelos são considerados igualmente polimórficos, além da arbitrariedade na escolha do critério

de polimorfismo a ser utilizado (0,95 ou 0,98), i.e., com a frequência do alelo mais comum, não maior do que 0,95 ou 0,98.

No presente trabalho, a heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) na amostra de *P. expansa* do Uatumã foi de 0,0874, Trombetas 0,0766, e Tapajós 0,1211. A amostra populacional do Tapajós foi a que apresentou maior variação entre a heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) (0,0771 e 0,1211, respectivamente) (Tabela 8), devido ao nível de polimorfismo detectado no loco de *MDH*, onde, as frequências alélicas de *MDH<sup>a</sup>* e *MDH<sup>b</sup>*, foram de aproximadamente 0,29 e 0,71, respectivamente, apenas nessa amostra. Em função disso, notou-se também uma grande variação entre essas medidas  $H_o$  e  $H_e$  na amostra total. O valor de  $H_e$  na amostra do Tapajós (0,1211), foi bem maior que os valores revelados nas duas outras amostras analisadas no presente estudo Uatumã (0,0874) e Trombetas (0,0766), e nas examinadas por Bock *et al.* (2001), que observaram o valor de 0,043 na amostra do Peru; 0,072 e 0,078 nas amostras do Brasil. No entanto, esses valores estão dentro dos limites estimados para o grupo de répteis, onde, em estudos com marcadores protéico-isoenzimáticos, essa medida variou de 0,05 a 0,124 (Chakraborty *et al.*, 1980; Ferguson, 1980; Allendorf e Luikart, 2007).

Em *Pseudemys scripta*, o polimorfismo ( $P$ ) estimado foi de 0,61 (Scribner *et al.*, 1986), em *P. unifilis* variou de 0,17 a 0,30, e em *P. expansa* foi de 0,17 (Bock *et al.*, 2001). Os valores do polimorfismo observados nas amostras populacionais de *P. expansa* no presente estudo foi de 0,27 nas amostras de Uatumã e Trombetas, e de 0,36 na amostra do Tapajós, sendo esses valores bem acima do valor estimado por Bock *et al.* (2001). Enfatiza-se o fato de a amostra do Tapajós estar apresentando um polimorfismo de 33% a mais, em relação as amostras de Uatumã e Trombetas, e 122% a mais em relação as amostras examinadas por Bock *et al.* (2001). Além disso, as amostras do presente estudo demonstraram valores de  $P$  acima do valor apresentado em répteis ( $P = 0,23$ ) (Ferguson, 1980; Ayala e Kiger, 1980; Hartl, 2008).

A amostra populacional de *P. expansa* do Tapajós com um número médio de alelos por loco igual a 1,36, que excedeu as amostras do Uatumã e Trombetas que revelaram o mesmo valor de 1,27. Esse destaque revelado em Tapajós nas medidas de variação genética estimadas no presente estudo com proteínas plasmáticas, são compatíveis com os resultados apresentados por Sites *et al.* (1999), que estudando

marcadores de DNA mitocondrial e microssatélites dessa espécie, detectaram também uma maior riqueza alélica e um maior número de haplótipos na amostra populacional do Tapajós em relação a amostra do Araguaia. Pearse *et al.* (2006b) trabalhando também com DNA mitocondrial e microssatélites, confirmaram essa alta variabilidade genética do Tapajós em relação à maioria das amostras populacionais por eles investigadas.

### 5.7. Estrutura genética

Com o objetivo de gerar informações sobre a estrutura genética de populações naturais para fins de melhoramento e conservação genética das espécies, muitos pesquisadores têm empregado as estatísticas  $F$  de Wright (Dias, 1998). O parâmetro utilizado para estimar o grau de fixação gênica, resultante da endogamia biparental é o coeficiente  $F$  ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  e  $F_{ST}$ ) de Wright (1951), definido como a correlação entre os alelos nos gametas que formam um zigoto (Robinson, 1998).  $F_{IS}$  é conhecido como o índice de endogamia dos indivíduos em relação a sua subpopulação (estima o desvio de Hardy-Weinberg nas frequências genotípicas dentro da subpopulação);  $F_{IT}$  - a endogamia na população total (estima o desvio de Hardy-Weinberg em toda população); e  $F_{ST}$  - a endogamia devido à diferenciação entre as subpopulações em relação à população total (divergência das frequências alélicas entre as populações) (Frankham *et al.*, 2008).

Segundo Wright (1978),  $F$  igual a 0,25 é considerado um valor arbitrário acima do qual existe uma diferenciação muito grande; valores na faixa de 0,15 a 0,25 indicam uma diferenciação moderadamente grande. No entanto, segundo o autor uma diferenciação não deve de forma alguma ser considerada desprezível se o  $F$  for igual ou mesmo menor que 0,05. Sendo assim, o valor médio de  $F_{IS} = 0,1347$  obtido em *P. expansa*, indica um endocruzamento moderado dentro das amostras populacionais examinadas dessa espécie (Tabela 9). Apenas o loco *Alb*, mostrou um valor negativo para essa medida, indicando um excesso de indivíduos heterozigotos nas amostras. O valor médio de  $F_{IT}$  igual a 0,1912 indica que o endocruzamento na amostra populacional total foi moderadamente alto. O valor médio de  $F_{ST} = 0,0652$  aponta para uma diferenciação genética moderada entre as amostras populacionais. Os valores de  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  e  $F_{ST}$  em estudos populacionais com aloenzimas de *Pseudemys scripta* foram de 0,183; 0,142 e 0,048, respectivamente (Scribner *et al.*,

1986), e se aproximam dos observados no presente trabalho para *Podocnemis expansa*. Sites *et al.* (1999) usando DNA microssatélites e mitocondrial sugerem que deriva e mutação superam fortemente a ação do fluxo gênico, como forças dominantes no processo de estruturação das populações de *P. expansa* do Araguaia e Tapajós. Pearse *et al.* (2006b), em estudos com esses mesmos marcadores, sugerem também que a deriva gênica surgida por redução populacional em *P. expansa*, é a força primária influenciando o processo de diferenciação entre as populações dessa espécie.

Segundo Wright (1969 *apud* Frankham *et al.*, 2002, p. 328), um único migrante por geração seria o suficiente para evitar uma diferenciação genética completa entre populações idealizadas. Teoricamente, o número de migrantes  $Nm \geq 4$  significa a ocorrência de panmixia entre as populações. Já  $Nm \leq 2$  indica uma divergência genética moderada, no entanto, existe uma variação considerável para esses valores de  $Nm$  entre os organismos, fornecendo um escopo considerável para divergência genética que resulta da deriva genética aleatória (Hartl, 2008).

Sites *et al.* (1999) encontraram um valor de  $Nm = 1,67$  em *P. expansa*, refletindo numa divergência genética moderada entre as amostras estudadas. Valenzuela (2001) estimou um valor de  $Nm \approx 4,60$ , revelando também uma divergência genética moderada entre amostras populacionais dos rios Caquetá (Colômbia), Tapajós e Araguaia. No presente estudo foi estimado um valor de  $Nm = 3,58$  na amostra populacional total (Tabela 9), o que refletiu numa divergência genética moderada como apresentada acima ( $F_{ST} = 0,0652$ ). Na comparação par-a-par, Uatumã vs Trombetas o valor de  $Nm = 71,15$ , indica uma forte panmixia entre essas amostras. Os valores de  $Nm = 3,62$  e  $3,54$  revelados nos pareamentos Tapajós vs Uatumã e Tapajós vs Trombetas, respectivamente, demonstram um limitado fluxo gênico entre Tapajós e as outras duas amostras examinadas ou vice-versa. Tal resultado não é compatível com os dados do loco *Tf* apresentados por Teixeira *et al.* (1996). Essa limitação de fluxo gênico, repercutiu também numa moderada diferenciação genética detectada nos pareamentos Tapajós vs Uatumã e Tapajós vs Trombetas, com valores de  $F_{ST} = 0,061$  e  $0,066$ , respectivamente (Tabela 10). Nesse contexto, surge a seguinte questão: qual seria o  $Nm$  nas populações naturais de *P. expansa*. Os dados aqui apresentados, com base apenas num

limitado número de locos e amostras populacionais examinados, e os poucos dados disponíveis na literatura não são capazes de responder tal pergunta.

