

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

Em Convênio:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

**GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DE *Podocnemis
sextuberculata* (Testudines, Pelomedusidae, Cornalia
1849) UTILIZANDO A REGIÃO ND1 DO DNA
MITOCONDRIAL.**

Themis de Jesus da Silva

Orientador: Luiz Alberto dos Santos Monjeló

**MANAUS-AM
2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

Em Convênio:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

**GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DE *Podocnemis
sextuberculata* (Testudines, Pelomedusidae, Cornalia
1849) UTILIZANDO A REGIÃO ND1 DO DNA
MITOCONDRIAL.**

Themis de Jesus da Silva

Orientador: Luiz Alberto dos Santos Monjeló

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de mestre no curso de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal De São Carlos.

**MANAUS-AM
2002**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S586gc

Silva, Themis de Jesus da.

Genética da conservação de *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Pelomedusidae, Cornalia 1849) utilizando a região ND1 do DNA mitocondrial / Themis de Jesus da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2002.

52 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2002.

1. Genética de populações. 2. DNA mitocondrial. 3. Quelônio. 4. *Podocnemis sextuberculata*. I. Título.

CDD: 575.15 (20^a)

**Aos meus amados pais, que estão
sempre me incentivando e que
fizeram de tudo para que este se
tornasse realidade.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a **DEUS**, que sempre foi e sempre será meu **REFÚGIO e FORTALEZA**.

Agradeço ao Prof. D^f Luiz Alberto dos Santos Monjeló, pela orientação, incentivo e apoio principalmente na hora das análises.

Agradeço ao Prof^a D^{ra} Izeni Pires Farias, pela enorme colaboração, pelo estímulo e principalmente pelo aprendizado.

Agradeço aos Profs. D^f Spartaco Astolfi Filho, José Odair Pereira pelo apoio e pelo conhecimento adquirido.

As minhas amigas e companheiras de todas as horas Rozana, Neves, Doriane, Nívia e Josy (que mesmo em Fortaleza sempre esteve muito perto), pelo carinho, amizade e principalmente pelo apoio.

Aos amigos do Laboratório de Genética Pedro, Odinéia, Karla, Lucivana, Luciana, Daniel pela amizade, incentivo e ajuda nas horas difíceis.

Aos colegas de turma Otávia e Isabel, pelo carinho e ajuda.

Ao meu companheiro Emerson que esteve comigo desde começo deste trabalho, nas horas boas e difíceis, pelo apoio, carinho, amizade e muita paciência.

Aos colegas e técnicos do Laboratório de Genética da Universidade do Amazonas que ajudaram para que esse se concretizasse.

Aos colegas do Projeto Diagnóstico de Criação de Animais Silvestres, pelo auxílio com as amostras.

Agradeço aos meus amados pais, Mauricio e Janice que sempre estiveram comigo me incentivando e que sempre acreditaram em mais essa vitória.

A minha irmã pelo carinho e ajuda na fase final deste trabalho.

Aos meus avôs Oswaldino e Izaura, pelo carinho e amizade.

A todos que contribuíram para que este fosse realizado.

"Nunca ande pelo caminho
traçado, pois, ele conduz
somente até onde os outros
já foram".

Alexandre G. Bell

RESUMO

Os quelônios em geral são importantes na economia de populações tradicionais da região amazônica por serem muito apreciados na culinária local, e pela utilização de seus subprodutos como ovos e gordura, na fabricação de cosméticos e adornos, sendo seu comércio uma alternativa financeira para esta região. No Brasil o gênero *Podocnemis* está representado por quatro espécies, entre elas a espécie *Podocnemis sextuberculata* conhecida vulgarmente como iaçá, pitiú, e cambéua. Pode ser encontrada nos rios Solimões, Amazonas, e Branco. Este trabalho teve como objetivos principais caracterizar a variabilidade e a estrutura genética de três populações de iaçá, coletadas na Reserva Federal de Abufari (AM), Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (AM), e na Comunidade de Terra Santa (PA). Foi utilizado como marcador genético nesse estudo uma seqüência parcial do gene mitocondrial ND1 com um total de 415 pares de bases. A análise constituiu-se de 64 indivíduos, sendo 29 de Abufari, 11 de Mamirauá e 24 de Terra Santa. Observou-se, um total de dez haplótipos, seis na população de Abufari, três na população de Mamirauá e quatro na população de Terra Santa. Houve a predominância de um haplótipo comum, haplótipos raros e vários “singletons”. A taxa média de sítios polimórficos foi 0,058. A taxa de sítios polimórficos por população foi: 0,019 em Abufari, 0,022 em Mamirauá e 0.019 em Terra Santa. Estes dados sugerem que as três populações possuem o mesmo grau de variabilidade genética. Não existe diferenciação genética entre as três populações analisadas ($F_{ST} = 0,023$ $p < 0.05$) e o fluxo gênico é alto ($Nm=20,65$). Os resultados são compatíveis com os estudos ecológicos sobre esta espécie. Os iaçás possuem grande capacidade migratória e a pressão de caça parece ainda não ter afetado sua estrutura populacional. O monitoramento genético dessas populações naturais na região Amazônica torna-se, portanto de grande relevância como suporte para projetos de manejo e conservação específicos para cada espécie de quelônios.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01 - Esquema gráfico do DNA mitocondrial de <i>Pelomedusa subrufa</i> (Testudines; Pelomedusidae), copiado do genbank.....	15
Figura 02 - Eletroforese em gel de agarose da amplificação de uma região do gene mitocondrial ND1	24
Figura 03 - Eletroforese em gel de agarose 1% da purificação de 1 a 29 indivíduos da população de Abufari, 30 a 34 indivíduos da população de Tefé.....	25
Tabela 01 - Porcentagem de bases nucleotídicas encontradas em cada população.....	26
Figura 04 - Porcentagem média da frequência de bases nucleotídicas encontradas nas três populações.....	27
Tabela 02 - Frequência relativa de Haplótipos nas três populações.....	28
Figura 05 - Representação gráfica dos haplótipos encontrados nas três populações.....	29
Tabela 03 - Fluxo gênico entre as três populações	31
Tabela 04 - Resultados da análise variância Molecular(AMOVA). <i>V_b</i> - variação em cada população; <i>V_c</i> – variância em cada população.....	32
Tabela 05 - Tabelas Geral de Dados.	32

