



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

JULIANA MARIA DE MORAIS

ANÁLISE DE PARENTESCO EM FILHOTES DA TARTARUGA DA
AMAZÔNIA (*Podocnemis expansa*) UTILIZANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITES

MANAUS-AM

2014

JULIANA MARIA DE MORAIS

**ANÁLISE DE PARENTESCO EM FILHOTES DA TARTARUGA DA
AMAZÔNIA (*Podocnemis expansa*) UTILIZANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como requisito para a titulação de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais - UEA.

Orientador: Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende

MANAUS-AM

2014

JULIANA MARIA DE MORAIS

**ANÁLISE DE PARENTESCO EM FILHOTES DA TARTARUGA DA
AMAZÔNIA (*Podocnemis expansa*) UTILIZANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como requisito para a titulação de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais - UEA.

Data da aprovação ___/___/___

Banca Examinadora:

Cleiton Fantin
Universidade do Estado do Amazonas

Jacqueline Batista
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Maria da Conceição Freitas
Universidade do Estado do Amazonas

Ficha Catalográfica

M826a Morais, Juliana Maria de

Análise de parentesco em filhotes da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) utilizando marcadores microsatélites . / Juliana Maria de Morais -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2014.

Xi, 53 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende

Ficha catalográfica elaborada por
Maria Eliana N. Silva – CRB- 11/248

Dedico esta Dissertação às pessoas que sempre me apoiam e incentivam em qualquer situação: Aos meus Pais e meu Irmão!

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por me dar forças e motivação todos os dias. Sem ele não teria ocorrido tantas vitórias em minha vida e não teria forças para enfrentar as barreiras impostas pela vida.

Aos meus pais e meu irmão que sempre estão ao meu lado... agradeço pela paciência constante, pelo apoio e incentivo desde cedo.

Aos meus tios, tias, primos e avós, que me sempre me apóiam e incentivam meu desenvolvimento.

Ao meu orientador Dr. Cleiton Fantin, por ter me concedido a oportunidade de desenvolver este trabalho no laboratório de Proteômica e Genômica do Mestrado em Biotecnologia da UEA.

À Dorothy Ívila (Mamis), pela amizade e paciência em compartilhar os conhecimentos. Obrigada MAMIS!!!

Ao pessoal do laboratório. Principalmente à André Higa, por sempre ajudar para o desenvolvimento do meu projeto, idas e vindas da UFAM. Obrigação HIGA!!! Aos alunos de iniciação científica: Maralúcia Magalhães, Gabriel Assis, Gabriel Miguel, Thaís Damasseno, Mylla Christie, pela colaboração e paciência de ensinar. À Fernanda Frida (FÊ), pela ajuda e pela paciência de me ouvir falar várias vezes sobre as técnicas moleculares (rsrs). Ao sr. Bacelar, que sempre estava a disposição a ajudar em qualquer problema dos laboratórios! Com cada um aprendi muito!

Aos meus amigos, Francisco Jr. (Juninho), Suzan, Jeff, Aninha e Valéria, que apesar da distância sempre transmitem a força de uma verdadeira amizade.

Aos amigos da graduação, que mesmo após o término do curso, permaneceram presentes! Em especial à Jéssica Pereira, Cláudia Gemaque, Andreza Lopes, Sarah Silveira (Sarinha), Simelvia Vida, Charlene Gualberto, Greyce Kelly, Lorena Almeida e Del Stéphanee. Vocês realmente acompanharam os momentos bons e turbulentos durante a graduação e pós-graduação. Clauuuu.... você me aguentou bastante durante o mestrado!!! Obrigada amiga!!!!

Ao Prof. Jair Maia que sempre está apto a nos ajudar. Obrigada pela orientação, amizade e apoio nesses anos durante a graduação e agora na pós-graduação. Essa paciência de aturar os alunos que já saíram da graduação e ajudar-nos em questionamentos diversos é uma virtude e tanta! Espero que essa amizade permaneça firme e forte.

Aos professores do MBT-UEA, por oferecer uma boa formação intelectual aos futuros profissionais. Em especial à professora Sandra Zanotto, Ana Frazão, Helena Camarão, Ieda Hortêncio, Antônia Queiroz, Joselita Santos e Adalberto Val. Muito obrigada por tudo, professores!

“Não é preciso ter olhos abertos para ver o Sol, nem é preciso ter ouvidos afiados para ouvir o trovão. Para ser vitorioso você precisa ver o que está visível.”

Sun Tzu (A Arte da Guerra)

RESUMO

Em algumas espécies, a presença de paternidade múltipla, em decorrência do comportamento poliândrico tem importantes consequências no aumento do tamanho efetivo de uma população em relação à paternidade única, principalmente quando se trata de espécies em perigo de extinção. Pela utilização exacerbada da carne, vísceras e ovos como alimento pelas comunidades locais, a tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) encontra-se em baixo risco/dependente de conservação, segundo a IUCN. Diante disso, estudos relacionados ao comportamento reprodutivo desta espécie são de extrema importância para contribuir com os programas para sua conservação. Estudos realizados anteriormente evidenciaram ocorrência de comportamento reprodutivo poliândrico em fêmeas de populações de tartaruga da Amazônia através de análises de paternidade em suas proles. Porém, há poucos dados que comprovem que tal comportamento seja predominante para a espécie, com relação à distribuição geográfica que ela abrange. Considerando que o índice de múltipla paternidade varia entre diferentes populações. Portanto, com a finalidade de ampliar as evidências de comportamento poliândrico na espécie, este trabalho analisou o comportamento reprodutivo da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé-AM, estimando o grau de polimorfismo de microssatélites de DNA em uma amostra de 359 filhotes recém-eclodidos de doze ninhos. Através da frequência e variação alélica em cinco locos microssatélites de DNA determinou-se a ocorrência de paternidade múltipla em todos os ninhos amostrados. Para um ninho atribuiu-se a presença de no mínimo quatro machos contribuindo na prole, para quatro ninhos no mínimo três e para sete ninhos um número mínimo de dois machos contribuindo para a ocorrência de paternidade múltipla. Tendo em vista que o comportamento reprodutivo poliândrico interfere diretamente na variabilidade genética da prole e no aumento de ovos férteis da população. Conhecer tal comportamento contribui com as estratégias de manejo e conservação da espécie *P. expansa*.

ABSTRACT

Previous studies showed the occurrence of polyandrous mating behavior in female Amazonian turtle populations through analysis of paternity in their broods. However, are not conclusive because the rate of multiple paternity varies among different populations. Therefore, in order to clarify the reproductive behavior of the Amazon turtle (*Podocnemis expansa*) in Mamirauá Sustainable Development Reserve, Tefé-AM, we estimated the degree of polymorphism of microsatellite DNA in a sample of 359 newly hatched chicks twelve nests of this species. Through frequency and allelic variation at five microsatellite loci of DNA determined the occurrence of multiple paternity in all sampled nests. For a nest attributed to the presence of at least four males contributing to the offspring for four nests at least three and seven nests of a minimum of two males contributing to the occurrence of multiple paternity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos da Tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) fêmea adulta e um jovem recém-eclodido. _____ 17

Figura 2: Mapa da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá _____ 22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos locos de microssatélites utilizados para as análises _____ 21

Tabela 2: Número de alelos, Heterozigose observada (Ho), Heterozigose esperada (He), Probabilidade de identidade (PI), Probabilidade de exclusão de paternidade dos cinco locos microssatélites utilizados para a análise de paternidade múltipla em *P. expansa* _____ 42

Tabela 3: Número de alelos obtidos dos ninhos analisados por locos; Inferência mínima de pais a partir dos números de alelos por locos; Número mínimo de grupos-irmãos estimados pelo programa Kinalyzer; Número mínimo de pais inferido pelo programa Gerud 2.0. _____ 43

Tabela 4: Genótipos parentais simulados pelo programa Gerud 2.0 dos 12 ninhos analisados. _____ 44

Tabela 5: Frequência de alelos nulos dos ninhos analisados com os locos Pod_91, Pe_344, Pe_519, Puni_1E1 e Puni_1D12, gerados pelo programa Micro-Checker. (-) Não houve frequência significativa de alelos nulos. _____ 45

LISTA DE SIGLAS A ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

µL - Microlitro

CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP's - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais

mL – Mililitro

pb – Pares de Base

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

RNA – Ácido Ribonucleico

ROX – 6-carboxi-X-rodamina

SSR – Simples Sequências Repetidas (Simple Sequence Repeats)

Taq – *Thermus aquaticus*

TET – Tetracloro-6-Carboxifluoresceína

VDS – Video Data System (Sistema de Datação por Vídeo)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Caracterização dos Quelônios	15
2.2 Classificação Taxonômica	15
2.3 <i>Podocnemis expansa</i>	16
2.4 Comportamento Reprodutivo da <i>Podocnemis expansa</i>	17
2.5 Conservação da Tartaruga da Amazônia	19
2.6 Técnicas moleculares para avaliar a diversidade genética	21
2.6.1 <i>Marcadores moleculares</i>	21
2.6.2 <i>Marcadores microsatélites</i>	22
2.6.3 <i>Estudos de paternidade em quelônios</i>	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Erro! Indicador não definido.
CAPÍTULO I	26
RESUMO	27
INTRODUÇÃO	27
MATERIAIS E MÉTODOS	30
Local de coleta das amostras	30
Coleta do Material	30
Extração de DNA	30
Amplificação in vitro via PCR	31
Reação de Genotipagem	32
Análise Genotípica	33
Análise de Dados	33
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	39
AGRADECIMENTOS	43
REFERÊNCIA	44

1. INTRODUÇÃO

Algumas evidências relacionadas ao comportamento reprodutivo relatam que o sistema de acasalamento de fêmeas da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*), assim como de outras espécies do gênero *Podocnemis*, é poliândrico (PEARSE e AVISE, 2001). Este comportamento juntamente com a capacidade de armazenar esperma, possibilita a ocorrência de múltipla paternidade para a prole, onde a fêmea tem seus ovos fecundados por dois, três ou mais machos (PEARSE, 2006; VALENZUELA, 2000).

Tais informações a respeito do aspecto reprodutivo são possíveis serem estudadas por observações do comportamento da *P. expansa* na natureza, mas há uma dificuldade na obtenção de detalhes, pois seu acasalamento ocorre em meio aquático. Para suprir essa dificuldade, a genética molecular possibilita investigações relacionadas a aspectos da biologia reprodutiva desta e entre outras espécies de quelônios (DAVY et al., 2011; FANTIN, 2008; FANTIN et al., 2010; PEARSE et al., 2006; VALENZUELA, 2000). Entre as numerosas técnicas moleculares disponíveis, os marcadores moleculares baseados em DNA microssatélite apresentam vantagens sobre os outros métodos para se avaliar o polimorfismo do DNA, por serem altamente variáveis, co-dominantes, baseados em PCR, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma, multialélicos e dependentes de pequena quantidade de DNA dos indivíduos analisados (BUSO et al., 2003).