No momento, o que se pode claramente perceber é que a maior diferenciação genética revelada na área do Tapajós no presente trabalho, mostra-se congruente com os dados de DNA publicados por Pearse *et al.* (2006b), quando esses autores compararam uma amostra populacional dessa área com a maioria das outras amostras brasileiras examinadas na bacia amazônica.

Os dados protéico-isoenzimáticos ora apresentados foram tentativamente interpretados a luz da hipótese de Refúgios, uma das principais propostas amplamente citadas para explicar as formações de barreiras separando populações naturais e causando o processo de especiação na Amazônia (Haffer, 1969; 1989; 2008). Esse autor defende a expansão e retração da floresta na forma de blocos isolados de floresta úmida das áreas de relevo de superfície na periferia da Amazônia separadas por florestas secas, savanas e outros tipos de vegetação intermediária durante os períodos climáticos secos do Terciário e Quaternário. Além disso, esse autor sustenta a existência de diferenciação de populações isoladas nesses refúgios. Um refúgio segundo Haffer (1989) é uma área comparativamente restrita onde um determinado bioma, como floresta ou savana, permaneceu mais ou menos constante durante períodos de mudanças na vegetação, preservando desta maneira seu mosaico de habitats e servindo como uma região de sobrevivência para ao menos parte das populações de animais e plantas das florestas ou savanas. Ressalta ainda que, refúgio é um termo interpretativo e está relacionado a fenômenos climatológicos, pedológicos, geomorfológicos, palinológicos e outros, sendo considerado de certo modo um termo inapropriado, já que animais e plantas não buscam abrigo de forma deliberada nos refúgios. Segundo essa teoria, as principais populações de plantas e animais isoladas nos refúgios florestais e não-florestais mais ou menos restritos, durante fases climáticas adversas, ou tornam-se extintas, ou sobrevivem sem muita mudança ou, mais frequentemente, diferenciam-se até o nível taxonômico de subespécies ou espécies, antes de entrarem, durante uma fase posterior de expansão, em contato secundário com populações anteriormente co-específicas habitando outros refúgios.

Em relação à localização das amostras populacionais de tartaruga da Amazônia ora estudadas no presente trabalho, é importante ressaltar que a amostra

do Uatumã (região do refúgio do Pitinga); e Tapajós (região do Refúgio do baixo rio Tapajós), se encontram entre as principais regiões de refúgios ecológicos (Haffer, 1969; 1989; 2008). A amostra do Trombetas foi coletada a uma distância de aproximadamente 350 km a leste região do refúgio do Pitinga.

Tomando por base a distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas nas amostras populacionais da tartaruga da Amazônia, e seguindo a linha de raciocínio da hipótese de Refúgios, propõe-se principalmente em relação ao padrão exibido pelo loco *MDH*, a hipótese de que o alelo menos frequente desse loco (*MDH<sup>a</sup>*) na tartaruga da Amazônia, tenha surgido por mutação num período geológico interglacial que foi do Pleistoceno ao Cenozóico mais antigo, onde, populações ancestrais amplamente distribuídas na Amazônia detinham ambos os alelos (*MDH<sup>a</sup>* e *MDH<sup>b</sup>*). Essas populações, possivelmente após terem passado por um período de glaciação, experimentaram os seguintes processos evolutivos: mutação, recombinação, deriva gênica, seleção natural, migração e efeito gargalo na população (Ayala e Kiger, 1980; Frankham *et al.*, 2008), e isolamento dentro de áreas de refúgios, com posterior fixação dos alelos acima mencionados. Essa sequência de eventos pode ter influenciado o padrão do loco *MDH*, os padrões dos demais locos aqui examinados, ou mesmo os de muitos outros locos ainda não estudados.

No entanto, para acomodar os dados aqui gerados, segundo a hipótese de Refúgios proposta por Haffer (1969; 1989; 2008), faz-se necessário examinar um maior número de amostras populacionais localizadas ao longo da distribuição de *P. expansa*, bem como outros locos gênicos, incluindo preferencialmente os locos *MDH* e *PGM* ora estudados.

### **5.8. Distância genética**

As distâncias genéticas são medidas estatísticas da diferenciação genética entre populações, onde, as frequências gênicas e genotípicas obtidas pela técnica de eletroforese protéica para indivíduos tomados ao acaso nas populações naturais, podem também fornecer uma estimativa da diferenciação intra e interespecífica. Essas frequências podem ser transformadas em uma série de índices que permitem estimar o grau de similaridade ou distância genética entre espécies e populações (Solferini e Selivon, 2001).

Entre os métodos de agrupamento mais empregados estão os dendrogramas, análise de componentes principais e análise discriminante. O método de distância é baseado na diferença par-a-par entre as amostras populacionais. O UPGMA (método de agrupamento de pares sem pesos com média aritmética) é o favorito de todos, pois, supõe uma taxa de evolução constante em cada ramo e funciona precariamente quando esta suposição é violada (Hartl, 2008).

A matriz das distâncias genéticas estimadas entre as amostras populacionais de *P. expansa* examinadas, revelaram o menor valor no pareamento Uatumã vs Trombetas (Tabela 11), sugerindo presumidamente que tais amostras estejam fazendo parte de uma grande população panmítica i.e. um mesmo estoque, sendo este fato respaldado pelo elevado número de migrantes estimado por geração, entre elas  $Nm = 71,15$ . Registra-se ainda que os maiores valores de distância foram dectados entre os pareamentos feitos com a amostra do Tapajós, significando um restrito fluxo gênico  $Nm = 3,62$  e  $3,54$ , entre Tapajós vs Uatumã e Tapajós vs Trombetas, respectivamente (Tabela 10), vindo isso repercutir numa maior distância genética e heterogeneidade nessas comparações (Tabela 4 e 11).

É importante ressaltar que animais marcados do rio Trombetas já têm sido registrados nas proximidades da cidade de Itacoatiara (Alfinito *et al.*, 1976). Esse fato poderia explicar um possível fluxo de animais do rio Trombetas no sentido rio Uatumã. Considerando que esses rios são afluentes da mesma margem do rio Amazonas, tal fluxo estaria sendo facilitado, resultando numa maior homogeneidade entre essas áreas amostradas (Tabela 4, 10 e 11). O dendrograma gerado dos dados da Tabela 11, aparece representando graficamente a relação de ancestralidade e a estruturação genética das amostras populacionais de *P. expansa* examinadas.



## 6. Conclusões

Pelos dados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1º As proteínas plasmáticas demonstram um alto grau de polimorfismo em *P. expansa*, e a sua aplicação em estudos genético-populacionais dessa espécie é extremamente vantajoso, devido às facilidades de se manter os animais vivos por longo tempo.