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1 Quelônios.....	04
2.2 Família Pelomedusidae.....	04
2.3 Gênero <i>Podocnemis</i>	05
2.4 <i>Podocnemis sextuberculata</i>	06
2.5 Variabilidade Genética	07
2.6 Técnicas para Análise da Variabilidade Genética.....	08
2.6.1 Marcadores Moleculares	09
2.7. DNA Mitocondrial (mtDNA)	10
2.7.1 DNA Mitocondrial em Quelônios	13
2.8 Métodos Utilizados na Análise Genética	15
2.8.1 Proporção de Locos Polimórficos	15
2.8.2 Diversidade Genética	15
3. OBJETIVO.....	18
3.1. Objetivo geral	18
3.2 Objetivo Específico	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Local de Coleta	19
4.2 Extração do DNA	19
4.3 Quantificação do DNA total	21
4.4 Amplificação do Gene mitocondrial	21
4.5 Purificação das Amostras	23
4.6 Seqüenciamento de DNA	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Extração e amplificação da região ND1	24
5.2 Purificação e Seqüenciamento do gene mitocondrial ND1	25
5.3 Variabilidade Nucleotídica	25
5.4 Distribuição e análise dos haplótipos	27
5.5 Análises de polimorfismo de DNA	30
5.6 Análise de Variância Molecular (AMOVA)	31
6. CONCLUSÃO	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	47

1. INTRODUÇÃO

A ordem Chelonia caracteriza-se por répteis terrestres, marinhos e de água doce, cujos corpos são envolvidos por duas conchas ósseas, uma carapaça dorsal e um plastrão ventral, que estão ligados lateralmente; dentes ausentes; mandíbulas desenvolvidas, assumindo a forma de um bico córneo; língua não extensível; pálpebras presentes; pescoço geralmente retrátil e com oito vértebras cervicais. Membros basicamente pendáctilos, vivem em regiões tropicais e temperadas (ORR, 1986). Atualmente a ordem é constituída de doze famílias e cerca de 285 espécies. Nesta ordem encontra-se a família Pelomedusidae (Podocnemidae), constituída de oito espécies que habitam o norte da América do Sul e a ilha de Madagascar. Cinco destas espécies vivem na Amazônia brasileira, todas pertencendo ao gênero *Podocnemis*. Pertencem a esta família quelônios caracterizados pelo pescoço lateralmente retrátil com especializações vertebrais associadas, 13 escudos plastrais, pélvis fundida tanto a carapaça como o plastrão, possui uma forma ovalada e achatada. (PRITCHARD & TREBAU, 1984). A coloração cinza da carapaça e o peito amarelo-marfim ou amarronzado com manchas escuras também caracterizam esta família. Existem registros fósseis desta família do período Cretáceo; dentre os quais está a espécie da grande tartaruga *Stupendemys geographicus* que media 2,3 metros de comprimento (WOOD, 1976).

O gênero *Podocnemis* caracteriza-se pela presença de sete ossos neurais adjacentes. A carapaça é oval ligeiramente achatada em forma de cúpula. O plastrão é rígido sem dobradiça apresentando uma escavação longitudinal junto à

fonte. O crânio é alongado e em alguns casos mais largos (PRITCHARD, 1979; PRITCHARD & TREBBAU 1984; ERNST & BARBOUR, 1989).

Os quelônios em geral são importantes na economia para os moradores ribeirinhos da Amazônia, por serem muito apreciados na culinária local. O hábito de consumir produtos oriundos de quelônios sempre esteve arraigado à tradicional culinária amazonense. Embora ilegal, a venda de quelônios capturados na natureza ainda é extremamente elevada no Estado do Amazonas. Isto não é devido exclusivamente ao hábito local de consumir estes animais, mas também devido à ineficiência da fiscalização pelos órgãos competentes (PÁDUA & ALHO, 1982; SEBRAE, 1995).