Estudos utilizando marcadores microssatélites evidenciaram a presença de paternidade múltipla em espécies do gênero *Podocnemis* (VALENZUELA, 2000), constatando paternidade múltipla em 2 ninhos de *Podocnemis expansa* do rio Caquetá (Colômbia), utilizando oito locos de microssatélites. Estudando também *P. expansa*, Pearse et al. (2006) evidenciou em 32 ninhos de *P. expansa* da IslaPlayita (Venezuela), a presença de paternidade múltipla utilizando 7 locos de microssatélites.

Nesse contexto é que o presente estudo investigará o comportamento reprodutivo da *Podocnemis expansa*, analisando indivíduos recém-eclodidos oriundos da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, através de marcadores microssatélites. Com o intuito de fornecer dados relacionados as populações do estado do Amazonas, onde não há informações sobre este aspecto da biologia reprodutiva da tartaruga da Amazônia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização dos Quelônios

A ordem Testudines, que engloba os quelônios terrestres, marinhos e dulcícolas é determinada como a mais antiga de todas entre os vertebrados atuais, surgindo a mais de 200 milhões de anos (HICKMAN et al., 2004). A evidência fóssil mais antiga data do período Permiano, aproximadamente 280 milhões de anos atrás (FERRI, 2002).

Eles são encontrados em diversos ecossistemas, entre eles lagos, rios, mares, pântanos, desertos e florestas. Seus corpos são envolvidos por duas conchas ósseas, uma carapaça dorsal e um plastrão ventral, que estão ligados lateralmente por uma ponte óssea; seus dentes são ausentes; suas mandíbulas desenvolvidas, assumindo a forma de bico córneo; língua não extensível; pálpebras presentes; pescoço geralmente retrátil com oito vértebras cervicais; membros basicamente pendáctilos; vivem em regiões tropicais e temperadas (HICKMAN et al., 2004; POUGH, 2008).

Os quelônios, assim como os demais répteis, são ovíparos, realizam fecundação interna e seus ovos são incubados em solo até sua eclosão. Uma característica ímpar das tartarugas é que em algumas espécies, como em todos os crocodilianos e alguns lagartos, a temperatura do ninho determina o sexo dos filhotes, com predominância de fêmeas para temperaturas mais elevadas (acima de 34,5 °C) e machos para temperaturas mais baixas (de 33,37 °C a 33,97 °C) (BONACH, 2011; FERREIRA JÚNIOR, 2009; MALVASIO, 2012).

2.2 Classificação Taxonômica

Atualmente encontram-se duas subordens entre os quelônios: Cryptodira e Pleurodira. Na primeira, onde está inserida a maioria das espécies, os quelônios retraem a cabeça por meio de uma flexão vertical das vértebras cervicais, enquanto que os Pleurodira flexionam o pescoço lateralmente. Os Testudines atuais são classificados em 13 famílias, 10 da subordem Cryptodira (Testudinidae, Bataguridae, Emydidae, Trionychidae, Carettochelydae, Dermatemydidae, Kinosternidae, Chenoliidae, Dermochelydae e Chelydridae) e três da subordem Pleurodira (Chelidae, Pelomedusidae e Podocnemididae) com aproximadamente 300 espécies (POUGH et al., 2008).

Estão inseridos na família Podocnemididae três gêneros: *Erymnochely* Baur (1888), *Peltocephalus* Duméril e Bibron (1835) e *Podocnemis* Wagler (1830). Na América do Sul podem-se encontrar quatro espécies do gênero *Podocnemis*: *P. unifilis* Troschel (1848), *P. erythrocephala* Spix (1824), *P. sextuberculata* Cornália (1849) e *P. expansa* Schweigger (1812).

2.3 *Podocnemis expansa*

Tartaruga da Amazônia, como é conhecida popularmente a *Podocnemis expansa* (Figura 1), é o maior pleurodira e também o maior quelônio de água doce na América do Sul. Com peso máximo de 90 Kg para as fêmeas (com até 89 cm de comprimento) e 60 Kg para os machos (com 55 cm) (BONIN et al., 2006), apresentando, portanto dimorfismo sexual, os machos sendo ligeiramente menores que as fêmeas de carapaça mais estreita e comprida, cauda mais espessa e envaginação anal maior (ANDRADE, 2008).

Os indivíduos desta espécie apresentam a carapaça larga, achatada e lisa que possui coloração entre cinza e preta, sendo mais larga na parte posterior do que na anterior, além de extremamente grossa e pesada. O plastrão possui uma coloração creme, amarela ou marrom em adultos. Os filhotes variam pesando em média 25,8 g com a carapaça medindo entre 23,5 a 60,2 mm (Figura 1). Eles possuem uma carapaça marrom-acinzentada com o segundo e terceiro escudos costais um pouco elevados e serrilhados posteriormente, essas características são perdidas quando adultos, e seu plastrão apresenta coloração branca ou creme (BONIN et al., 2006; VOGT, 2008). A cabeça dos filhotes é caracterizada por uma profunda estria frontal, um anel estreito verde amarelado ao redor dos olhos, duas manchas verde-amareladas de formato irregular na escama interparietal e uma mancha que quase cobre as escamas maxilares. Tanto jovens quanto adultos apresentam coloração cinza nos membros e pescoço (VOGT, 2008).



Figura 1: Exemplos da Tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) fêmea adulta e um jovem recém-eclodido.

A dieta da Tartaruga da Amazônia em natureza constitui-se basicamente de origem vegetal, principalmente frutos, folhas e sementes. Mas apesar de seu sistema digestivo apresentar padrões de seres herbívoros (MAGALHÃES, 2010), também é possível encontrar em seu trato digestório vestígios animais, como alguns insetos presentes em seu meio ambiente (DUARTE, 1998) comportando-se como onívoros. Devido a este comportamento, em cativeiro esta espécie apresenta fácil adaptação a alimentos de origem animal e vegetal (MALVASIO et al., 2003).

A *P. expansa* habita tanto ambientes dulcícolas de água branca ou preta (ERNST & BARBOUR, 1989; RUEDA-ALMONACID et al., 2007). Sua distribuição é ampla, ocorrendo nos maiores afluentes do Orinoco, Essequibo, e drenagens do rio Amazonas na Colômbia, Venezuela, Guiana, noroeste do Peru, leste do Equador, norte da Bolívia e norte do Brasil (BONIN et al., 2006; VOGT, 2008).

Durante o período de cheia, adultos e jovens locomovem-se para lagos e florestas alagadas em busca de alimentos. Durante a estação de seca, adultos adentram os rios, enquanto juvenis geralmente permanecem nos lagos e grandes poças formados por águas recuadas. Assim que o nível da água baixa, as fêmeas migram para os maiores afluentes em busca das mais altas praias para nidificarem (BONIN et al., 2006; VOGT, 2008).

2.4 Comportamento Reprodutivo da *Podocnemis expansa*

Como todos os Testudines, a *P. expansa* é ovípara e atinge a maturidade sexual entre 8 e 12 anos, mas o seu crescimento continua até 25 anos, no máximo (VOGT, 2008). O acasalamento ocorre em meio aquático, entre os meses de janeiro e março, e após seis meses é realizada a postura dos ovos, que varia de 90 a 100 por desova (ANDRADE, 2008; RUEDA-ALMONACID et al., 2007).

No comportamento social, as tartarugas podem empregar três sentidos que ajudam na identificação de outros indivíduos: o tato, a visão e o olfato. No período do acasalamento, os machos nadam em busca de fêmeas, onde a cor e o padrão das patas posteriores permitem que os machos as identifiquem. Utiliza-se também o ferormônio para a identificação das fêmeas (POUGH et al., 2008).

Observa-se um padrão de acasalamento entre os quelônios, com quatro fases básicas, que podem ser denominadas por: (1) procura pela fêmea, (2) perseguição ou acompanhamento à fêmea, (3) pré-cópula e (4) cópula. Porém, nem sempre todas as fases ocorrem, e algumas espécies exibem corte mais elaborada, com etapas adicionais (MOLINA, 1992).

Durante o processo de nidificação, as fêmeas de *P. expansa* formam grupos para desovar e antes que depositem seus ovos, permanecem um longo período nos bancos de areia expostas ao Sol, para ocorrer a maturação dos ovos (ALHO e PÁDUA, 1982; BONIN et al., 2006). O comportamento de nidificação é estereotipado, ocorrendo sempre em cinco etapas básicas: (1) deambulação, (2) abertura da cova, (3) postura dos ovos, (4) fechamento da cova e (5) abandono do ninho (MOLINA, 1992).

O comportamento de nidificação é sincronizado com os períodos de vazante dos rios, ocorrendo geralmente nos períodos mais secos. Este processo só começa quando a água se estabiliza em seu nível mais baixo (RUEDA-ALMONACID et al., 2007). Como o período de desova varia de acordo com os níveis da água, no Brasil tem o seguinte padrão: julho-agosto no Acre, agosto-setembro no Araguaia, setembro em Rondônia, Goiás e Tocantins, setembro-outubro no Amapá e Mato Grosso, outubro nos rios Trombetas, Xingu e Tapajós, e dezembro-janeiro em Roraima (VOGT, 2008).

Após a estação de nidificação, as fêmeas permanecem por pelo menos dois meses nas áreas adjacentes às praias de nidificação. A incubação dos ovos tem uma duração média de 45 dias, coincidentemente, eles eclodem no início da estação chuvosa e a subida dos rios (BONIN et al., 2006; VOGT, 2008).

O sistema de acasalamento dessa espécie, assim como de outras espécies do gênero *Podocnemis* (FANTIN, 2008; FANTIN et al., 2010; PEARSE e AVISE, 2001; VALENZUELA, 2000), algumas aves, como o falcão das galápagos (*Buteo galapagoensis*) (BOLLMER et al., 2003), o caimão comum (*Porphyrion porphyrio*) (JAMIESON, 1997), o jacaná (*Jacana jacana*) (EMLEN et al., 1998), alguns peixes como o lebiste (*Poecilia reticulata*) (EVANS & MAGURRAN, 2000), mamíferos como o porquinho da Índia (*Cavia porcellus*) (HOHOFF et al., 2003) e o cão da pradaria (*Cynomys gunnisoni*) (HOOGLAND, 1998) é poliândrico, onde a fêmea tem diversos parceiros por estação reprodutiva (ALCOCK, 2011).