2º Existe uma estruturação genética moderada entre as amostras analisadas, com a formação do clado (Uatumã e Trombetas) e outro com Tapajós. Isto é, os dados ora apresentados apontam para uma possível existência de subpopulações distintas da tartaruga da Amazônia na área amostrada, onde, neste caso, a hipótese ( $H_0$ ) apresentada nos objetivos da existência de um único estoque da espécie na região deve ser rejeitada.

3º A amostra do Tapajós demonstra um maior grau de variabilidade genética quando comparada com as outras amostras populacionais do Uatumã e Trombetas.

4º Não houve diferença significativa entre as frequências alélicas do loco de transferrina (*Tf*) ao longo do tempo, quando se comparou os dados do presente estudo aos anteriormente descritos por Teixeira *et al.* (1996).

5º Mesmo com o advento dos marcadores moleculares de DNA, os marcadores protéico-isoenzimáticos pela relativa simplicidade, rapidez e baixo custo das análises em relação a muitos outros marcadores, continuam sendo aplicáveis em estudos de estrutura genética populacional.

## 7. Perspectivas futuras

Diante dos resultados obtidos é particularmente interessante que se continue pesquisando alguns aspectos dentro das populações de *Podocnemis expansa*, a exemplo dos abaixo relacionados:

1º Ampliar as pesquisas com proteínas plasmáticas a fim de detectar um maior número de locos polimórficos que possam servir de marcadores genético-populacionais.

2º Buscar a caracterização genética de um maior número de populações ao longo da bacia amazônica, com marcadores protéico-isoenzimáticos do plasma sanguíneo.

3º Buscar formas de garantir a conservação e o manejo da população do rio Tapajós, e que seja feito sempre uma avaliação genética antes de qualquer transplante de animais entre bacias.

4º Dar continuidade ao exame da variação temporal de marcadores genéticos nas populações da tartaruga da Amazônia já avaliadas, buscando identificar possíveis associações com fatores antropogênicos e ambientais.

5º Examinar a possibilidade de se aplicar marcadores protéico-isoenzimáticos de *P. expansa* como indicadores de poluição ambiental, nas áreas da Amazônia, onde, já existam fortes indícios de poluição por metais pesados.

## 8. Referências Bibliográficas

- Agostinho, A.A.; Thomaz, S.M.; Gomes, L.C. 2005. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, 1(1): 70-78.
- Albagli, S. 2001. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. *Parceiras estratégicas*, 12: 5-19.
- Alfenas, A.C.; Peters, I.; Brune, W.; Passador, G.C. 1991. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa, MG. UFV. 242pp.
- Alfinito, J. 1975. A preservação da tartaruga amazônica. *Brasil Florestal*, 6(21): 20-23.
- Alfinito, J.; Vianna, C.M.; Silva, M.M.F.; Rodrigues, H. 1976. Transferência de tartarugas do rio Trombetas para o rio Tapajós. *Brasil Florestal*, 7(26): 49-53.
- Alho, C.J.R. 1985. Conservation and management strategies for commonly exploited Amazonian turtles. *Biological Conservation*, 32: 291-298.
- Alho, C.J.R.; Danni, T.M.S.; Pádua, L.F.M. 1985. Temperature-determination in *Podocnemis expansa* (Testudinata: Pelomedusidae). *Biotropica*, 17(1): 75-78.
- Alho, C.J.R.; Pádua, L.F.M. 1982. Reproductive parameters and nesting behavior of the Amazon turtle *Podocnemis expansa* (Testudinata, Pelomedusidae) in Brazil. *Canadian Journal of Zoology*, 60: 97-103.
- Allendorf, F.W.; Luikart, G. 2007. *Conservation and the genetics of populations*. Blackwell Publishing. Malden, MA; Oxford. 642pp.
- Allendorf, F.W.; Mitchell, N.; Ryman, N.; Ståhl, G. 1977. Isozyme loci in brown trout (*Salmo trutta* L.): detection and interpretation from population data. *Hereditas*, 86: 179-190.
- Alves, R.R.N.; Santana, G.G. 2008. Use and commercialization of *Podocnemis expansa* (Schweigger 1812) (Testudines: Podocnemididae) for medicinal purposes in two communities in North of Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 4(3): 1-6.
- Anderson, N.L.; Anderson, N.G. 2002. The human plasma proteome history, character and diagnostic prospects. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1: 845-867.
- Andersson, L.; Ryman, N.; Rosenberg, R.; Stahl, G. 1981. Genetic variability in Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*): description of protein loci and population data. *Hereditas*, 95: 69-78.
- Aquadro, C.F.; Avise, J.C. 1982. An assessment of "hidden" heterogeneity within electromorphs at three enzyme loci in deer mice. *Genetics*, 102: 269-284.

- Artamonova, V.S. 2007. Genetic markers in population studies of Atlantic Salmon *Salmo salar* L.: Karyotype characters and allozymes. *Russian Journal of Genetics*, 43(3): 221-233.
- Ashton, G.C. 1964. Serum Albumin Polymorphism in Cattle. *Genetics*, 50: 1421-1426.
- Ayala F.J.; Kiger, Jr.J.A. 1980. *Modern Genetics*. The Benjamins/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park. Califórnia. 844p.
- Ayres, M.; Sampaio, M.M.; Barros, R.M.S.; Dias, L.B.; Cunha, O.R. 1969. A karyological study of turtles from the Brazilian Amazon region. *Cytogenetics*, 8: 401-409.
- Barbosa A.C.; Souza, J.; Dórea, J.G.; Jardim, W.F.; Fadini, P.S. 2003. Mercury biomagnification in a tropical black water, Rio Negro, Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45: 235-46.
- Barthem, R.B. 2001. Componente biota aquática. In: Capobianco, J.P.R.; Veríssimo, A.; Moreira, A.; Sawyer, D.; Santos, I.; Pinto, L.P. (Eds). *Biodiversidade na Amazônia Brasileira: avaliação e ações prioritárias para a conservação, uso sustentável e repartição de benefícios*. São Paulo. Estação Liberdade: Instituto Socioambiental. p.60-78.
- Bates, H.W. 1863. *The Naturalist on the River Amazons*. London: J. Murray. 423pp.
- Batista, R.P.; Solé-Cava, A.M. 2005. Baixa diferenciação genética entre populações de peixe-batata (*Lopholatilus villarii* Miranda-Ribeiro, 1915) ao norte e sul do Banco dos Abrolhos, Brasil. In: Costa, P.A.S.; Martins, A.S.; Olavo, G. (Eds.) *Pesca e potenciais de exploração de recursos vivos na região central da Zona Exclusiva brasileira*. Rio de Janeiro: Museu Nacional. p. 241-247.
- Beiguelman, B. 2008. *Genética de populações humanas*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 239pp.
- Bell, K.; Cooper, D.; Arthur, H.; Poole, W.E. 1998. Plasma Esterase (ES) Polymorphism in the Tammar Wallaby, *Macropus eugenii*. *Biochemical Genetics*, 36(3): 137-146.
- Bhasin, M.K.; Walter, H. 2007. Genetic markers in human blood. *Anthropologist special volume*, (3): 297-348.
- Bickham, J.W.; Iverson, J.B.; Parham, J.F.; Philippen, H.D.; Rhodin, A.G.J.; Shaffer, H.B.; Spinks, P.Q.; Dijk, P.P. 2007. Na annotated list of modern turtle terminal taxa with comments on areas of taxonomic instability and recent change Turtle taxonomy working group. *Chelonian Research Monographs*, 4: 173-199.