O manejo de diversas espécies ameaçadas é baseado em um conhecimento incompleto da dinâmica populacional. Faltam informações demográficas específicas, principalmente em relação ao manejo de organismo de vida longa, como os quelônios (PEZZUTI, 1998).

O desenvolvimento das técnicas moleculares utilizando o DNA possibilitou o estudo direto do material genético e, conseqüentemente, uma avaliação mais segura do grau de variabilidade genética (FAIRBANKS *et al.*, 1993). Na última década, o uso de classes de marcadores moleculares dirigidas para fluxo gênico e estrutura populacional tem sido difundido principalmente por técnicas que permitem avaliação de múltiplos loci gênicos.(AVISE, 1994; FERRARIS & PALUMBI, 1996; HILLIS *et al.*, 1996). SITES *et al.*, em 1999 analisaram os padrões da variabilidade genética em *Podocnemis expansa* (tartaruga da Amazônia) e encontraram um extenso fluxo gênico intra-bacia fluvial, mas pouco entre bacias.

Analisando o DNA mitocondrial de populações da espécie *Caretta caretta* do Mediterrâneo e do Atlântico, ENCANDALA *et al.*, (1998) encontraram duas linhagens filogenéticas distintas separadas por uma proporção de 5,1% de divergência na seqüência.

Com a conservação e o monitoramento da espécie, será possível realizar a preservação da biodiversidade, e ainda, garantir a manutenção de um alimento importante para o homem amazônico, devido a sua elevada fonte de proteína (VOGT *et al.*, 1994).

O conhecimento dos padrões de variabilidade e de estrutura genética das populações de quelônios de diferentes regiões, aliado a dados de ecologia, fisiologia, nutrição e reprodução permitirão a elaboração de: manejo, conservação e de criação em cativeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Quelônios

São encontrados nos mais variados locais e considerados os mais antigos répteis existentes, seu tamanho varia de acordo com a espécie. A maturidade sexual nos machos ocorre entre os 4 e 12 anos e aos 7 anos e nas fêmeas entre 8 e 25 anos. São os únicos répteis que possuem carapaça que em alguns casos é utilizada como defesa. A maioria dos quelônios terrestre é herbívora e apresenta carapaça alta no formato de uma cúpula. As espécies marinhas possuem um formato mais achatado e sua alimentação é mista. Sua audição e visão são muito desenvolvidas (IBAMA, 1989).

São vertebrados peilotérmicos, com crânio bem ossificado, pele seca e recoberta por escamas epidérmicas (ORR, 1986).

Duas famílias destacam-se no Estado do Amazonas, sendo de grande importância na economia devido ao grande interesse por sua carne pelos moradores locais: Testudinidae e a Pelomedusidae (CORRÊA, 1978).

Mesmo tendo sua caça e comercialização proibida os quelônios da Amazônia ainda são consumidos em grande número pela população da região.

2.2 Família Pelomedusidae

A Pelomedusidae é a família que inclui as espécies de maior importância no comércio e na subsistência local (SMITH, 1979). São chamados de “tartaruga de corpo escondido”. Caracterizam-se por apresentar o pescoço lateralmente retrátil, com especializações vertebrais associadas, 13 escudos plastrais, pélvis

fundida tanto a carapaça como o plastrão, possui uma forma ovalada e achatada (PRITCHARD & TREBBAU, 1984).

2.3 Gênero *Podocnemis*

Caracteriza-se pela presença de sete ossos neurais adjacentes, a carapaça é oval achatada ligeiramente em forma de cúpula. O plastrão é rígido, sem dobradiça. O crânio é alongado e, em alguns casos, mais largo (PRITCHARD, 1979; PRITCHARD & TREBBAU 1984; ERNEST & BARBOUR, 1989). A origem do gênero data de antes do Cretáceo, há cerca de 158 milhões de anos, foram encontrados fósseis na Europa, África e América do Sul (PRITCHARD, 1979).

Na América do Sul encontramos seis espécies: *Podocnemis expansa*, *P. erythrocephala*, *P. vogli*, *P. lewyana*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata* (PRITCHARD & TREBBAU, 1984). No Brasil este gênero é representado pelas espécies *Podocnemis expansa*, *P. erythrocephala*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata* (Figura 01). A tartaruga (*P. expansa*) é a mais conhecida espécie do gênero *Podocnemis* encontrada no Brasil, é um animal largamente distribuído pela Bacia Amazônica e Bacia do Orinoco, ocorrendo nos rios da Colômbia, Venezuela, Guiana, leste do Equador, nordeste do Peru e norte da Bolívia e Brasil, chegando a alcançar a região Central brasileira. É o maior quelônio de água doce da América do Sul, ultrapassando 80cm de comprimento por 60cm de largura, chegando a pesar mais de 69kg (FERREIRA LUZ, 1994b). Algumas espécies deste gênero alcançam níveis protéicos de 94%, podendo competir com vantagem com a maioria das criações tradicionais. (FERREIRA LUZ, 1994a).

Os aspectos biológicos e reprodutivos do gênero *Podocnemis* vêm sendo bastante estudados; como a migração sazonal de *P.sex tuberculata* onde foi encontrado um deslocamento de mais de 100Km (ALHO & PÁDUA, 1982).