Segundo Alcock (2011), esse comportamento trás alguns benefícios, como reduzir o risco de alguns óvulos da fêmea não serem fecundados, já que há mais de um macho contribuindo. E também uma fêmea que acasala com mais de um macho tem a possibilidade de agregar genes de melhor qualidade, e assim terá uma variabilidade genética que melhorará a viabilidade da prole.

A maior probabilidade de fecundar todos os óvulos é potencializada com um aspecto importante da biologia reprodutiva desta espécie, a capacidade das fêmeas armazenarem esperma viável em seus ovidutos por longo período de tempo (PEARSE e AVISE, 2001). E como consequência dessa capacidade em armazenar esperma juntamente com o comportamento poliândrico, há casos de múltipla paternidade, em que a fêmea tem seus ovos fecundados por dois, três ou mais machos (VALENZUELA, 2000).

2.5 Conservação da Tartaruga da Amazônia

Juntamente com o Tracajá e a Iaçá, a Tartaruga da Amazônia é uma das espécies ameaçadas de extinção devido a alta exploração de sua carne, vísceras e ovos que são utilizados como alimento rico em proteínas pelas comunidades locais (FACHÍN-TERÁN et al., 2000). Encontrando-se em baixo risco/dependente de conservação, segundo a Lista Vermelha de Animais Ameaçados da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN, 2013).

A presença da *P. expansa* na lista de animais em extinção impulsionou pesquisas para contribuir substancialmente com planos efetivos de conservação e manejo dessa espécie. Trabalhos vêm sendo realizados com relação a biologia

comportamental (ALHO & PÁDUA, 1982; MOLINA, 1992), alimentar (ALMEIDA, 2009; MAGALHÃES, 2010), reprodutiva (PEARSE, 2006; VALENZUELA, 2000) que possibilite manter as populações ainda existentes estáveis ou que haja ascensão a elas.

Devido à exacerbada comercialização ilegal de quelônios capturados na natureza no estado do Amazonas, há projetos de criação comercial para estes animais. O estado é o que possui maior quantidade de criadouros comerciais de quelônios no país, com uma demanda crescente passando de 11 criadouros registrados em 1997, atingindo 69 em 2003, com cerca de 400.000 animais em cativeiro (ANDRADE et al., 2003; ANDRADE, 2007). Tal medida tende amenizar a predação humana a populações silvestres.

As populações pequenas e/ou que estão diminuindo de tamanho são de extrema preocupação para os conservacionistas. Por conta da redução ou o isolamento populacional, há a crescente ocorrência de endogamia e perda da diversidade genética, o que acarreta um vigor reprodutivo reduzido e menor habilidade para evoluírem em resposta às adversidades ambientais aumentando assim o risco de extinção da espécie (FRANKHAM, 2010; PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

Para amenizar o risco de extinção, algumas medidas são necessárias, como a aplicação de técnicas de manejo adequadas. A criação de áreas que preservem ou conservem o ambiente de animais que estão em risco de serem extintas é de fundamental importância. Tais áreas tem a função de preservar os recursos naturais, onde sua utilização deve ser controlada de forma compatível com as necessidades de conservação (PRISMACK & RODRIGUES, 2001).

Um exemplo de área que tem o objetivo de conservar a biodiversidade, com o manejo de recursos e desenvolvimento sustentável, é a Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSM) (Figura 2). Existente desde 1996, a RDSM está localizada na Amazônia Ocidental Brasileira, entre os rios Japurá, Solimões e Auti-Paraná, próximo à cidade de Tefé, no estado do Amazonas (RDSM, 2010). A Reserva possui uma área total de 1.124.000 ha, ou 11.240 km², coberta por floresta inundáveis de várzea (FACHÍN-TERÀN, 2003; RDSM, 2010).

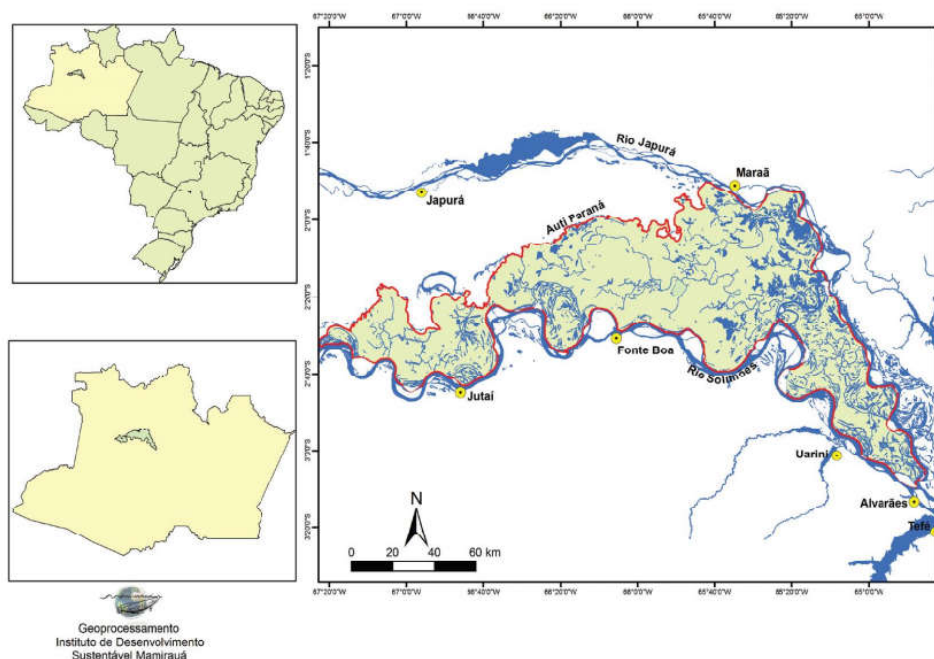


Figura 2: Mapa da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSM)

Em Mamirauá os quelônios sofrem pressão antrópica há décadas, por ribeirinhos e indígenas. Em consequência ao uso indiscriminado deste recurso, populações de *P. unifilis*, *P. sextuberculata* e *P. expansa* sofreram considerável redução, onde a última espécie citada foi praticamente extinta da região (FACHÍN-TERÀN, 2005).

Para auxiliar na conservação das espécies de quelônios, a RDSM possui a participação comunitária que tem por objetivo proteger e vigiar as áreas de nidificação, impedindo a predação total dos ninhos pelos humanos. Com este apoio, foi observado um aumento gradativo do número de ninhos de Tartaruga da Amazônia na Reserva (CAMILLO et al., 2012; FACHÍN-TERÀN, 2005).

2.6 Técnicas moleculares para avaliar a diversidade genética

2.6.1 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares revelam polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados. Sendo um marcador molecular, todo fenótipo molecular

oriundo de um gene expresso, ou ainda de como uma sequência direta do DNA. Um loco molecular que apresenta segregação mendeliana é considerado um marcador genético (LOPES et al., 2002).

Com o surgimento da técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) (MULLIS e FALOONA, 1987), aliou-se o poder de informação gerada por marcadores moleculares e a rapidez da técnica baseada em ciclos contínuos de desnaturação e amplificação das fitas de DNA mediados pela enzima DNA polimerase em pontos específicos do genoma, determinado pelo anelamento de *primers* específicos de seqüências complementares a estes pontos. Várias outras técnicas utilizam o princípio da técnica de PCR, tais como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (ZABEAU e VOS, 1993) e SSR (*Simple Sequence Repeats*) (WEBER e MAY, 1989), também conhecidos como microssatélites.

Segundo Queller et al. (1993), o marcador molecular ideal para estudos genômicos é um de fácil manuseio e que diferencie locos com alelos co-dominantes, que fornece valores não ambíguos, e preferivelmente com alta variação.

2.6.2 Marcadores microssatélites

Seres eucarióticos possuem muitas seqüências repetidas que podem ser complexas (minissatélites) (HAMADA et al., 1982) ou seqüências simples repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeats*), denominadas microssatélites (LITT e LUTY, 1989).

Entre as diversas técnicas moleculares disponíveis, os marcadores microssatélites são muito utilizados para responder questões de parentesco, como a determinação do tipo de paternidade em um grande número de taxa e espécies (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995), ajudando assim no estudo de comportamento reprodutivo das espécies.

Locos de microssatélites consistem de pequenas seqüências com um a quatro nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem*. O número de repetições é altamente variável e flanqueia seqüências conservadas (AVISE, 1994). O número de nucleotídeos repetidos classifica-se em: mononucleotídeos, dinucleotídeos, trinucleotídeos e tetranucleotídeos (WEBER, 1993).

A variação no número de repetições de microssatélites ocorre devido a ‘escorregões’ durante a replicação do DNA. A diversidade dos microssatélites é detectada pela amplificação do DNA usando Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Sequências únicas conservadas (iniciadores) flanqueando os microssatélites são usadas para especificar a região do DNA a ser amplificada (FRANKHAM et al., 2008).

Os microssatélites apresentam vantagens sobre os outros métodos moleculares disponíveis para se avaliar o polimorfismo do DNA, uma vez que eles são altamente variáveis, genótipos individuais podem ser diretamente inferidos, e indivíduos podem ser genotipados após amostragem não-invasiva (FRANKHAM et al., 2008).

2.6.3 Estudos de paternidade em quelônios

O conhecimento sobre a paternidade é crucial para a detecção do endocruzamento e para se verificar a acurácia de genealogias utilizadas no manejo genético (FRANKHAM et al., 2008).

Vários estudos que reportam a presença de paternidade múltipla em tartarugas marinhas já foram realizados em espécies como: *Caretta caretta* (BOLLMER et al., 1999; MOORE e BALL, 2002; ZBIDEN et al., 2007), *Chelonia mydas* (FITZSIMMONS, 1998; IRELAND et al., 2003; LEE E HAYS, 2004), *Lepidochelys olivacea* (HOEKERT et al., 2002; JENSEN et al., 2006; KICHLER et al., 1999) e *Natator depressus* (THEISSINGER et al., 2009). Entre as espécies marinhas já estudadas, a única que não apresentou evidência de paternidade múltipla foi a espécie *Dermochelys coriacea* (CURTIS et al., 2000; DUTTON et al., 2000; RIEDER et al., 1998). Estudos em tartarugas de água doce também evidenciaram paternidade múltipla nas seguintes espécies: *Chrysemys picta* (McTAGGART, 2000; PEARSE et al., 2001), *Emydoidea blandingii* (REFSNIDER, 2009), *Emys orbicularis* (ROQUES et al., 2006).