- Bidone, E.D.; Castilhos, Z.C.; Cid de Souza, T.M.; Lacerda, L.D. 1997. Fish Contamination and Human Exposure to Mercury in the Tapajós River Basin, Pará State, Amazon, Brazil: A Screening Approach Bull. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59: 194-201.
- Bock, B.C.; Páez, V.P.; White, M.M. 2001. Genetic population structure of two threatened South American river turtle species, *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis*. *Chelonian Conservation and Biology*, 4(1): 47–52.
- Boettcher, E.W.; Kistler, P.; Nitschmann, H.S. 1958. Method of isolating the  $\beta$ 1 metal-combining globulin from human blood plasma. *Nature*, 181: 490-491.
- Brodacki, A.; Tarkowski, J.; Flis, J. 2003. Genetic distances in hens estimated with protein genes frequencies and procedures of DNA analysis, *ejpau* 6(2), #08. Available Online: <<http://www.ejpau.media.pl/volume6/issue2/animal/art-08.html>>.
- Buth, D.G.; Mayden, R.L. 2001. Allozyme and isozymic for polytypy in the North American catostomid genus *Cypleptus*. *Copeia*, 4: 899-906.
- Calcagnotto, D.; Toledo-Filho, S.A. 2000. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Genetic and Molecular Biology*, 23: 127-130.
- Case, S.M. 1978. Electrophoretic variation in two species of ranid frogs, *Rana boylei* and *R. muscosa*. *Copeia*, 2: 311-320.
- Chakraborty, R.; Fuerst, P.A.; Nei, M. 1980. Statistical studies on protein polymorphism in natural populations. III. Distribution of allele frequencies and the number of alleles per locus. *Genetics*, 94: 1039-1063.
- Cheng, Y.-P.; Chien, C.-T.; Chen, H.-W.; Lin, T.-P. 2001. Allozyme variation of *Cyclobalanopsis championii* (Fagaceae), a narrowly distributed species in Southern Taiwan. *The Journal of Heredity*, 92(1): 65-70.
- Chevolot, M.; Ellis, J.R.; Rijnsdorp, A.D.; Stam, W.T.; Olsen, J.L. 2008. Temporal changes in allele frequencies but stable genetic diversity over the past 40 years in the Irish Sea population of thornback ray, *Raja clavata*. *Heredity*, 101: 120-126.
- Cisneros-Heredia, D.F. 2006. Turtles of the Tiputini Biodiversity Station with remarks on the diversity and distribution of the Testudines from Ecuador. *Biota Neotropica*, 6(1): 11-23.
- Corbin, K.W.; Sibley, C.G.; Ferguson, A.; Wilson, A.C.; Brush, A.H.; Ahlquist, J.E. 1974. Genetic polymorphism in New Guinea starlings of the genus *Aplonis*. *The Condor*, 76: 307-318.

- Correia, F.W.S.; Manzi, A.O.; Cândido, R.M.N.; Pauliquevis, T. 2007. Balanço de umidade na Amazônia e sua sensibilidade às mudanças na cobertura vegetal. *Ciência e Cultura*, 59(3): 39-43.
- Daniels, S.R. 2003. Examining the genetic structure among populations of the common cape river crab *Potamonautes perlatus* from river systems in South Africa reveals hydrographic boundaries. *Journal of Crustacean Biology*, 23(4): 936–950.
- De Mattos, P.S.R.; Del Lama, M.A.; Toppa, R.H.; Arno Rudi Schwantes, A.R. 2004. Populational genetic structure of free-living maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) determined by proteic markers. *Brazilian Journal of Biology*, 64(3B): 639-644.
- Diakov, Y.P. 1998. Population structure of the Pacific black halibut *Reinhardtius matsuurae* Jordan et Snyder. *Journal of Sea Research*, 40: 109–116.
- Dias, L.A.S. 1998. Variância de frequências alélicas. / In: Alfenas, A.C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa. UFV. p. 381-404.
- Díaz, S.; Dulout, F.N.; Peral-García, P. 2002. Greater genetic variability in Argentine Creole than in Thoroughbred horses based on serum protein polymorphisms. *Genetics and Molecular Research*, 1(3): 261-265.
- Dimitrijević, V.; Jovanović, S.; Savić, M.; Trailović, R. 2007. Efficiency of blood protein systems as genetic markers for parentage verification in yugoslav shepherd dog. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 57(1): 81-86.
- Durand, P.; Michalakis, Y.; Cestier, S.; Oury, B.; Leclerc, M.C.; Tibayrenc, M.; Renaud F. 2003. Significant linkage disequilibrium and high genetic diversity in a population of *Plasmodium falciparum* from an area (Republic of the Congo) highly endemic for malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(3): 345–349.
- Erdoğan, M.; Özbeyaz, C. 2004. Investigation of Blood Protein Polymorphism and Estimation of Genetic Distances in Some Dog Breeds in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28: 583-590.
- Faial, K.R.F.; Santos, E.C.O.; Brabo, E.S.; Sá Filho, G.C.; Lima, M.O.; Mendes, R.A.; Mascarenhas, A.F.S. 2005. Níveis de mercúrio em peixes do Rio Trombetas no baixo Amazonas: uma área sem influência de garimpagem. *Cadernos de Saúde Pública*, 13(1): 239-448.
- Ferguson, A. 1980. *Biochemical systematics and evolution*. Glasgow and London: Blackie. 194pp.
- Ferguson, A.; Taggart, J.B.; Prodhöhl, P.A.; Mcmeel, O.; Thompson, C.; Stone, C.; McGinnity, P.; Hynes, R.A. 1995. The application of molecular markers to the

study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology*, (Supplement A), 47: 103-126.

Ferrarini, S.A. 1980. *Quelônios Animais em Extinção*. Manaus, Falangola. 68pp.

Ferreira Júnior, P.D. 2003. *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*. Tese Doutorado em Geologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Minas. 296pp.

Ferreira Júnior, P.D.; Castro, P.T.A. 2003. Geological Control of *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* Nesting Areas in Rio Javaés, Bananal Island, Brazil. *Acta Amazonica*, 33(3): 445–468.

Fisher, R. A. 1935. *Statistical Methods for Research Workers*. 5<sup>th</sup> edition. Edinburgh: Oliver Boyd. 14<sup>a</sup> ed. Em 1973: New York: Hafner.

Flint, N.S.; Van der Bank, F.H.; Grobler, J.P. 2000. A lack of genetic variation in commercially bred Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the North-West Province of South Africa. *Water S.A.*, 26(1): 105-110.

Fonseca, C.R.; Becker, C.G.; Haddad, C.F.B.; Prado, P.I. 2008. O declínio mundial dos anfíbios é agravado pela desconexão entre o hábitat aquático dos girinos e o hábitat terrestre dos adultos, induzida pelas atividades humanas. *Scientific American Brasil*, 76: 88-93.

Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press. United Kingdom, 517pp.

Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. 2008. *Fundamentos da genética da conservação*. Editora. Sociedade brasileira de genética. Ribeirão Preto, 259pp.

Futuyma, D.J. 1997. *Biologia evolutiva*. 3<sup>a</sup> Ed. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 575pp.

Gahne, G. 1965. Studies on the inheritance of electrophoretic forms of transferrins, albumins, prealbumins and plasma esterases of horses. *Genetics*, 53: 681-694.

Gallardo, M.H.; González, C.; Mena, C.; Lomovasky, B.; Morriconi, E.; Clasing, E. 2003. Allozymic variation in the clam genus *Eurhomalea* (Bivalvia: Veneriidae) along southern South American coast. *Revista Chilena de Historia Natural*, 76: 501-507.

Gillespie, J.H. 1998. *Population Genetics*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 169pp.