Figura 01: Exemplos de *Podocnemis unifilis* (esquerda) e *Podocnemis sextuberculata* (direita). Foto Rafael Bernhard.

2.4 *Podocnemis sextuberculata*

Conhecida como iacá, pitú e cambéua, esta espécie pode ser encontrada nos Rios Solimões, Amazonas e Branco, já foram observado exemplares também no Rio Trombetas e Tapajós (IBAMA,1989). É uma espécie muito apreciada na alimentação dos moradores da região Amazônica, e devido aos problemas de conservação (IUCN, 1996), é importante conhecer aspectos de sua história natural tais como alimentação, crescimento, estrutura populacional e outros aspectos da ecologia desta espécie (FACHÍN, 1999).

A fêmea possui manchas amarelas com dois barbelos embaixo da boca. A carapaça tem coloração marrom-clara a marrom-escura. Nos indivíduos jovens o plastrão apresenta seis pontas (tubérculos) salientes de cor cinza ou marrom, o que lhe confere o nome *P. sextuberculata*. A postura média é de 25 a 20 ovos de casca mole. O macho é menor que a fêmea (IBAMA,1989).

FACHÍN (1999), estudando indivíduos de *P. sextuberculata* da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, verificou que o item predominante na alimentação da espécie foi de matéria vegetal, tendo como principal componente às sementes que apresentaram uma frequência de 86,81%. Também foram encontrados em quantidades mínimas insetos e restos de peixes como escamas e nadadeiras.

O entendimento dos padrões de movimento em *P. sextuberculata* e a identificação das áreas de alimentação e reprodução são de vital importância para os programas de conservação e manejo da espécie (FACHÍN, 1999).

2.5 Variabilidade Genética

Para que haja evolução adaptativa é fundamental a existência da variação genética, devido à atuação da seleção natural sobre estas variações. Segundo CHETVERIKOV (1926), a análise genética de populações naturais é importante para revelar a quantidade de variabilidade genética potencial desta população.

Um dos parâmetros populacionais para caracterizar variabilidade genética é a proporção de locus polimórficos. Polimorfismo genético foi pela primeira vez definido como a ocorrência de duas ou mais formas descontínuas em

uma população, em que a menos freqüente não seja explicada por mutações recorrentes.

Segundo TORGGLER *et. al.*(1995), um alelo é polimórfico quando um gene ocorre com freqüência acima de 0,05 em uma população onde existem para o respectivo loco dois ou mais alelos. Um gene monomórfico ocorre em freqüência acima de 0,95 e os demais genes desta população são nesse caso considerados variantes. Estas estimativas de freqüências alélicas ou de haplótipos são empregadas em estudos populacionais.

A variabilidade genética é o princípio básico para estudos genéticos e de melhoramento, permitindo selecionar e estudar a herança de caracteres (MEDEIROS-GALVÃO, 1998). Esta variabilidade, até meados da década de 60 era observada somente para genes de caracteres morfológicos, geralmente de fácil identificação visual, limitando deste modo o número de marcadores a serem utilizados. Estes caracteres fenotípicos foram superados pela avaliação direta do genótipo utilizando marcadores genéticos. Esta avaliação direta do genótipo detecta a ocorrência natural de polimorfismo na seqüência de nucleotídeos do DNA. (BARBOSA, 1997).

O polimorfismo é usualmente observado como presença ou ausência de bandas (produtos amplificados) a partir de um único locus. Uma destas técnicas utilizadas para análise do polimorfismo é chamada PCR (Reação em Cadeia da DNA Polimerase), concebida na década de 80 e utilizada em diversas áreas aplicadas e no entendimento de processos biológicos (MULLIS & FALOONA, 1987). A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, a tornam

particularmente poderosa para estudos genéticos moleculares, envolvendo grande número de organismos. (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

2. 6 Técnicas para Análise da Variabilidade Genética

2.6.1 Marcadores Moleculares

Com o aparecimento das técnicas de biologia molecular, surgiram vários métodos de detecção de polimorfismo genético ao nível de DNA, permitindo assim um número quase que ilimitado de marcadores. Estes são mais vantajosos para a caracterização tanto de populações como de isolados.

Marcadores moleculares são utilizados na definição de populações viáveis, na caracterização de populações locais ou raças, na identificação da estrutura populacional bem como na definição de espécies e subespécies. BOWEN *et al.* (1991) utilizando DNA mitocondrial compararam duas espécies *Lepidochelys kempi* e *Lepidochelys olivacea*.

TEIXEIRA, *et al.* (1996) usando marcadores moleculares isoenzimáticos analisaram o polimorfismo de transferrina em 5 populações de *P. expansa* coletadas de cinco áreas geográficas da região amazônica, observaram que este locus mostrou-se polimórfico, apresentando três genótipos ($Tf^a Tf^a$, $Tf^a Tf^b$, $Tf^b Tf^b$) possivelmente codificados por dois alelos co-dominantes (Tf^a e Tf^b).