Em espécies do gênero *Podocnemis*, estudos anteriores comprovaram a presença de paternidade múltipla nas seguintes espécies: *Podocnemis unifilis* (FANTIN et al., 2008), *Podocnemis erythrocephala* (FANTIN et al., 2010), *Podocnemis sextuberculata* (FANTIN, 2008; PEREIRA et al., 2011) e *Podocnemis expansa* (PEARSE et al., 2006; VALENZUELA, 2000).

O primeiro estudo em espécies do gênero *Podocnemis* foi o de Valenzuela (2000), que evidenciou em 2 ninhos de *P. expansa* do rio Caquetá (Colômbia), a

existência de paternidade múltipla, utilizando oito locos de microssatélites. Pearse et al. (2006), utilizando um número amostral maior que o utilizado por Valenzuela, estudou 32 ninhos de *P. expansa* da Islã Playita (Venezuela) utilizando 7 locos de microssatélites, evidenciaram paternidade múltipla em apenas 10,3% dos 32 ninhos analisados. Esses resultados demonstram que o comportamento reprodutivo pode variar entre diferentes populações da mesma espécie. Esses estudos (PEARSE et al., 2006; VALENZUELA, 2000) foram os primeiros a identificar paternidade múltipla em *P. expansa* com base em marcadores microssatélites.

Outros estudos de paternidade em diferentes espécies do gênero *Podocnemis* foram realizados por Fantin (2008), que evidenciou a presença de paternidade múltipla em *P. unifilis* e *P. sextuberculata* da região de Barreirinha no estado do Amazonas, em seis ninhos utilizando oito locos de microssatélites para *P. unifilis*, e em sete ninhos utilizando seis locos de microssatélites para *P. sextuberculata*. Fantin et al. (2010) também verificou paternidade múltipla ao utilizar 4 locos de microssatélites em 6 ninhos de *P. erythrocephala* de 2 locais da Amazônia brasileira. Assim como Pereira et al. (2011), estudando *P. sextuberculata* também evidenciou paternidade múltipla nessa espécie em 4 dos cinco ninhos estudados, utilizando 6 locos de marcadores microssatélites.

Dentro de uma população dois fatores genéticos são fundamentais: primeiro, o fluxo gênico dentro de uma população facilita a disseminação de novos alelos obtidos por meio de mutação genética (MURPHY et al., 2007); em segundo lugar, o comportamento de acasalamento da fêmea (monogamia ou poliandria) afeta a variabilidade de sua prole especialmente quando poliandria é combinada com paternidade múltipla (DAVY et al., 2011). A poliandria acoplada com o armazenamento de esperma permite que a variabilidade genética de seus descendentes seja temporariamente desacoplada da disponibilidade de machos. A poliandria pode ser uma importante estratégia reprodutiva para maximizar a diversidade genética da prole em organismos de vida longa com fecundidade relativamente baixa (DAVY et al., 2011).

Chesser e Baker (1996) revelam que a presença de paternidade múltipla em algumas espécies tem importantes consequências no aumento do tamanho efetivo de uma população em relação à paternidade única, principalmente quando se trata de espécies em perigo de extinção e que quanto maior a frequência de paternidade múltipla, melhor será a condição de manter ou de incrementar a variabilidade genética inter e intra populacional.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a existência do comportamento poliândrico de fêmeas da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) provenientes da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSM), utilizando marcadores microssatélites.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Gerar o genótipo de todas as amostras provenientes de filhotes de *P. expansa* dos ninhos oriundos da RDSM;
- ✓ Verificar o nível de parentesco dos filhotes pertencentes ao mesmo ninho;
- ✓ Estimar o número mínimo de machos contribuindo em cada ninho.

CAPÍTULO I

DETECÇÃO DO COMPORTAMENTO POLIÂNDRICO EM TARTARUGAS DA AMAZÔNIA (*Podocnemis expansa*) UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES.

Deteção do Comportamento Poliândrico em Tartarugas da Amazônia (*Podocnemis expansa*) Utilizando Marcadores Microsatélites.

RESUMO

Com a finalidade de entender o comportamento reprodutivo da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*), foi estimado o grau de polimorfismo de microsatélites de DNA em uma amostra de 359 filhotes recém-eclodidos de doze ninhos desta espécie provenientes da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé-AM. Através da frequência e variação alélica em cinco locos microsatélites de DNA determinou-se a ocorrência de paternidade múltipla em todos os ninhos amostrados. Para um ninho atribuiu-se a presença de no mínimo quatro machos contribuindo na prole, para seis ninhos no mínimo três, e para cinco ninhos um número mínimo de dois machos contribuindo para a ocorrência de paternidade múltipla. Entender o padrão do comportamento reprodutivo desta espécie, contribui com estratégias de manejo e conservação para a população na reserva.

INTRODUÇÃO

A presença de paternidade múltipla, em decorrência do comportamento poliândrico em animais vem sendo descrita em várias espécies, como o falcão das galápagos (*Buteo galapagoensis*) (BOLLMER et al., 2003), o caimão comum (*Porphyrio porphyrio*) (JAMIESON, 1997), o jacaná (*Jacana jacana*) (EMLEN et al., 1998), alguns peixes como o lebiste (*Poecilia reticulata*) (EVANS & MAGURRAN, 2000), mamíferos como o porquinho da Índia (*Cavia porcellus*) (HOHOFF et al., 2003) e o cão da pradaria (*Cynomys gunnisoni*) (HOOGLAND, 1998), e quelônios como a tartaruga verde (*Chelonia mydas*) (LEE E HAYS, 2004), a tartaruga cabeçuda (*Caretta caretta*) (ZBIDEN et al., 2007) e do gênero *Podocnemis* (FANTIN, 2008; FANTIN et al., 2010; PEARSE et al., 2006; VALENZUELA, 2000).

Segundo Alcock (2011), este comportamento trás alguns benefícios indiretos a fêmea, como reduzir o risco de alguns óvulos não serem fecundados, já que há mais de um macho contribuindo. E também a promiscuidade possibilita a fêmea agregar genes de melhor qualidade, e assim terá uma variabilidade genética que melhorará a

viabilidade da prole. Este comportamento em algumas espécies tem importantes consequências no aumento do tamanho efetivo de uma população em relação à paternidade única, principalmente quando se trata de espécies em perigo de extinção (CHESSER e BACKER, 1996; LOTTERHOS, 2011).

Dentro de uma população em risco de extinção, dois fatores genéticos são fundamentais: primeiro, o fluxo gênico dentro de uma população facilita a disseminação de novos alelos obtidos por meio de mutação genética, aumentando a variabilidade genética e consequentemente a viabilidade da mesma diante uma adversidade ambiental, melhorando o desempenho sob a seleção natural (FRANKHAM et al., 2010; MURPHY et al., 2007); e em segundo lugar, o comportamento de acasalamento da fêmea (monogamia ou poliandria) afeta a variabilidade de sua prole especialmente quando poliandria é combinada com paternidade múltipla (DAVY et al., 2011). A poliandria acoplada ao armazenamento de esperma permite que a variabilidade genética dos descendentes seja temporariamente independente a disponibilidade de machos. Portanto, o comportamento poliândrico pode ser uma importante estratégia reprodutiva para maximizar a diversidade genética da prole em organismos de vida longa com fecundidade relativamente baixa (DAVY et al., 2011).

Considerando que estudos relacionados ao comportamento poliândrico, já evidenciado em *P. expansa*, relatam benefícios genéticos para a espécie, pois juntamente com a ocorrência de paternidade múltipla aumenta a variabilidade genética da prole e diminui a ocorrência de endogamia entre os indivíduos, ajudando a restaurar populações reduzidas (PEARSE e AVISE, 2001; VALENZUELA, 2000).

Encontrando-se em baixo risco/dependente de conservação, segundo a IUCN (2013), devido utilização exacerbada da carne, vísceras e ovos como alimento pelas comunidades locais, juntamente com a *Podocnemis unifilis* e *Podocnemis sextuberculata* (FACHIN-TERÁN et al., 2000), a tartaruga da Amazônia, pode ser favorecida diante a redução populacional com a ocorrência da paternidade múltipla nas populações escassas.

A população de tartaruga da Amazônia da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDMS) sofreu uma considerável redução, sendo praticamente extinta devido aos altos índices de predação nos séculos passados (FACHIN-TERÁN, 2005). Para auxiliar na conservação das espécies de quelônios, a RDMS possui a participação comunitária para proteger e vigiar as áreas de nidificação, impedindo a predação por humanos e outros animais como onças (CAMILLO et al., 2012; FACHIN-

TERÁN, 2005). Contudo, o aumento dos baixos números atuais de fêmeas desovando, de quatro a doze fêmeas depositando seus ovos (FACHÍN-TERÁN et al., 2004; FACHÍN-TERÁN, 2005), só poderá ser observado após décadas das medidas tomadas para a conservação da espécie (FACHÍN-TERÁN, 2005; READER, 2003). A reserva tem registros de 14 ninhos anuais de *P. expansa* na Praia do Horizonte, com eclosão de 105 ovos em média (CAMILLO et al., 2012; FACHÍN-TERÁN, 2005; READER, 2003).

Este estudo objetivou detectar o comportamento poliândrico em fêmeas de *P. expansa* da Reserva de Desenvolvimento Mamirauá (RDSM), Tefé-AM, onde esta espécie foi praticamente extinta devido a excessiva predação pela comunidade local.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de coleta das amostras

A Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSM) está localizada na Amazônia Ocidental Brasileira, entre os rios Japurá, Solimões e Auti-Paraná, perto da cidade de Tefé, no estado do Amazonas. Tem uma extensão de 1.124.000 ha e está inteiramente localizada em florestas inundáveis de várzea (FACHÍN-TERÀN, 2003).

Coleta do Material

O estudo foi desenvolvido a partir das amostras sanguíneas de 368 indivíduos, sendo 359 filhotes recém-eclodidos, provenientes de 12 ninhos, e 9 fêmeas, mães de nove ninhos de *Podocnemis expansa*, previamente coletados da Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, distribuídos aleatoriamente às margens do Rio Solimões. Os ninhos analisados tiveram em média 90 filhotes eclodidos, porém foram analisados por cada ninho: N1 = 30; N2 = 30; N3 = 30; N4 = 29; N5 = 30; N6 = 30; N7 = 30; N8 = 30; N9 = 30; N10 = 30; N11 = 30; N12 = 30.

O método utilizado para a coleta de sangue foi através da punção da veia femoral utilizando seringa de 1 mL, coletando até 100 µL de sangue e armazenando-os em microtubos contendo 500 µL de etanol absoluto, e armazenados posteriormente a 4°C. Após a coleta de sangue, os filhotes foram libertados no local de origem.

Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada pelo método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987) adequado para células sanguíneas nucleadas, que consiste em quatro etapas: rompimento celular e remoção de proteínas/RNA, separação dos ácidos nucleicos, precipitação e hidratação do precipitado.

A eficácia da extração e a concentração do DNA foram verificadas através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1%. Neste procedimento, foram utilizados 2

μL do DNA extraído juntamente com 2 μL de GelRedTM. Após o término da corrida, o gel foi observado em um transluminador de luz ultravioleta VDS (Video Data System).

Amplificação in vitro via PCR

Após a extração, o DNA foi submetido à Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) seguindo o protocolo econômico descrito por Schuelke (2000). Nesta reação são utilizados três *primers*: uma sequência específica de *primer forward* com a cauda M13 (-21) na extremidade 5', uma sequência específica de *primer reverse* e uma sequência universal M13 (-21) que contém a fluorescência, o TET ou FAM.

As condições de termociclagem estão divididas em duas etapas: na primeira etapa, o *primer forward* com sua sequência M13 (-21) é incorporado ao produto de PCR, na etapa seguinte, quando o *primer forward* for totalmente utilizado, a temperatura de anelamento é reduzida para que ocorra o anelamento do *primer* universal M13 (-21), complementar a cauda M13 do *forward*, a fim de que seja incorporada ao produto do PCR a fluorescência. Por esta razão, a quantidade de *primer forward* será menor que do *primer reverse*.

Seguindo este protocolo a reação de PCR será realizada em um tubo de 0,2 mL, ajustada para um volume final de 13,5 μL , contendo 4,6 μL de Água Milli-Q, 1,5 μL de MgCl_2 25mM, 1,5 μL de dNTP 2,5 mM, 1,5 μL de Tris-HCL 2mM, 0,75 μL do *primer forward* M13 2pM/ μL , 0,75 μL do *primer* M13, 1,5 μL do *primer reverse* 2pM/ μL , 0,4 μL de *Taq* polimerase 1U/ μL e 1,0 μL de DNA.

A temperatura inicial de desnaturação do DNA foi de 94°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos à 94°C por 50 segundos; 50°C à 64°C, dependendo da temperatura específica de anelamento para cada *primer* por 50 segundos; e 72°C por 1 minuto. Logo após, foram realizados 20 ciclos à 94°C por 40 segundos, 53°C por 35 segundos e 72°C por 40 segundos, para anelamento do *primer* M13 e extensão final à 72°C por 10 minutos.

Foram utilizados cinco locos de microssatélites para as análises: um descrito por Sites et al. (1999), dois por Valenzuela (2000), ambos desenvolvidos para a espécie, e dois por Fantin et al. (2007), desenvolvidos para *P. unifilis*, cujas características estão detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos locos de microssatélites que serão utilizados para as análises.

Loco	Repetição	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
Pod_91	G ₉ (GT) ₁₇ (GA) ₈	197-247	55	Sites et al. (1999)
PE_344	(AG) ₁₃	248-298	50	Valenzuela (2000)
PE_519	(CT) ₇ (CA) ₁₈ (CG) ₂ (CA) ₈	371-455	56	Valenzuela (2000)
Puni_1D12	(GA) ₁₀	238-292	55	Fantin et al. (2007)
Puni_1E1	(CT) ₉ tt(CT) ₇	261-301	64	Fantin et al. (2007)

O produto amplificado foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para verificar sua eficiência. Neste procedimento, foram utilizados 2 µL do produto de PCR juntamente com 2 µL de GelRed™ e um marcador de peso molecular conhecido (100 pb), para posterior comparação e estimativa da concentração do DNA em análise. Após o término da corrida, o gel foi observado em um transluminador de luz ultravioleta VDS (Video Data System).

Reação de Genotipagem

Em seguida, os produtos de PCR foram diluídos na proporção de 1:100 e foi adicionado o marcador de tamanho ROX pUC-19 (90, 105, 131, 151, 182, 201, 254, 306, 337, 362, 425, 486, 509) modificado de acordo com DeWoody et al. (2004). As genotipagens foram realizadas no sequenciador automático de DNA ABI 3130xl.

Análise Genotípica

A análise dos alelos observados para cada loco, foi realizada utilizando o programa *GeneMarker v.2.2.0*, a fim de que seja identificado o genótipo de cada loco para os indivíduos amostrados. Em seguida, foi construída uma matriz com as informações dos genótipos dos indivíduos para que fossem realizadas as análises estatísticas para os indivíduos amostrados.

Análise de Dados

As probabilidades de identidade (PI) e de exclusão (PE) foram calculadas, para cada ninho, no programa *GenAIEx 6.501* (PEAKALL e SMOUSE, 2012), o qual necessitou das frequências alélicas de cada loco analisado, que foi obtida através do programa *Arlequin 3.5.1.3* (EXCOFFIER e LISCHER, 2010). Essas probabilidades variam de zero a um e indicam o quão informativo é o grupo do loco utilizado. A probabilidade de identidade, quanto mais próximo a zero, indica que o loco é mais informativo, enquanto a probabilidade de exclusão é quanto mais próximo a um.

Para a análise de paternidade foi utilizado o método mínimo de contagens de alelos (MYERS & ZAMUDIO, 2004), que pressupõe uma distribuição Mendeliana dos alelos na progênie, considera-se a presença de 5 cinco alelos por loco amostrado entre os filhotes de cada ninho, um indicativo de paternidade múltipla, se nenhum alelo maternal for conhecido (dois alelos maternais, dois alelos de um macho, o quinto de um segundo macho). Utiliza-se também a análise de paternidade baseada na inferência dos genótipos maternos, os quais são identificados pela presença de filhotes homozigotos por loco dentro de um ninho. Um alelo materno pode ser inferido quando um filhote é homozigoto de um dado locus (AA), e o genótipo maternal completo pode ser inferido, quando filhotes são homozigotos para dois diferentes alelos (AA e BB; genótipo materno = AB). Quando um alelo materno pode ser inferido, estima-se paternidade múltipla para um ninho, se a análise de um loco indicar a presença de quatro alelos; e se os dois alelos maternos puderam ser detectados, a presença de três alelos no loco analisado indica paternidade múltipla no ninho.

Outros métodos de análise para os genótipos também foram utilizados. Um deles foi por meio do programa *Kinalyzer* (ASHLEY et al., 2009; BERGER-WOLF et al., 2007), que tem a finalidade de estimar relacionamentos entre irmãos verdadeiros e

meio-irmãos em uma mesma prole, atribuir paternidade e inferir sistemas de acasalamento (poligâmico/monogâmico) sem o conhecimento do genótipo materno. É um programa que utiliza otimização combinatória com base em regras de herança mendeliana para encontrar o menor número de grupos de irmãos que contêm todos os indivíduos.

Para confirmar o genótipo materno dos ninhos que o tinham, foi utilizado o programa *GERUD 2.0* (JONES, 2005) que reconstrói os genótipos dos parentais e identifica o número mínimo de pais contribuintes baseado nos genótipos das proles.

O excesso de homozigotos acarreta ao desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg em uma população. Porém, a homozigozidade pode ser aparente, onde o alelo, por algum motivo, não foi detectado. Essa aparente homozigose pode ocorrer devido aos alelos nulos, alelos não amplificados. Para os microssatélites os alelos nulos são produto de degradação, baixas concentrações do DNA ou de uma mutação nas regiões flaqueantes, que impedem o reconhecimento e anelamento dos *primers*. A análise da ocorrência de alelos nulos foi realizado pelo programa *Micro-Checker 2.2.3* (OOSTERHOUT et al., 2005), que consiste numa aplicação desenvolvida para procurar alelos nulos, bandas stutter e alelos drop-out, que ocorrem durante o processo de PCR e que vão afetar a análise dos microssatélites.

RESULTADOS

Foram genotipados 359 filhotes e nove fêmeas de 12 ninhos de *P. expansa* com cinco locos microssatélites. O número de alelos por loco variou de 21-37, com heterozigose observada de 0,3152 (Pod_91) a 0,9599 (Puni_1D12) (Tabela 2). A heterozigose observada com a combinação de todos os locos foi de 99,99%, indicando a alta sensibilidade para a detecção de paternidade múltipla com estes locos para esta espécie. A variação da probabilidade de identidade e exclusão foi de 0,0291 (Pe_344) a 0,0773 (Pod_91) e 0,9445 (Puni_1E1) a 0,9731 (Pod_91), respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Número de alelos, Heterozigose observada (Ho), Heterozigose esperada (He), Probabilidade de identidade (PI), Probabilidade de exclusão de paternidade dos cinco locos microssatélites utilizados para a análise de paternidade múltipla em *P. expansa*.

Loco	Nº de Alelos	Ho	He	PI	PE	Referência
Pod_91	26	0,3152	0,9399	0,0773	0,9731	Sites (1999)
Pe_344	25	0,7951	0,9304	0,0291	0,9654	Valenzuela (2000)
Pe_519	37	0,3921	0,9340	0,0469	0,9699	Valenzuela (2000)
Puni_1D12	25	0,9599	0,9194	0,0376	0,9524	Fantin et al. (2007)
Puni_1E1	21	0,5274	0,9068	0,0413	0,9445	Fantin et al. (2007)
Média	26,8	0,5979	0,9261	*1,09E-07	*0,9999	

*Probabilidade de identidade e exclusão de paternidade dos locos combinados.

Com a contagem simples dos alelos por loco em cada ninho, indicou paternidade múltipla em praticamente todos os ninhos, com exceção do ninho um (N1) com o loco Pod_91, que apresentou apenas quatro alelos (Tabela 3). Conhecendo o genótipo materno, nos ninhos em que foi possível obtê-lo a partir da amostra das fêmeas, e os demais com a inferência do genótipo a partir de indivíduos homozigotos,

foi possível evidenciar paternidade múltipla com contribuição de no mínimo dois pais em cada ninho.

Tabela 3: Número de alelos obtidos dos ninhos analisados por locos; Inferência mínima de pais a partir dos números de alelos por locos; Número mínimo de grupos-irmãos estimados pelo programa *Kinalyzer*; Número mínimo de pais inferido pelo programa *Gerud 2.0*.

Ninhos	Locos					Inferência mínima de pais	Kinalyzer	Gerud 2.0
	Pod_9	Pe_34	Pe_51	Puni_1D1	Puni_1E			
	1	4	9	2	1			
N1*	4	13	16	15	10	1	15	2
N2*	8	16	13	16	7	3	13	3
N3*	12	10	13	17	9	4	14	3
N4*	9	17	11	15	13	4	14	2
N5*	9	18	10	12	13	4	14	3
N6*	10	9	7	10	12	3	13	3
N7*	10	12	11	11	12	4	14	2
N8*	8	12	23	8	6	2	14	4
N9*	13	14	8	8	14	3	13	2
N10	15	13	8	9	8	3	12	2
N11	8	6	14	5	11	2	12	3
N12	10	13	10	10	13	4	13	3

*Ninhos que possuem o genótipo materno.