Gilmore, R.M. 1986. Fauna e etnozologia da América do Sul tropical. In: Ribeiro, B.G. (Ed). *Suma Etnológica Brasileira*, Petrópolis, Vozes. p.189-233.

- González, F.H.D.; Scheffer, J.F.S. 2002. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. *In: Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluídos corporais*. 29º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Gramado, Brasil.
- Goulding, M. 1980. *The fishes and the forest: explorations in Amazonian natural history*. University of California Press, Berkeley, CA, USA. 280pp.
- Gusmão, J.; Lazoski, C.; Monteiro, F.A.; Sole-Cava, A.M. 2006. Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus riveti*. *Marine Biology*, 149: 491-502.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165: 131-137.
- Haffer, J. 1989. Aspectos gerais da teoria de refúgios. *Espaço, Ambiente e Planejamento*, 2(9): 1-36.
- Haffer, J. 2008. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. *Brazilian Journal of Biology*, 68(4, Suppl.): 917-947.
- Haley, L.E. 1965. Serum Albumin polymorphism in quail and chicken-quail Hybrids. *Genetics*, 51: 983-986.
- Hartl, D.L. 2008. *Princípios de genética de população*. Editora, FUNPEC, Ribeirão Preto. 217pp.
- Henkes, L.E.; Papadopolis, L.G.; Steigleder, C.S.; Moraes, J.C.F.; Weimer, T.A. 2000. Genetic characterization of a brangus-ibage cattle population – biochemical polymorphisms and reproductive efficiency. *Ciência Rural*, 30(5): 803-807.
- Hernández, O.; Espín, R. 2003. Consumo Ilegal de Tortugas por Comunidades Locales en el Río Orinoco Medio, Venezuela. *Acta Biologica de Venezuela*, 23(2):17-26.
- Huang, C.C.; Clark, H.F. 1969. Chromosome studies of the cultured cells of two species of side-necked turtles (*Podocmenis unifilis* and *P. expansa*). *Chromosoma*, 26: 245-253.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis 1989. *Projetos Quilômetros da Amazônia 10 Anos*. IBAMA, Brasília. 119pp.
- Iverson, J.B. 1992: *A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world*. Indiana. Earlham College, Richmond. 363pp.
- Jacquemyn, H.; Honnay, O.; Looy, K.V.; Breyne, P. 2006. Spatiotemporal structure of genetic variation of a spreading plant metapopulation on dynamic riverbanks along the Meuse River. *Heredity*, 96: 471-478.



- Jamieson, A.; Birley, A.J. 1989. The distribution of transferrin alleles in haddock stocks. *Journal du Conseil International pour L'Exploration de la Mer*, 45: 248-262.
- Jamieson, A.; Turner, R.J. 1978. The extended series of Tf alleles in Atlantic cod, *Gadus morhua*. In: Battaglia B.; Beardmore J.A. (Eds). *Marine Organisms*. New York: Plenum Publishing Corporation. p.699-729.
- Jiskrová, I.; Glasnák, V.; Misař, D. 2002. The use of blood protein polymorphism for determining the genetic distance between the Moravian warm-blooded horse and the Czech warm-blooded and Trakehner horses. *Czech Journal of Animal Science*, 47(3): 98–105.
- Kakhniashvili, D.G; Bulla Jr, L.A.; Goodman, S.R. 2004. The human erythrocyte Proteome analysis by ion trap mass spectrometry. *Molecular e Cellular Proteomics*, 3: 501-509.
- Kambhampati, S.; Black, W.C.VI.; Rai, K.S.; Sprenger, D. 1990. Temporal variation in genetic structure of a colonising species: *Aedes albopictus* in United States. *Heredity*, 64: 281-287.
- Kilpatrick, C.W.; Crowell, K.L. 1985. Genic variation of the rock vole, *Microtus chrotorrhinus*. *Journal of Mammalogy*, 66(1): 94-101.
- Kuz'min, E.V.;Kuz'mina, O.Y. 2005. Population analysis of electrophoretic variation in blood serum Albumins of European (*Acipenser ruthensis* L.) and Siberian (*A. ruthensis marsiglii* Brandt) sterlet. *Russian Journal of Genetics*, 41(2): 246-253.
- Kuznetsov, S.B; Baranyuk, V.V.; Takekawa, J.Y. 1998. Genetic Differentiation Between Wintering Populations of Lesser Snow Geese Nesting on Wrangel Island. *The Auk*, 115(4): 1053-1057.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. 2006. *Principles of Biochemistry*. 4<sup>a</sup> Ed. Editora Worth. New York - USA. 1202 pp.
- Lowe-MacConnell, R.H. 1999. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. Editora da universidade de São Paulo, São Paulo. 536pp.
- Lucentini, L.; Palomba, A.; Gigliarelli, L.; Sgaravizzi, G.; Lancioni, H.; Lanfaloni, L.; Natali, M.; Panara, F. 2009. Temporal changes and effective population size of an Italian isolated and supportive-breeding managed northern pike (*Esox lucius*) population. *Fisheries Research*, 96: 139-147.
- Magalhães, C.; Santos, J. L.C.; Salem, J.I. 2001. Automação de coleções biológicas e informações sobre a biodiversidade da Amazônia. *Parcerias Estratégicas*, 12: 294-312.

- Manwell, C.; Baker, C.M. 1970. *Molecular Biology and the origin of species*. Editora. Sidgwick & Jackson London, 394pp.
- Meggs, L.B.; Austin, C.M. 2003. Low allozyme variation in snapper, *Pagrus auratus*, in Victoria, Australia. *Fisheries Management and Ecology*, 10: 155-162.
- Melo júnior, A.F.; Carvalho, D.; Póvoa, J.S.R.; Bearzoti, E. 2004. Estrutura genética de populações naturais de pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Scientia Forestais*, 66: 56-65.
- Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. 2002. *Biodiversidade brasileira, avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros*. Brasília: MMA/SBF. 404pp.
- Mittermeier, R.A. 1978. South America's river turtles: saving them by use. *Oryx*, 14(3): 222-230.
- Mittermeier, R.A.; Medem, F.; Rhodin, A.G.J. 1980. Vernacular Names of South American Turtles. Society for study of amphibians and reptiles. *Herpetological Circular*, 9: 12.
- Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Brooks, T.M.; Pilgrim, J.D.; Konstant, W.R.; Fonseca, G.A.B; Kormos, C. 2003. "Wilderness and Biodiversity Conservation". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18): 10309-10313.
- Monostory, Z.; Nagy, A.; Gervai, J.; Csányi, V. 1984. Polymorphism and inheritance of serum esterases and  $\beta$ -globins in the paradise fish (*Macropodus opercularis*; Anabantidae). *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, 15: 1-11.
- Morgan II, R.P.; Koo, T; S.Y., Krantz, G.E. 1972. Albumin polymorphism in the White Perch, *Morone Americana*. *Chesapeake Science*, 13(1): 66-68.
- Narbaiza, Í.; Hernández, O.; Barrio, C. 1999. Situación de la tortuga arrau (*Podocnemis expansa*) en la Reserva de Biosfera del Alto Orinoco Casiquiare. 1er. Taller sobre la conservación de la especie tortuga arrau (*Podocnemis expansa*) en Venezuela. Jardín Botánico de Caracas, Venezuela, Caracas.
- NC-IUBMB. 2009. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>>. Acesso em: 20 maio 2009.