Na classe de marcadores moleculares envolvendo seqüências repetitivas enquadram-se as seqüências hipervariáveis denominadas VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”), ou seqüências adjacentes que se repetem em número variável (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Os VNTR mais

conhecidos são sem dúvida, as seqüências genômicas formadas por repetições de mono-, di-, tri- ou tetra-nucleotídeos organizados em múltiplas cópias enfileiradas,

Na última década, o uso de classes de marcadores moleculares com o objetivo de estimar o fluxo gênico e do grau de diferenciação populacional tem sido difundido principalmente por técnicas que permitem a análise de múltiplos loci gênicos e muitos alelos por loco (AVISE, 1994; FERRARIS & PALUMBI, 1996; HILLIS *et al.*, 1996).

2.7. DNA Mitocondrial (mtDNA)

As mitocôndrias são organelas pequenas com formato oval cercada de duas membranas altamente especializadas. É o local onde acontece a respiração aeróbica, é geralmente o maior centro produtor de energia em eucariontes, sua possível origem data de cerca de dois bilhões de anos a partir de uma bactéria aeróbica de vida livre (MARGULIS, 1970; YANG *et al.*, 1985). O fato da mitocôndria possuir seu próprio DNA, ribossomos e RNAs de transferências apóia a teoria da origem endossimbiótica. Esta teoria supõe que os primeiros organismos capazes do metabolismo aeróbico, incluindo a produção de ATP ligada a respiração, fossem procariotos. Os eucariotos primitivos que viviam anaerobicamente (por fermentação) adquiriram a habilidade de realizar a fosforilação oxidativa quando estabeleceram uma relação simbiótica com bactérias que viviam no citosol (LEHNINGER *et al.*, 1995).

O genoma mitocondrial nos animais é uma molécula de DNA circular, fita dupla pequena e com múltiplas cópias na mitocôndria (BROWN, 1981; 1985; MORITZ *et al.* 1987). Possui 13 genes codificadores de proteína que são 90% do

genoma, 22 RNAs de transferência (tRNAs), 2 RNAs ribossômicos e uma região não codificadora chamada região controle ou alça D (*D-loop*) (AVISE, *et. al.*, 1986). Seu tamanho pode variar de 6Kb a 2000Kb. Em vertebrados parece ter uma organização gênica extremamente conservada em grupos taxonômicos distintos como em mamíferos e alguns peixes, diferente de grupos de aves, alguns répteis e marsupiais que apresentam variação quanto ao número de genes e na sua organização. É uma molécula de fita dupla que codifica aproximadamente 5% de toda a maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria. Toda sua seqüência de nucleotídeos possui função codificadora, sendo raras as regiões espaçadoras e os introns (MATIOLI, 2001).

No mtDNA humano as seqüências se dispõem diretamente uma após as outras. Há pouco espaço disponível para seqüências reguladoras de DNA, todos os nucleotídeos parecem fazer parte de seqüências codificadoras, de proteínas, RNAs ribossômicos ou transportadores e possui código genético diferente onde quatro dos 64 códons possuem “significado” diferente daqueles mesmos códons de outros genomas (ALBERTS *et. al.*, 1997).

A vantagem das técnicas que utilizam DNA mitocondrial sobre o método tradicional RFLP é que não se utilizam substâncias radioativas e pode ser aplicada em quantidades mínimas de tecidos de qualidade variada (NORMAN *et al.*, 1994). O DNA mitocondrial tem sido utilizado como ferramenta para estudos evolutivos, devido à sua facilidade de ser isolado e manipulado em laboratório, seu alto número de cópias e conformação super hélice que permite a separação do DNA nuclear (QUINN, 1997). Outras características que tornam essa molécula muito interessante para estudos populacionais e evolutivos são: sua herança

citoplasmática, isto é, ser herdada via materna, não seguindo os padrões mendelianos e não sofrendo recombinação e sua alta taxa de evolução (mutação), acredita-se que seja dez vezes superior à de um gene cópia única nuclear (MATIOLI, 2001). Esta alta taxa pode ser devido a uma baixa eficiência do sistema de reparo, exposição a radicais de oxigênio na cadeia respiratória, que tem efeito mutagênico, o que não acontece com o DNA nuclear por ser protegido pelas histonas (CANN *et. al.*, 1984; LI, 1997). Segundo MATIOLI (2001), o oxigênio produzido pelo metabolismo é altamente reativo e pode provocar danos no DNA, essa hipótese é aceita para o mtDNA, pois cerca de 95% do oxigênio molecular metabolizado é processado nas mitocôndrias. Esse fato poderia explicar a grande taxa de substituição de nucleotídeos no mtDNA, se comparado ao nuclear.

A análise do mtDNA tem fornecido informações relevantes em estudos de estrutura populacional de espécies, biogeografia, dispersão, fluxo gênico e colonização. Utilizando a região controle do mtDNA de três pontos ao longo do eixo Estuário-Amazonas-Solimões (EAS) de uma espécie de bagre (*Brachyplatystoma flavicans*) BATISTAS (2001), não encontrou uma correlação da variabilidade genética com a distribuição geográfica, o que sugere a existência de uma única população migradora no eixo (EAS).