A análise de formação de grupos-irmãos por otimização realizada pelo programa *Kinalyzer* indicou a ocorrência de 12 (N10, N11), 13 (N2, N6, N9 e N12), 14 (N3, N4, N5, N7 e N8) e 15 (N1) grupo-irmãos por análise combinatória de todos os locos (Tabela 3).

Com o programa *GERUD 2.0* foi possível simular os genótipos materno e paterno de cada prole analisada. Os genótipos maternos simulados pelo programa foram comparados com os genótipos das fêmeas analisadas, apresentando o mesmo padrão para a maioria dos locos, com exceção apenas das fêmeas que apresentaram homozigose

em alguns locos. A simulação dos genótipos paternos (Tabela 4) colaborou a estimar o número mínimo de machos contribuintes em cada ninho, indicando o mínimo de dois (N1, N4, N7, N9 e N10), três (N2, N3, N5, N6, N11 e N12) a quatro (N8) pais (Tabela 3).

Tabela 4: Genótipos parentais simulados pelo programa *Gerud 2.0* dos 12 ninhos analisados.

Ninho	Parentais	Pod_91	Pe_344	Pe_519	Puni_1D12	Puni_1E1
N1	Mãe	215/215	266/258	405/413	256/260	281/275
	Pai 1	215/217	250/252	387/389	246/258	273/273
	Pai 2	215/215	264/258	403/419	258/266	263/271
N2	Mãe	217/219	252/294	401/375	262/268	273/269
	Pai 1	217/215	278/256	383/407	258/260	269/273
	Pai 2	217/215	254/264	381/377	252/260	271/275
	Pai 3	215/221	264/290	383/401	260/262	273/273
N3	Mãe	223/225	252/294	401/375	262/268	269/273
	Pai 1	223/223	256/278	383/407	258/260	273/269
	Pai 2	223/225	254/264	381/377	260/252	271/275
	Pai 3	225/223	264/290	383/401	260/262	273/273
N4	Mãe	215/201	272/254	411/413	268/266	273/273
	Pai 1	211/233	252/256	413/415	270/270	277/297
	Pai 2	211/211	266/284	411/415	248/266	265/275
N5	Mãe	207/201	272/266	377/375	246/262	271/271
	Pai 1	201/239	260/266	399/405	250/244	277/263
	Pai 2	235/207	266/262	399/401	252/256	269/267
	Pai 3	207/217	266/290	399/399	242/256	267/271
N6	Mãe	215/241	260/260	405/407	244/248	275/271
	Pai 1	211/207	250/258	401/399	246/252	261/283
	Pai 2	211/239	250/256	399/407	246/244	269/283
	Pai 3	209/239	260/250	399/405	252/246	269/285
N7	Mãe	235/239	262/250	409/405	252/252	271/273

	Pai 1	233/235	254/258	401/411	242/240	269/283
	Pai 2	233/241	270/252	397/399	240/252	281/269
	Mãe	205/231	264/262	377/407	246/250	273/273
N8	Pai 1	205/231	258/264	407/409	256/252	271/271
	Pai 2	207/229	260/266	427/407	256/242	269/271
	Pai 3	205/205	274/258	377/405	252/248	273/275
	Pai 4	205/205	264/272	401/409	250/250	277/271
	Mãe	207/211	266/262	423/425	248/250	287/273
N9	Pai 1	213/211	256/256	401/409	250/256	273/287
	Pai 2	211/231	266/250	399/425	246/250	275/279
	Mãe	211/245	280/280	409/433	252/254	275/279
N10	Pai 1	247/211	266/264	409/409	250/256	279/283
	Pai 2	239/213	266/276	407/431	248/250	283/279
	Mãe	237/207	258/260	427/431	248/248	271/269
N11	Pai 1	207/209	268/260	433/431	252/250	291/281
	Pai 2	209/209	260/262	433/425	250/252	275/285
	Pai 3	211/211	270/260	405/451	252/248	285/275
	Mãe	203/229	256/276	427/431	248/248	269/271
N12	Pai 1	209/209	268/262	433/431	250/252	291/281
	Pai 2	229/229	270/256	433/425	250/252	285/275
	Pai 3	203/209	268/268	405/451	252/248	285/275

A análise de alelos nulos presentes nos genótipos realizados pelo programa *Micro-Checker* 2.2.3, apresentou frequência significativa em todos os locos. Porém, apenas o loco Pod_91 obteve frequência significativa de alelos nulos em todos os ninhinhos, os locos Pe_519 e Puni_1E1 não apresentaram em apenas um ninho cada (N2 e N4, respectivamente), o loco Pe_344 apresentou em três ninhinhos (N1, N7 e N11) e o loco Puni_1D12 apresentou em apenas um ninho (N2) (Tabela 5). Há a presença de alelos nulos em decorrência de uma mutação na região de anelamento dos *primers*, impedindo a amplificação do alelo. Devido a isso, o resultado de homocigotos representa a amplificação de apenas um alelo.

Tabela 5: Frequência de alelos nulos dos ninhinhos analisados com os locos Pod_91, Pe_344, Pe_519, Puni_1E1 e Puni_1D12, gerados pelo programa *Micro-Checker*. (-) Não houve frequência significativa de alelos nulos.

Ninhos	Locos				
	Pod_91	Pe_344	Pe_519	Puni_1D12	Puni_1E1
N1	0,3459	0,2743	0,1618	-	0,2282
N2	0,4703	-	-	0,0988	0,1567
N3	0,3568	-	0,2091	-	0,0936
N4	0,4492	-	0,2355	-	-
N5	0,2934	-	0,2040	-	0,1008
N6	0,3755	-	0,4760	-	0,3787
N7	0,1808	0,1255	0,2132	-	0,0888
N8	0,1391	-	0,0957	-	0,3734
N9	0,3091	-	0,4290	-	0,3146
N10	0,1660	-	0,4514	-	0,0978
N11	0,2039	0,1795	0,2019	-	0,2526
N12	0,2041	-	0,4729	-	0,1039

DISCUSSÃO

Os cinco locos utilizados para a análise de paternidade de *P. expansa* apresentaram padrões polimórficos satisfatórios, tanto os desenvolvidos para a espécie (Pod_91, Pe_344 e Pe_519) quanto os desenvolvidos, a princípio, para *P. unifilis* (Puni_1D12 e Puni_1E1). O alto polimorfismo constatado nos locos é de extrema importância, pois o conteúdo de informação do loco, que depende diretamente do número de alelos e da distribuição das frequências alélicas, potencializa a sensibilidade de avaliação de paternidade (WENK et al., 2005).

A eficácia da análise de paternidade não depende da quantidade de locos utilizados, mas sim do poder informativo que eles possuem. Esse poder informativo é evidenciado nos índices de probabilidade de identidade e probabilidade de exclusão (CURI e LOPES, 2001). Foi constatado pelo presente estudo que os cinco locos analisados apresentaram bons índices de probabilidade de identidade (0,0073 – 0,0158) e de exclusão de paternidade (0,9445 – 0,9731). Sendo que, quanto menor é o índice de probabilidade de identidade genética e maior é a probabilidade de exclusão de paternidade, indica um bom valor informativo dos locos analisados. Pearse et al. (2006) também analisando paternidade múltipla em *P. expansa*, encontrou um bom índice de probabilidade de exclusão de paternidade utilizando *primers* desenvolvidos por Sites et

al. (1999) e Valenzuela (2000), Pod_91 e Pe_519 utilizados neste estudo, corroborando que estes *primers* são sensíveis para detectar paternidade múltipla.

O método simples de contagem de alelos pressupõe uma distribuição mendeliana dos alelos na progênie, onde cada filhote da prole deve herdar um dos dois alelos maternos e um alelo paterno. Este método admite que todos os alelos dos filhotes não herdados pelas fêmeas foram necessariamente adquiridos pelo genótipo dos pais (MYERS & ZAMUDIO, 2004). Em visto que, a ocorrência de mais de dois alelos, além dos alelos maternos, indica paternidade múltipla na prole. Porém, apesar de ser informativo, este método não permite estimar a quantidade mínima de machos atuantes em cada ninho, combinando todos os locos. Esta informação foi obtida através do programa GERUD 2.0 (JONES, 2005), que permitiu simular os genótipos dos parentais e estimar o número mínimo de pais contribuindo em cada ninho, com os cinco locos combinados.

Foi observada paternidade múltipla em 100% dos ninhos estudados, com análise da simples contagem de alelos, confirmada com a análise realizada com o programa GERUD 2.0, indicando um mínimo de dois, três e quatro machos contribuindo em cada ninho.

Como exemplo de estudos com *P. expansa*, Valenzuela (2000) estudando dois ninhos de uma população de tartaruga da Amazônia, no rio Caquetá (Colômbia), evidenciou paternidade múltipla em ambos os ninhos, utilizando oito locos microssatélites. Em suas análises, Valenzuela (2000) constatou a contribuição de no mínimo dois pais para um ninho e de três pais para o outro.

Estudando 32 ninhos de uma população do rio Orinoco (Venezuela), utilizando sete locos microssatélites, Pearse et al. (2006) evidenciou paternidade múltipla em apenas 10,3% dos ninhos analisados, contrastando com os resultados obtidos por Valenzuela (2000). Essa diferença dos resultados apresentados por Valenzuela (2000) e Pearse et al. (2006), demonstram que populações de locais distintos podem exibir padrões de paternidade diferentes, porém indicam que o número amostral é relevante para determinar se o comportamento reprodutivo poliândrico é predominante em uma população.

Em outras espécies do gênero *Podocnemis* foi evidenciado paternidade múltipla. Como na *P. unifilis*, estudada por Fantin et al. (2008), que encontrou múltipla paternidade em seis ninhos de uma população do rio Amazonas (Barreirinha, AM, Brasil) utilizando oito locos microssatélites, com contribuição de no mínimo dois pais

em cada ninho. Fantin (2008) também evidenciou paternidade múltipla em sete ninhos de *P. sextuberculata*, do rio Amazonas, com o mínimo de dois pais contribuindo, analisando seis locos microssatélites. E em outro estudo com *P. erythrocephala*, Fantin et al. (2010), analisou seis ninhos com participação de mais de dois machos utilizando quatro locos microssatélites.