- Nedelkov, D.; Kiernan, U.A.; Niederkofler, E.E.; Tubbs, K.A.; Nelson, R.W. 2005. Investigating diversity in human plasma proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(31): 10852-10857.
- Nei, M. 1973 Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1975. Molecular population genetics and evolution. North-Holland, Amsterdam and New York. 288pp.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nevo, E.; Ben-Shlomo, R.; Lavie, B. 1984. Mercury selection of allozymes in marine organisms: Prediction and verification in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81: 1258-1259.
- Nie, L.; Yu, Y.; Zhang, X.; Yang, G.; Wen, J.; Zhang, Y. 1999. Genetic diversity of cattle in south China as revealed by blood protein electrophoresis. *Biochemical Genetics*, 37(7/8): 257- 265.
- Nikiforov, S.M.; Zvyagintsev, A.Y. 2008. Allozyme diversity among local populations of the pacific Mussel *Mytilus trossulus* (Bivalvia: Mytilidae) from polluted areas of Peter the Great bay (Sea of Japan). *Russian Journal of Marine Biology*, 34(1): 45-50.
- Nunes, R.L.; Oliveira, D.A.A.; Coelho, E.G.A. 2005. Polymorphism of serum proteins in Campolina horses. *Animal Reproduction*, 2(1): 60-62.
- Overall, W.L. 2001. O peso dos invertebrados na balança de conservação biológica da Amazônia. In: Capobianco, J.P.R.; Veríssimo, A.; Moreira, A.; Sawyer, D.; Santos, I.; Pinto, L.P. *Biodiversidade na Amazônia Brasileira: avaliação e ações prioritárias para a conservação, uso sustentável e repartição de benefícios*. São Paulo. Estação Liberdade: Instituto Socioambiental. p. 50-59.
- Panepucci L.; Vicente, V.; Trovo, J.B.F. 1993. Polymorphism of proteins in the blood of horses: study of a local population (Lavradeiro) of Roraima, Brazil. *Brazilian Journal of Genetics*, 16(1): 155-160.
- Pantoja-Lima, J. 2007. *Aspectos da Biologia Reprodutiva de Podocnemis expansa Schweigger, 1812, Podocnemis sextuberculata Cornalia, 1849 e Podocnemis unifilis Troschel, 1848 (Testudines, Podocnemididae) na Reserva Biológica do Abufari, Amazonas, Brasil*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. 73pp.
- Paulauskas, A; Starodubaité, M. 2003. Isoenzyme analysis of European mole (*Talpa europaea* Linnaeus) from Lithuania. *Acta Zoologica Lituanica*, 13(3): 299-305.

- Pearse, D.E.; Dastrup, R.B.; Hernandez, O.; Sites Jr, J.W. 2006a. Paternity in an Orinoco Population of Endangered Arrau River Turtles, *Podocnemis expansa* (Pleurodira; Podocnemididae), from Venezuela. *Chelonian Conservation and Biology*, 5: 232–238.
- Pearse, D.; Arndt, A.D.; Valenzuela, N.; Miller, B.A.; Cantarelli, V.; Sites Jr, J.W. 2006b. Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Molecular Ecology*, 15: 985–1006.
- Peters, T.Jr. 1996. *All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Academic Press Ltda., London. 432pp.
- Pinheiro, M.C.N.; Oikawa, T.; Vieira, J.L.F.; Gomes, M.S.V.; Guimarães, G.A.; Crespo-López, M.E.; Müller, R.C.S.; Amoras, W.W.; Ribeiro, D.R.G.; Rodrigues, A.R.; Côrtes, M.I.T.; Silveira, L.C.L. 2006. Comparative study of human exposure to mercury in riverside communities in the Amazon region Brazilian. *Journal of Medical and Biological Research*, 39: 411-414.
- Poolprasert, P.; Manguin, S.; Bangs, M. J.; Sukhontabhirom, S.; Poolsomboon, S.; Akaratanakul, P.; Chareonviriyaphap, T. 2008. Genetic structure and gene flow of *Anopheles minimus* and *Anopheles harrisoni* in Kanchanaburi Province, Thailand. *Journal of Vector Ecology*, 33(1): 158-165.
- Preacher, K.J. 2001. Calculation for the chi-square test: An interactive calculation tool for chi-square tests of goodness of fit and independence [Computer software]. Disponível em <<http://www.quantpsy.org/>> Para avaliação. Acessado em 20 de maio 2009.
- Pritchard, P.C.H.; Trebbau, P. 1984. *Turtles of Venezuela*. Society for the study Amphibians and Reptiles. Contributions to Herpetology. 403pp.
- Ramon, M.M.; Castro, J. A. 1997. Genetic variation in natural stocks of *Sardina pilchardus* (sardines) from the western Mediterranean Sea. *Heredity*, 78: 520-528.
- Raymond, M.; Rousset, F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49: 1280–1283.
- Rebêlo, G.H.; Pezzuti, J.C.B. 2000. Percepções sobre o consumo de quelônios na Amazônia: considerações para o manejo atual. *Ambiente e Sociedade, Ano III* (6/7): 85-104.
- Redford, K.H.; Robinson, J.G. 1991. Subsistence and commercial uses of wildlife. In: Robinson, J.G.; Redford, K.H. (Eds). *Neotropical wildlife use and conservation*. Chicago, University of Chicago Press, p.7-23.

- Ridgway, G.J.; Sherburne, S.W.; Lewis, R.D. 1970. Polymorphism in the esterases of Atlantic herring. *Transactions of the American Fisheries Society*, 99: 147-151.
- Robinson, I.P. 1998. Aloenzimas na genética de populações de plantas. *In: Alfenas, A.C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa. UFV. p. 329-380.
- Rodrigues, M.J.J.; Moura, L.S.S. 2007. Análise Bromatológica da Carne de Tartaruga-da-Amazônia, *Podocnemis expansa* (Schweigger,1812) em Habitat Natural: Subsídios para Otimizar a Criação Racional. *Amazônia: Ciência e Desenvolvimento*, 2(4): 1-16.
- Rogers, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *In: Studies in Genetics VII*, University of Texas, Austin, TX, USA. Publication 7213: p.145-154.
- Sampaio da Silva, D.; Lucotte, M.; Roulet, M.; Poirier, H.; Mergler D.; Crossa, M. 2006. Mercúrio nos peixes do rio Tapajós, Amazônia brasileira. *Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente*, 1(1): 1-31.
- Santos, J.M.M.; Maia, J.F.; Tadei, W.P.; Rodriguez, G.A.D. 2003. Isoenzymatic variability among five *Anopheles* species belonging to the *Nyssorhynchus* and *Anopheles* Subgenera of the Amazon Region, Brazil. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(2): 247-253.
- Sarich, V.M. 1977. Rates, sample sizes, and the neutrality hypothesis for electrophoresis in evolutionary studies. *Nature*, 265: 24-28.
- Scarpassa, V.M.; Hamada, N. 2003. Isozyme variation in four species of the *Simulium perflavum* species group (Díptera: Simuliidae) from the Brazilian Amazon. *Genetic and Molecular Biology*, 26(1): 39-46.
- Scarpassa, V.M.; Tadei, W.P. 2000. Enzymatic analysis in *Anopheles nuneztovari* Gabaldón (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 60(4): 539-550.
- Scarpassa, V.M.; Tadei, W.P.; Suarez, M. F. 1999. Population structure and genetic divergence in *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Colombia. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(6): 1010–1018.
- Schneider, L. 2007. *Relação entre a bioacumulação de mercúrio em Podocnemis erythrocephala (Podocnemididae, Testudines) e fatores ambientais da Bacia Hidrográfica do Rio Negro*. Dissertação. (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. 51pp.
- Schneider, L.; Belger, L.; Burger, J.; Vogt, R.C. 2009. Mercury bioaccumulation in four tissues of *Podocnemis erythrocephala* (Podocnemididae: Testudines) as a function of water parameters. *Science of the Total Environment*, 407: 1048–1054.