O gene mitocondrial ND1 codifica a coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo que atua como transportadores de átomos de hidrogênio e de elétrons em algumas reações de oxido-redução (LEHNINGER *et. al.*, 1995). O complexo NADH desidrogenase (ND1 a ND6) é o maior complexo enzimático respiratório, com uma massa de cerca de 800.000 dáltons e mais de 22 cadeias polipeptídica (ALBERTS *et. al.*, 1997).

Segundo MATIOLI (2001), alguns genes acumulam mais rapidamente substituições de bases dentre os quais podemos citar, os genes codificadores das subunidades NADH desidrogenase, citocromo *c* oxidase e RNAs transportadores .

2.7.1 DNA Mitocondrial em Quelônios

NORMAN *et al.*, (1994) estudando quatro gêneros de tartarugas marinhas, com um grupo de iniciadores TCR (TCR1 – TCR6), específicos para amplificar a região controle do DNA mitocondrial, conseguiram seqüenciar um total de 650 pb (pares de base). Os primers TCR3 e TCR4, revelaram substituições em várias posições principalmente no segmento 114 a 500pb do gene tRNA^{Pro} , todas as 41 substituições encontradas foram transições (A – G, 55%; T – C, 45%) e houve uma simples inserção.

Em tartarugas marinhas (*Chelonia mydas*), utilizando polimorfismo no DNA mitocondrial (mtDNA) foi analisada a variabilidade intrapopulacional e o possível retorno de fêmeas a sua área de origem (BOWEN *et al.*, 1992; ALLARD *et al.*, 1994) *Eretmochelys imbrica* (BRODERICK *et al.*, 1994; BASS *et al.* 1996) e *Caretta caretta* (BOWEN *et al.* 1993). Estes estudos encontraram vários níveis de subdivisão populacional entre as espécies e diversidade no grau de similaridade entre as fêmeas com comportamento de retornar ao seu local de origem.

Para analisar populações de tartarugas da espécie *Caretta caretta* do Mediterrâneo e do Atlântico, ENCALADA *et al.* (1998), seqüenciaram 380pb (pares de base) da região controle do mtDNA. Com este trabalho foi definida a composição demográfica genética de “loggerhead” (tartaruga cabeçuda) do sistema Atlântico-Mediterrâneo.

Estudando a região controle do DNA mitocondrial da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) de dois sistemas de rios da região SITES *et al.*, (1999) sugeriram uma recente colonização da área estudada e um recente fluxo gênico. Verificaram também alta taxa de migração e conseqüentemente a baixa taxa de diferenciação populacional dentro de uma mesma bacia hidrográfica e a alta divergência entre populações de diferentes bacias.

SERB *et. al.*(2001) determinaram a relação filogenética entre populações de *Kinosternon flavescens* com a obtenção da seqüência completa de nucleotídeos da região controle do DNA mitocondrial, um total de 1158bp, estas exibiram 224 sítios variáveis, 113 dos quais são filogeneticamente informativos, foi encontrada uma baixa diversidade entre populações que pode ser explicada pela história da espécie, e uma baixa diversidade nucleotídica. As análises revelaram uma seqüência polifiléticas com três clades diferentes.

PARHAM *et. al.*, (2001) estudando espécies de *Geomydidae*, obtiveram do conjunto de dados dos genes ND4 e COI do mtDNA 1535pb. Deste, 288 foram filogeneticamente informativos, ocorrendo uma grande variação dentro das várias espécies estudadas. Os dados sugerem uma hipótese de que os espécimes resultaram de múltiplos e recentes eventos de hibridização.

2.8 Métodos Utilizados na Análise Genética

2.8.1 Diversidade Genética

A diversidade genética pode ser estimada por algumas medidas como: proporção de locos polimórficos, grau de heterozigose, coeficiente F de Wright e fluxo gênico (Nm).

2.8.1.2 Proporção de Locus Polimórficos

Uma medida da variação genética pode ser obtida através da proporção de locos polimórficos. TORGGLER *et. al.* (1995) definiu um alelo polimórfico quando um gene ocorre com frequência acima de 0,05, em uma população onde existem para o respectivo loco dois ou mais alelos. Estas estimativas de frequências alélicas ou de haplótipos são empregados em estudos populacionais.

2.8.2.2 Grau de heterozigose

O número de heterozigotos consiste em uma das medidas mais informativas da variação genética em populações mendelianas (AYALA *et al.*, 1977). A estimativa do grau de heterozigose pode gerar informações sobre a estrutura genética das populações e suas subdivisões.

Segundo WEIR (1984), a diversidade genética pode ser estimada pela soma dos quadrados das frequências alélicas, que é apropriada para populações consanguíneas, onde existem poucos heterozigotos e muitos homozigotos.

A redução do número de heterozigotos deve-se em parte a subdivisões das populações, promovendo o Efeito de Wahlund. Em 1931, WRIGHT identificou três níveis de heterozigose em populações subdivididas: H_i , heterozigose de um indivíduo na subpopulação; H_s , a heterozigose esperada de um indivíduo nessa subpopulação se apresentasse cruzamento ao acaso; H_t , a heterozigose de um indivíduo na população total com cruzamento ao acaso.