O índice de paternidade múltipla evidenciado neste estudo corrobora com estudos anteriores que determinaram a *P. expansa* como uma espécie que apresenta comportamento reprodutivo poliândrico (PEARSE et al., 2006; VALENZUELA, 2000). Tal comportamento também foi observado em outros répteis como os crocodilianos (DAVIS et al., 2001; OLIVEIRA, 2010), lagartos (EIZAGUIRRE et al., 2007; FITZE et al., 2005; MORRISON et al., 2002; OPPLIGER et al., 2007), serpentes (GARNER e LANSEN, 2005; MADSEN et al., 2005) e quelônios (CRIM et al., 2002; FANTIN, 2008; FANTIN et al., 2008; FANTIN et al., 2010; JENSEN et al., 2006; LEE e HAYS, 2004; PEARSE et al., 2002; ROQUES et al., 2006). Definindo a poliandria como um comportamento reprodutivo predominante entre estes metazoários.

Porém, por mais que a poliandria ocorra em grande parte dos répteis, é intrigante que a fêmea não tenha benefícios diretos, e que estes sejam apenas indiretamente, como a contribuição genética e a fertilização de seus óvulos, mesmo que não hajam evidências suficientes comprovando-os (PEARSE e AVISE, 2001; ULLER e OLSSON, 2008). O benefício indireto mais óbvio para a fêmea é a fertilização de seus ovos, que para a tartaruga da Amazônia é de extrema importância, pois são produzidos por estação reprodutiva, mais de 100 ovos em média (PEARSE e AVISE, 2001; VOGT, 2008).

Benefícios genéticos, segundo Jennions e Petrie (2000), favorecem a diversidade genética entre os filhotes, reduzindo a incompatibilidade genética entre machos e fêmeas da população, diminuindo assim o índice de endogamia, e aumentando a viabilidade da prole diante a um adversidade ambiental, melhorando o desempenho sob a seleção natural. Em populações reduzidas, devido as pressões ambientais, é importante que a variabilidade genética seja presente, para evitar a extinção da espécie (FRANKHAM et al., 2010).

Estudos sobre o tamanho efetivo populacional vêm sendo realizados devido a importância que há em descrever como pressões evolutivas afetam populações. A principal discussão é se o comportamento poligâmico das fêmeas em um tamanho efetivo populacional maior comparado ao monogâmico (KARL, 2001; LOTTERHOS,

2011). Karl (2001) propôs que o comportamento reprodutivo não é suficiente para beneficiar o tamanho efetivo da população, mas que outros fatores do sistema reprodutivo tivessem maior relevância. Lotterhos (2011) por sua vez, analisando grupos com comportamento monogâmico e poligâmico, evidenciou que fêmeas poliândricas obtiveram maior sucesso reprodutivo que fêmeas monogâmicas. Mostrando que o comportamento poliândrico tem efeito direto no sucesso reprodutivo das fêmeas.

Com isso, propõe-se que populações em risco de extinção podem ser favorecidas com o comportamento poliândrico, com o aumento da variabilidade genética e conseqüentemente, com o aumento efetivo da população. A população de tartaruga da Amazônia da RDSM foi considerada ecologicamente extinta, devido aos altos índices de predação nos séculos passados e aos baixos números atuais de fêmeas desovando, de quatro a doze fêmeas depositando seus ovos (FACHÍN-TERÁN et al., 2004; FACHÍN-TERÁN, 2005). A partir do final da década de 90, áreas de nidificação começaram a ser protegidas em diferentes praias da reserva pela população local, possibilitando o aumento do sucesso de eclosão dos ovos das tartarugas, porém o aumento do número de fêmeas de *P. expansa* desovando nas praias protegidas, só poderá ser observado após décadas das medidas tomadas para a conservação da espécie (FACHÍN-TERÁN, 2005; READER, 2003).

Podemos concluir com este estudo, que foi evidenciada paternidade múltipla em 100% dos ninhos analisados, onde, em condições semelhantes às populações mais abundantes, sinaliza a recuperação da população de tartaruga da Amazônia na RDSM. Tendo em vista que o comportamento reprodutivo poliândrico interfere diretamente na variabilidade genética da prole e no aumento de ovos férteis da população. Conhecer o padrão de comportamento reprodutivo de uma determinada espécie é de extrema importância, já que o mesmo influencia no perfil genético da população. Tal conhecimento contribui com as estratégias de manejo e conservação da espécie *P. expansa*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é parte do projeto Conservação de Vertebrados Aquáticos Amazônicos (Aquavert), desenvolvido pelo Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá e patrocinado pela Petrobras, por meio do Programa Petrobrás Ambiental. Com apoio das agências de fomento FAPEAM e CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCOCK, J. **Comportamento Animal – Uma abordagem evolutiva**. 9ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2011.

ALHO, C. J. R.; PÁDUA, L. F. M. Sincronia entre o regime de vazante do rio e o comportamento de nidificação da tartaruga da Amazônia *Podocnemis expansa* (Testudinata – Pelomedusidae). **Acta Amazônica**, 12 (2): 323-326, 1982.

ANDRADE, P. C. M.; DUARTE, J. A. M.; OLIVEIRA, P. H. G.; COSTA, P. M.; VICENTE, A.; BRELAZ, A.; ALMEIDA JÚNIOR, C. D.; RODRIGUES, W.; NASCIMENTO, J.; MEDEIROS, H. C.; NETO, L. M.; AZEVEDO, S. H.; PINTO, J. R. S. Áreas de reprodução de quelônios protegidas pelo RAN - Ibama/Amazonas e Ufam. In: ANDRADE, P. C. M. (Org.). **Criação e manejo de quelônios no Amazonas: Projeto Diagnóstico da Criação de Animais Silvestres no Estado do Amazonas**. 2. ed. Manaus: IBAMA, ProVárzea, 2008. cap. 3, p. 55 – 126.

ASHLEY, M. V., CABALLERO, I. C., CHAOVALITWONGSE, W., DASGUPTA, B., GOVINDAN, P., SHEIKH, S. I.; BERGER-WOLF, T. Y. Kinalyzer, a computer program for reconstructing sibling groups. **Molecular Ecology Resources**, 2009.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman e Hall, Inc., USA. p. 511 , 1994.

BERGER-WOLF, T.Y.; SHEIKH, S.I.; DASGUPTA, B. ASHLEY, M.V.; CABALLERO, I.C.; CHAOVALITWONGSE, W.; PUTREVU, S.L. Reconstructing Sibling Relationships in Wild Populations. **Bioinformatics**, 23 (13), 2007.

BOLLMER, J.; IRWIN, M.; RIEDER, J.; PARKER, P. Multiple paternity in loggerhead turtle clutches. **Copeia**, p. 475–478, 1999.

CHESSER, R. K.; BAKER, R. J. Effective sizes and dynamics of uniparentally and diparentally inherited genes. **Genetics**, v. 144, p. 1225-1235, 1996.

CRIM, J. L.; SPOTILA, L. D.; SPOTILA, J. R. The leatherback turtle, *Dermochelys coriacea*, exhibits both polyandry and polygyny. **Molecular Ecology**, 11, 2097–2106, 2002.

CURI, R. A.; LOPES, C. R. Teste de paternidade em bovinos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 21, 2001.

CURTIS, C.; WILLIAMS, C.; SPOTILA, J. Mating system of Caribbean leatherback turtles as indicated by analysis of microsatellite DNA from hatchlings and adult females. In: Proc 18th annual symposium on sea turtle biology and conservation (Compilers: Abreu-Grobois, F. A.; Briseno-Duenas, R.; Marques, R.; Sarti, L.). **NOAA Tech. Memo**. US Department of Commerce-SEFC-241, p. 155, 2000.

DAVIS, L. M.; GLENN, T. C.; ELSEY, R. M.; DESSAUER, H. C.; SAWYER, R. H. Multiple paternity and mating patterns in the American alligator, *Alligator mississippiensis*. **Molecular Ecology**, 10: 1011–1024, 2001.

DAVY, C. M.; EDWARDS, T.; LATHROP, A.; BRATTON, M.; HAGAN, M.; HENEN, B.; NAGY, K. A.; STONE, J.; HILLARD, L. S.; MURPHY, R. W. Polyandry and multiple paternities in the threatened Agassiz's desert tortoise, *Gopherus agassizii*. **Conserv Genet.**, v. 12, p. 1313-1322, 2011.

DEWOODY, J. A.; SCHUPP, J.; KENEFIC, L., BUSCH, J.; MURFITT, L.; KEIM, P. Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping. **Biotechniques**, v. 37, p. 348-352, 2004.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.

DUTTON, P.; BIXBY, E.; DAVIS, S. Tendency towards single paternity in leatherbacks detected with microsatellites. In: Proc 18th annual symposium on sea turtle biology and conservation (Compilers: Abreu-Grobois, F. A.; Briseno-Duenas, R.; Marques, R.; Sarti L.). **NOAA Tech. Memo**. US Department of Commerce-SEFC-241, p. 39, 2000.

EIZAGUIRRE, C.; LALOI, D.; MASSOT, M.; RICHARD, M.; FEDERICI, P.; CLOBERT J. Condition dependence of reproductive strategy and the benefits of polyandry in a viviparous lizard. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 274: 425–430, 2007.

EXCOFFIER, L.; LISCHER H.E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, 10: 564-567, 2010.

FACHÍN-TERÀN, A.; VOGT, R. C.; THORBJARNARSON, J. B. Estrutura populacional, razão sexual e abundância de *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemididae) na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. **Phyllomedusa**, 2 (1): 43-63, 2003.

FACHÍN-TERÀN, A.; VOGT, R. C.; THORBJARNARSON, J. B. Padrões de caça e uso de quelônios na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. **Manejo de Fauna Silvestre en Amazonía y Latinoamérica**. Asunción, Paraguay, 2000.

FANTIN, C. **Desenvolvimento de marcadores moleculares de microssatélites para o estudo do sistema reprodutivo em três espécies de tartarugas do gênero *Podocnemis***. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 99 p, 2008.

FANTIN, C., FARIAS, I. P., MONJELÓ, L. A. S., HRBEK, T. Polyandry in the red-headed river turtle *Podocnemis erythrocephala* (Testudines, Podocnemididae) in the Brazilian Amazon. **Genetics and Molecular Research**, 9 (1): 435-440, 2010.

FANTIN, C.; CARVALHO, C. F.; HRBEK, T.; Sites JR, J. W.; MONJELÓ, L. A. S.; ASTOLFI-FILHO, S.; FARIAS, I. P. Microsatellite DNA markers for *Podocnemis*

unifilis, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle. **Molecular Ecology Notes**, p 1235-1238, 2007.