- Scribner, K.T.; Evans, E.J.; Morreale, S.J.; Smith, M.H.; Gibbons, J.W. 1986. Genetic divergence among Populations of the Yellow-bellied Slider turtle (*Pseudemys scripta*) separated by Aquatic and terrestrial Habitats. *Copeia*, 3: 691-700.
- Shaw, C.R.; Prasad, R. 1970. Strarch gel electrophoresis of enzymes – A compilation of recipes. *Biochemical Genetics*, 4: 297-320.
- Shikano, T.; Chiyokubo, T.; Taniguchi, N. 2001. Temporal changes in allele frequency, genetic variation and inbreeding depression in small populations of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Heredity*, 86: 153-160.
- Shimizu, J.Y.; Jaeger, P.; Sopchaki, S.A. 2000. Variabilidade genética em uma população remanescente de araucária do parque nacional do Iguaçu, Brasil. *Boletim de Pesquisa Florestal*, 41: 18–36.
- Shotake, T; Nozawa K.; Tanabe, Y. 1977. Blood protein variations in baboons I. Gene exchange and gentic distance between *Papio anubis*, *Papio hamadryas* and their hybrid. *Japanese Journal of Genetics*, 52(3): 223-237.
- Siddiquee, S.; Abdullah, F.; Guan, T.S.; See, L.M. 2007. Allozyme variations of *Trichoderma harzianum* and its taxonomic implications. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(1): 30-37.
- Silva, A.L.; Begossi, A. 2007. Biodiversity, food consumption and ecological niche dimension: a study case of the riverine populations from the Rio Negro, Amazonia, Brazil. *Environment, Development and Sustainability*, p. 1-19. (<http://www.springerlink.com>) DOI10.1007/s10668-007-9126-z.
- Silva, J.M.C.; Rylands, A.B.; Fonseca, G.A.B. 2005. O destino das áreas de endemismo da Amazônia. *Megadiversidade*, 1(1): 124-131.
- Silva, M.N.F.; Rylands, A.B.; Patton, J.L. 2001. Biogeografia e conservação da mastofauna na Amazônia brasileira. In: Capobianco, J.P.R.; Veríssimo, A.; Moreira, A.; Sawyer, D.; Santos, I.; Pinto, L.P. (Eds). *Biodiversidade na Amazônia Brasileira: avaliação e ações prioritárias para a conservação, uso sustentável e repartição de benefícios*. São Paulo. Estação Liberdade: Instituto Socioambiental. p.110-131.
- Simon, J.C.; Hebert, P.N. 1995. Patterns of genetic variation among Canadian populations of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* L. (Homoptera: Aphididae). *Heredity*, 74: 46-35.
- Sites Jr, J.W.; Fritzsimmmons, N.N.; Silva Júnior, N.J.; Cantarelli, V.H. 1999. Conservation genetics of giant Amazon river turtle (*Podocnemis expansa*: Pelomedusidae) – Inferences from two classes of molecular markers. *Chelonian Conservation and Biology*, 3(3): 454-463.
- Slavénaité, S; Sruoga, A. 2002. Aplicação de esterases as genetic markers for the differentiation of geese. *Veterinarija ir Zootechnika*, 19(41): 99-101.

- Smith, N.J.H. 1974. Destructive exploitation of the South American river turtle. *Yearbook of the Association of Pacific Coast Geographers*, 36: 85-102.
- Smith, N.J.H. 1979. Aquatic turtles of Amazonia: an endangered resource. *Biological Conservation*, 16: 165-176.
- Smith, P.J. 1979. Esterase gene frequencies and temperature relationships in the New Zealand Snapper *Chrysophrys auratus*. *Marine biology*, 53: 305-310.
- Smith, P.J.; Francis, R.I.C.C.; Jamieson, A. 1981. An excess of homozygotes at a serum esterase locus in the Atlantic mackerel *Scomber scombrus*. *Animal Blood Groups Biochemical Genetics*, 12: 171-180.
- Solferini, V.N.; Selivon, D. 2001. Polimorfismos de isozimas. *In: Matioli, S.R. (Ed). Biologia molecular e Evolução*. p.137-142.
- Steenkamp, M.K.J.; Engelbrecht, G.D.; Mulder, P.F.S. 2001. Allozyme variation in a Johnston's topminnow, *Aplocheilichthys johnstoni*, population from the Zambezi River system. *Water SA*, 27: 53–55.
- Šveistienė, R.; Jatkauskienė, V. 2006. Genetic structure and variation of large-type Žemaitukai horse population. *Biologija*, 4: 10-14.
- Swofford, D.L.; Selander, R.B.; Black, W.C. 1997. *BIOSYS-2: A computer program for the analysis of allelic variation in populations genetics and biochemical systematics*. Illinois Natural History Survey, IL, USA.
- Tao, J.; Qin, Z.-Q.; Tao, Y.; Wen, L.; Shu, X.-S.; Wang, Z.-C.; Liu, X.-W. Li, W.-J.; Hu, W.-X. 2007. Genetic relationships among Chinese pigs and other pig populations from Hunan Province, China. *Animal Genetics*, 38: 417–420.
- Teixeira A.S.; Jamieson A.; Raposo J.C.P. 2002. Transferrin polymorphism in Central Amazon populations of pescada, *Plagioscion squamosissimus*. *Genetics and Molecular Research*, 1(3): 216-226.
- Teixeira, A.S.; Chaves, L.S.; Yuyama, K. 2004. Esterases no exame da estrutura populacional de Camucamu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae). *Acta Amazonica*, 34(1): 89-96.
- Teixeira, A.S.; Jamieson, A. 1985. Genetic variation in plasma transferrins of tambaqui, *Colossoma macropomun* (Cuvier 1818). *Amazoniana*, 9: 159-168.
- Teixeira, A.S.; Jamieson, A.; Raposo, J.C.P.; Vieira, A.A. 1996: Transferrin polymorphism in Amazon Turtle (*Podocnemis expansa*) stocks. *Brazilian Journal of Genetics*, 19(4): 559-564.
- Teixeira, A.S.; Nakayama, C.M.; Porto, J.I.R.; Feldberg, E. 2006. Esterase-D and chromosome patterns in Central Amazon piranha (*Serrasalmus rhombeus*