2.8.2.3 Os coeficientes F de Wright

Wright elaborou uma estatística conhecida como F de Wright que também pode ser estimada em diferentes níveis. Para caracterizar o grau de diferenciação genética entre subpopulações foi definido um índice chamado índice de fixação F_{st} , este é igual à redução do número de heterozigotos esperados em um cruzamento ao acaso, devido a subdivisão (HARTL & CLARCK, 1997). O índice de fixação chamado F_{st} é estimado na equação :

$$F_{st} = Ht - Hs/Ht$$

Para interpretar os resultados de F_{st} Wright sugeriu: que entre 0 a 0,05 pode indicar pouca ou baixa diferenciação genética; entre 0,05 a 0,15 indica diferenciação genética moderada; entre 0,15 a 0,25 indica grande diferenciação genética acima de 0,25 muito alta diferenciação. Os coeficientes F de Wright entretanto tem sido interpretados para outras situações como na utilização de marcadores de genomas haplóides, como uma outra estimativa de correlação entre haplótipos e gametas. No caso do mtDNA esse índice indica a correlação entre os haplótipos.

2.8.2.4 Fluxo Gênico

O F-estatístico de Wright para populações haplóide pode ser entendido como; um conjunto de medidas hierárquicas de correlações de alelos dentro de indivíduos e dentro de populações, o mais relevante para o estudo do fluxo gênico

(Nm, número de migrantes que uma população recebe por geração) é o F_{st} pois estes são inversamente proporcionais, como mostra a fórmula:

$$F_{st} = 1/(4Nm+1),$$

onde N é o tamanho efetivo de cada população e m é a velocidade de migração entre as populações. (WHITLOCK & MCCAULEY, 1999).

2.9 Relações Filogenéticas

A caracterização das relações filogenéticas utilizando mtDNA pode ser realizada utilizando vários programas como: PAUP 4.0 (SWOFFORD, 1999), COLAPSE 1.1 DnaSP 3.0 (ROZAS E ROZAS, 1999) e o programa ARLEQUIN 2.0 (SCHNEIDER *et al.*, 2000) que pode estimar a variância molecular (AMOVA) e o índice de fixação (F_{ST}).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral:

Caracterizar a variabilidade e a estrutura genética de populações naturais de *Podocnemis sextuberculata* oriundas de três bacias hidrográficas da região amazônica, utilizando a região codificadora ND 1 do DNA mitocondrial, visando dar suporte a programas de conservação e criação em cativeiro dessa espécie.

3.2 Objetivo Específico:

- Estimar grau de polimorfismo;
- Estimar grau de heterozigose;
- Determinar se os haplótipos encontrados estão associados com a distribuição geográfica desta espécie;
- Determinar através variabilidade genética a existência de populações estruturadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Coleta

As coletas foram realizadas na Reserva Biológica Federal do Abufari (Fig.:01), município de Tapauá, no Estado do Amazonas, situada a 5° 25' de latitude Sul e 62° 59' de longitude à Oeste do Meridiano de Greenwich.; Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, município de Tefé, no Estado do Amazonas e Comunidade de Terra Santa, no Estado do Pará (Figura 02). Foram coletados 50µl de sangue de cada indivíduo através de punção da veia femoral, com seringa hipodérmica contendo tampão NE como anticoagulante, sendo colocadas em seguida em eppendorfs com 1ml tampão de NE e processada a extração.