FANTIN, C.; VIANA, L. S.; MONJELÓ, L. A. S.; FARIAS, I. P. Polyandry in *Podocnemis unifilis* (Pleurodira: Podocnemididae), the vulnerable yellow-spotted Amazon River turtle. **Amphibia-Reptilia**, 29: 479-486, 2008.

FERREIRA JÚNIOR, P. D. Efeitos de Fatores Ambientais na Reprodução de Tartarugas. **Acta Amazônica**, 39 (2): 319-334, 2009.

FERRI, V. 2002. **Turtles & Tortoises: A Firefly Guide**. Firefly Books. 256p.

FITZE, P. S.; LE GALLIARD, J. F.; FEDERICI, P.; RICHARD, M.; CLOBERT J. Conflict over multiple-partner mating between males and females of the polygynandrous common lizards. **Evolution**, 59: 2451–2459, 2005.

FITZSIMMONS, N. N. Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). **Mol Ecol.**, v. 7, p. 575–584, 1998.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, SP; SBG (Sociedade Brasileira de Genética), 2008.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge, 2nd ed., 2010.

GARNER, T. W. J.; LARSEN, K. W. Multiple paternity in the western terrestrial garter snake, *Thamnophis elegans*. **Canadian Journal of Zoology**, 83: 656–663, 2005.

HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNADA, T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 6465-6469, 1982.

HICKMAN, Jr.; CLEVELAND, P.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

HOEKERT, W. E. J.; NEUFEGLISE, H.; SCHOUTEN, A. D.; MENKEN, S. B. J. Multiple paternity and female-biased mutation at a microsatellite locus in the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). **Heredity**, v. 89, p. 107–113, 2002.

IRELAND, J. S.; BRODERICK, A. C.; GLEN, F.; GODLEY, B. J.; HAYS, G. C.; LEE, P. L. M.; SKIBINSKI, D. O. F. Multiple paternity assessed using micro-satellite marker, in green turtles *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) of Ascension Island, South Atlantic. **J Exp Mar Biol Ecol.**, v. 291, p. 149–160, 2003.

JENNION, M. D.; PETRIE, M. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. **Biol Rev Camb Philos Soc**, 75 (1): 21-64, 2000.

JENSEN, M. P.; ABREU-GROBOIS, F. A.; FRYDENBERG, J.; LOESCHCKE, V. Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. non-arribada olive ridley sea turtle rookeries. **Mol Ecol.**, v. 15, p. 2567–2575, 2006.

JONES, A. G. GERUD 2.0: A computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. **Molecular Ecology Notes**, in press, 2005.

KARL, S. A. The effect of multiple paternity on the genetically effective size of a population. **Molecular Ecology**, 17: 3973-3977, 2008.

KICHLER, K.; HOLDER, M. T.; DAVIS, S. K.; MARQUEZ, M. R.; OWENS, D. W. Detection of multiple paternity in Kemp's ridley sea turtle with limited sampling. **Mol Ecol.**, v. 8, p. 819–830, 1999.

LEE, P. L. M.; HAYS, G. C. Polyandry in a marine turtle: females make the best of a bad job. **Proc Natl AcadSci USA**, v. 101, p. 6530–6535, 2004.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Human Genet.**, v. 44, p. 397-401, 1989.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP). **Biociencia e Desenvolvimento**, nº 29, 2002.

LOTTERHOS, K.E. The context-dependent effect of multiple paternity on effective population size. **Evolution**, 65 (10): 3029, 2011.

MADSEN, T.; UJVARI, B.; OLSSON, M.; SHINE, R. Paternal alleles enhance female reproductive success in tropical pythons. **Molecular Ecology**, 14: 1783–1787, 2005.

McTAGGART, S. **Good genes or sexy sons? Testing the benefits of female mate choice in the painted turtle, *Chrysemys picta***. Dissertation, University of Guelph, 2000.

MOLINA, F. B. O comportamento reprodutivo de quelônios. **Biotemas**, v. 5, nº 2, p. 61-70, 1992.

MOORE, M. K.; BALL, R. M. Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. **Mol Ecol**, v. 11, p. 281–288, 2002.

MORRISON, S.; KEOGH, S.; SCOTT, A. Molecular determination of paternity in a natural population of the multiply mating polygynous lizard *Eulamprus heatwolei*. **Molecular Ecology**, 11, 535–545, 2002.

MURPHY, R. W.; BERRY, K. H.; EDWARDS, T.; McLUCKIE, A. M. A genetic assessment of the recovery units for the Mojave population of the desert tortoise, *Gopherus agassizii*. **Chelonian Conserv. Biol.**, v. 6, p. 229–251, 2007.

MYERS, E. M.; ZAMUDIO, K. R. Multiple paternity in an aggregate breeding amphibian: the effect of reproductive skew on estimates of male reproductive success. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1951-1963, 2004.

OLIVEIRA, D. P.; FARIAS, I. P.; MARIONI, B.; CAMPOS, Z.; HRBEK, T. Microsatellite markers for mating system and population analyses of the spectacled caiman *Caiman crocodilus* (Linnaeus 1758). **Conservations Genetics Resources**, 2: 181-184, 2010.

OOSTERHOUT, C. V.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, 4: 535–538, 2004.

OPPLIGER, A.; DEGEN, L.; BOUTEILLER-REUTER, C.; JOHN-ALDER, H. B. Promiscuity and high level of multiple paternity in commonwall lizards, *Podarcis muralis*: data from microsatellite markers. **Amphibia-Reptilia**, 28: 301–303, 2007.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. **Bioinformatics**, 28, 2537-2539, 2012.

PEARSE, D. E.; AVISE, J. C. Turtle Mating Systems: Behavior, Sperm Storage, and Genetic Paternity. **Journal of Heredity**, 92 (2): 206-211, 2001.

PEARSE, D. E.; DASTRUP, R. B.; HERNANDEZ, O.; SITES Jr, J. W. Paternity in an Orinoco Population of Endangered Arrau River Turtles, *Podocnemis expansa* (Pleurodira; Podocnemididae), from Venezuela. **Chelonian Conservation and Biology**, v.5, nº 2, p. 232-238, 2006.

PEARSE, D. E.; JANZEN, F. J., AVISE, J. C. Multiple paternity, sperm storage, and reproductive success of female and male painted turtles (*Chrysemys picta*) in nature. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 51, 164–171, 2002.

PEARSE, D. E.; JANZEN, F. J.; AVISE, J. C. Genetic markers substantiate long-term storage and utilization of sperm by female painted turtles. **Heredity**, v. 86, p. 378–384, 2001.

PEREIRA, D. I. M.; VIANA, M. N.; FARIAS, I. P.; VOGT, R. C.; FANTIN, C. Study of the Mating System of *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemididae) Using Microsatellite DNA Markers. In: **XL Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society**, Resumo, Fozdo Iguaçu: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011.

PERSE, D. E.; AVISE, J. C. Turtle Mating Systems: Behavior, Sperm Storage, and Genetic Paternity. **Journal of Heredity**, 92 (2): 206-211, 2001.

POUGH, F.H.; JANIS, C. M.; HEISER, J.B. **A Vida dos Vertebrados**. 4ª Edição. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

- QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R. Microsatellites and kinship. **Tree**, v. 8, p. 285-298, 1993.
- REFSNIDER, J. M. High frequency of multiple paternity in Blanding's turtle (*Emys blandingii*). **J Herpetol.**, v. 43, p. 74–81, 2009.
- RIEDER, J.; PARKER, P.; SPOTILA, J.; IRWIN, M. The mating system of the leatherback turtle: a molecular approach. In: Proc 16th symposium on sea turtle biology and conservation (Compilers: Byles, R.; Fernandez, Y.). **NOAA Tech. Memo.** US Department of Commerce-SEFC-241, p. 120. 1998.
- ROQUES, S.; DIAZ-PANIAGUA, C.; PORTHEAULT, A.; PEREZ-SANTIAGOSA, N.; HIDALGO-VILA, J. Sperm storage and low incidence of multiple paternity in the European pond turtle, *Emys orbicularis*: a secure but costly strategy? **Biological Conservation**, 129: 236-243, 2006.
- ROQUES, S.; DIAZ-PANIAGUA, C.; PORTHEAULT, A.; PEREZ-SANTIGOSA, N.; HIDALGO-VILA, J. Sperm storage and low incidence of multiple paternity in the European pond turtle, *Emys orbicularis*: a secure but costly strategy?. **Biol Conserv.**, v. 129, p. 236–243, 2006.
- RUEDA-ALMONACID, J.V.; CARR, J.L.; MITTERMEIER, R.A.; RODRIGUEZ-MAHECHA, J.V.; MAST, R. B.; VOGT, R. C.; RHODIN, A.G. J.; DE LA OSSA-VELÁSQUEZ, J.; RUEDA, J. N.; MITTERMEIER, C.G. Las tortugas y los crocodilianos de los países andinos del trópico. Serie de guías tropicales de campo, n° 6, **Conservacion Internacional**. Bogotá, D. C. Colômbia. 274pp., 2007.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, n° 2, p. 233-234, 2000.
- SITES, J. W.; FITZSIMMONS, N. N., JORGE DE LA SILVA, N., CANTARELLI, V. Conservation genetics of the giant Amazon river turtle (*Podocnemis expansa*; Pelomedusidae) - inferences from two classes of molecular markers. **Chelonian Conservation and Biology**, 3: 454–463, 1999.
- THEISSINGER, K.; FITZSIMMONS, N.; LIMPUS, C.; PARMENTER, C.; PHILLOTT, A. Mating system, multiple paternity and effective population size in the

endemic flatback turtle (*Natator depressus*) in Australia. **Conserv. Genet.**, v. 10, p. 329–346, 2009.

ULLER, T.; OLSSON, M. Multiple paternity in reptiles: patterns and processes. **Molecular Ecology**, 17 (11): 2566-2580, 2008.

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

VOGT, R. C. **Tartarugas da Amazônia**. 1ª Edição. Lima, Peru: Gráfica Biblos, 2008.

WEBER, J. L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. **Human Molecular Genetics**, v. 2, p. 1123-1128, 1993.

WENK, R. E.; GJERTSON, D. W.; CHIAFARI, F. A.; HOUTZ, T. The specific power of parentage exclusion in a child's blood relatives. **Transfusion**, 45: 440-444, 2005.

ZBINDEN, J. A.; LARGIADER, C. R.; LEIPPERT, F.; MARGARITOU LIS, D.; ARLETTAZ, R. High frequency of multiple paternity in the largest rookery of Mediterranean loggerhead sea turtles. **Mol Ecol.**, v. 16, p. 3703–3711, 2007.