- Linnaeus, 1766) from Lake Catalão. *Genetics and Molecular Biology*, 29(3): 498-502.
- Teixeira, A.S.; Oliveira, S.S. 2005. Evidence for a natural hybrid of peacock bass (*Cichla monoculus* vs *Cichla temensis*) based on esterase electrophoretic patterns. *Genetics and Molecular Research*, 4(1): 74-83.
- Teixeira, A.S.; Raposo, J.C.P.; Jamieson, A. 1990. Transferrin variation in jaraquis, *Semaprochilodus taeniurus* and *S. insignis*, in the Amazon region. *Animal Genetics*, 21: 419-422.
- Valenzuela, N. 2000. Multiple paternity in side-neck turtles *Podocnemis expansa*: evidence from microsatellite DNA data. *Molecular Ecology*, 9: 99-105.
- Valenzuela, N. 2001. Genetic differentiation among nesting beaches in the highly migratory giant river turtle (*Podocnemis expansa*) from Colombia. *Herpetologica*, 57: 48-57
- Valenzuela, N.; Botero, R.; Martinez, E. 1997. Field study of sex determination in *Podocnemis expansa* from Colombian Amazonia. *Herpetologica*, 5(3): 390-398.
- Vanzolini, P.E. 1992. Paleoclimas e especiação em animais da América do Sul tropical. *Estudos Avançados*, 6(15): 41-65.
- Vanzolini, P.E.; Ramos-Costa, A.M.M.; Vitt, L.J. 1980. *Répteis das caatingas*. Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro. 161pp.
- Vapa, L.; Djan, M.; Obreht, D.; Hammer, S.; Suchentrunk, F. 2007. Allozyme variability of brown hares (*Lepus europaeus*) from the Vojvodina (Serbia), Compared to central and southeastern European Populations. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 53(1): 75-87.
- Vargas-Ramírez, M.; Chiari, Y.; Castaño-Mora, O.V.; Menken, S.B.J. 2007. Low genetic variability in the endangered Colombian endemic freshwater turtle *Podocnemis lewyana* (Testudines, Podocnemididae). *Contributions to Zoology*, 76(1): 1-7.
- Veasey, E.A.; Cardin, D.; Silva, R.M.; Bressan, E.A.; Vencovsky, R. 2008. Assessing the genetic structure of *Oryza glumaepatula* populations with isozyme markers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(5): 873-882.
- Veiga, M.M.; Meech, J.A.; Onate, N., 1994. Deforestation: A major source of mercury pollution in the Amazon. *Nature*, 368: 816-817.
- Viana, M.M.S.; Farias, I.P.; Santos, R.C.; Monjeló, L.A.S. 2004. Caracterização das Unidades de Manejo nas espécies de tartarugas do gênero *Podocnemis* da Amazônia utilizando dados genéticos. In: Andrade P.C.M. (Ed). *Criação e Manejo de Quelônios no Amazonas (Projeto Diagnóstico da Criação de Animais Silvestres no Estado do Amazonas)*. p.107-128.



- Vinocur, M.E.; Brass, K.E.; Rubin, M.I.; Silva, C.A.M. 2003. Genetic variability in the Brazilian criollo horse breed. *Ciência Rural*, 33(1): 137-142.
- Vogt, R. C. 2008. Tartarugas da Amazônia. Gráfica Biblos. Lima, Peru, 104pp.
- Vogt, R.C.; Cantarelli, V.H.; Carvalho, A.G. 1994. Reproduction of the cabeçudo, *Peltocephalus dumerilianus*, in the biological reserve of rio Trombetas, Pará, Brasil. *Chelonia Conservation and Biology*, 1(2): 145-148.
- Vogt, R.C.; Moreira, G.M.; Duarte, A.C.O.C. 2001. Biodiversidade de répteis do bioma floresta amazônica e ações prioritárias para sua conservação. In: Capobianco, J.P.R.; Veríssimo, A.; Moreira, A.; Sawyer, D.; Santos, I.; Pinto, L.P. (Eds). *Biodiversidade na Amazônia Brasileira: avaliação e ações prioritárias para a conservação, uso sustentável e repartição de benefícios*. São Paulo. Estação Liberdade: Instituto Socioambiental. p. 89-96.
- Waples, R. S. 1989. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics*, 121: 379–391.
- Wetterberg, G.B.; Ferreira, M.; Brito, W.L.S.; Araujo, V.C. 1976. Espécies da fauna amazônica potencialmente preferidas para consumo nos restaurantes de Manaus. *Brasil Florestal*, 7(25): 59-68.
- Williams, C.L.; Blejwas, K.; Johnston, J.J.; Jaeger, M.M. 2003. Temporal genetic variation in a coyote (*Canis latrans*) population experiencing high turnover. *Journal of Mammalogy*, 84(1): 177-184.
- Wright, S. 1921. Systems of mating. II. The effects of inbreeding on the genetic composition of a population. *Genetics*, 6: 111-123.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 395-420.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations*, vol.4. *Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press, Chicago. 580pp.
- Yeh, F.C.; Yang, R.C.; Boyle, T. 1999. *Popgene version 1.32*. Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. Center for International Forestry Research, University of Alberta.
- Yiğit, N.; Kankiliç; Çolak, R.; Çolak, E.; Gattermann, R.; Neumann, K.; Özkurt, Ş.; Gharkheloo, M.M. 2007. Allozyme variations and genetic differentiation in *Mesocricetus brandti* Nehring, 1898 and *Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839) (Mammalia: Rodentia). *Turkish Journal of Zoology*, 31: 219-227.
- Zawadzki, C.H.; Renesto, E.; Peres, M.D.; Paiva, S. 2008. Allozyme variation among three populations of the armored catfish *Hypostomus regani* (Ihering, 1905)

(Siluriformes, Loricariidae) from the Paraná and Paraguay river basins, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 31(3): 767-771.

### Sites de acesso as fotos

*Erymnochelys madagascariensis* (a) foto de (Hagen, 2008) Disponível em <<http://www.chelonia.org>> Acesso em: 20 maio 2008.

*Peltocephalus dumerilianus* foto (b) de (Bârrio-Amorós, 2008) Disponível em <[http://www.arkive.org/species/GES/reptiles/Peltocephalus\\_dumeriliana/GES023290.html](http://www.arkive.org/species/GES/reptiles/Peltocephalus_dumeriliana/GES023290.html)> Acesso em: 20 maio 2008.

*Podocnemis erythrocephala* (c) foto de (Gamble, 2005) Disponível em <<http://www.tc.umn.edu/~gamb1007/brturtles.htm>> Acesso em: 20 maio 2008.

*Podocnemis sextuberculata* (f) foto de (Rafael Bernhard) Disponível em <[http://www.austinsturtlepage.com/world\\_of\\_turtles/index-3.html](http://www.austinsturtlepage.com/world_of_turtles/index-3.html)> Acesso em: 20/05/2008.

*Podocnemis unifilis* (g) foto de (Gamble, 2005) Disponível em <<http://www.tc.umn.edu/~gamb1007/brturtles.htm>> Acesso em: 20 maio 2008.

*Podocnemis vogli* (h) foto de (Xavier, 2007) Disponível em <[http://www.austinsturtlepage.com/world\\_of\\_turtles/index-3.html](http://www.austinsturtlepage.com/world_of_turtles/index-3.html)> Acesso em: 20 maio 2008.

## Anexo I

Testes da probabilidade exata de Fisher (1935) aplicados para avaliar a distribuição dos alelos ( $MDH^a$  e  $MDH^b$ ) e dos genótipos ( $MDH^{aa}$  e  $MDH^{bb}$ ) entre machos e fêmeas de *Podocnemis expansa* na amostra populacional do Tapajós, na hipótese  $H_1$ .

	$MDH^a$	$MDH^b$	Total
♂	2	0	2
♀	16	44	60
<b>Total</b>	18	44	62

( $P=0,0809$ )

	$MDH^{aa}$	$MDH^{bb}$	Total
♂	1	0	1
♀	8	22	30
<b>Total</b>	9	22	31

( $P=0,2903$ )

Testes da probabilidade exata de Fisher (1935) aplicados para avaliar a distribuição dos alelos ( $MDH^a$  e  $MDH^b$ ) e dos genótipos ( $MDH^{aa}$  e  $MDH^{bb}$ ) entre machos e fêmeas de *Podocnemis expansa* na amostra populacional do Tapajós, na hipótese  $H_2$ .

	$MDH^a$	$MDH^b$	Total
♂	0	2	2
♀	18	42	60
<b>Total</b>	18	44	62

( $P=0,5003$ )

	$MDH^{aa}$	$MDH^{bb}$	Total
♂	0	1	1
♀	9	21	30
<b>Total</b>	9	22	31

( $P=0,7079$ )

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)