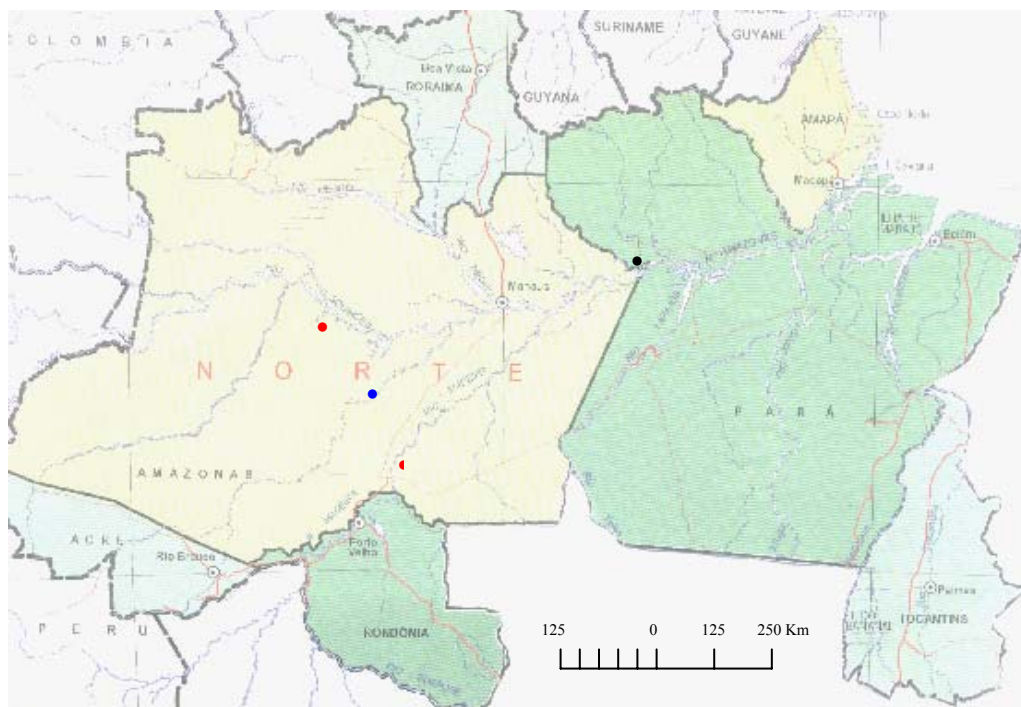


Figura 02: Localização das áreas de coleta (● - Município de Tefé, ● - Município de Tapauá, ● - Comunidade de Terra Santa).

4.2 Extração do DNA

Foram utilizados para a extração de DNA, 20 indivíduos da Reserva de Mamirauá, 28 da Comunidade de Terra Santa e 35 de Abufari. O método utilizado para a extração foi Fenol/Clorofórmio seguindo o protocolo de SAMBROOK *et al.*, 1989 com algumas modificações:

- 1 - Após a coleta de sangue, em seringa embebida em solução NE;
- 2 - Adicionar 1 ml de tampão NE em tubo eppendorf grande, prosseguindo imediatamente;
- 3 - Centrifugar as amostras a 2000g por 5 minutos;
- 4 - Retirar o sobrenadante, lavando o sedimento ressuspensando-o, repetindo as etapas 2, 3 e 4 mais duas vezes;
- 5 - Acrescentar 500 µl de solução TEN 1 ressuspensando as células;
- 6 - Adicionar 60 µl de Triton 100X;
- 7 - Adicionar 6 µl de RNase A;
- 8 - Homogeneizar as amostras por cinco minutos;
- 9 - Incubar à 37°C por 30 min;
- 10 - Adicionar 60 µl de SDS 10%;
- 11 - Adicionar 5µl de proteinase K;
- 12 - Incubar à 50°C por 60 min.;
- 13 - Extrair com fenol (1V), agitando por 10 min;
- 14 - Centrifugar a 2000g por 10 min.;
- 15 - Coletar o sobrenadante (fase aquosa);
- 16 - Extrair com clorofane (1V) recuperando a fase aquosa (repetir as etapas 14 e 15);
- 17 - Extrair com clorofórmio (1V) recuperando a fase aquosa (repetir as etapas 14 e 15);
- 18 - Adicionar ao sobrenadante 0,1 V de NaCl 3M e 2 V de etanol 100% (-20°C), misturando bem;
- 19 - Precipitar a 0°C por 30min.;
- 20 - Centrifugar a 12000g por 10 min.;
- 21 - Descartar o sobrenadante;
- 22 - Lavar o sedimento, com etanol 70%, centrifugar a 12000g por 10 min., desprezando o sobrenadante;
- 23 - Secar em fluxo laminar e dissolver em 200 - 500 µl e tampão R.

Soluções:

- 1 - Tampão NE: NaCl 150 mM; EDTA 10 mM; pH 8,0.
- 2 - Tampão TEM: NaCl 100 mM; EDTA 10 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5.
- 3 - TRITON X100: 10% (V/V) em água destilada.
- 4 - DS 10 % (P/V) em água destilada.
- 5 - RNase A (10mg/ml) em tampão R (ferver em banho-maria durante 15 min).
- 6 - PROTEINASE K: 10 MG/ML em água milli-Q.
- 7 - TAMPÃO R: Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM.

4.3 Quantificação do DNA total

Ao término da extração, foi verificada a concentração de DNA obtida de cada amostra, comparando-as com amostras de DNA com concentrações já conhecidas de 10, 20 e 100 ng.

A quantificação foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v), a leitura por intensidade de fluorescência do brometo de etídio sob luz UV, após a eletroforese.

Com a quantificação concluída, o DNA passou por uma diluição para atingir uma concentração padronizada de 10ng foi identificado e estocado a 20°C.

4.4 Amplificação do Gene mitocondrial

Para a obtenção de uma seqüência da região ND1 (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) do DNA mitocondrial foi utilizada a técnica de PCR, onde as seqüências foram amplificadas individualmente. Cada reação de amplificação continha: 11.8 µl de água MiliQ, 1.8µl de MgCl₂ (25mM), 2.0µl de DNTTP (2.5mM), 2.5 µl de tampão (Tris, 200mM. KCl 500mM), 2.5 µl de iniciador (16sF₂ - 5pmol/µl), 2.5µl iniciador de (Met R₁ - 5pmol/ µl), 0.9µl da enzima Taq polimerase (5U/ µl), 1.0µl de DNA (10ng) em um volume final de 25 µl. As amplificações foram realizadas utilizando seguintes iniciadores específicos (HRBEK *et al.*,2002).

16SF.2 – 5’ TAC.GAC.CTC.GAT.GTT.GGA.TCA.GG – 3’

MetR.1 – 5’ GGG.GTA.TGG.GCC.CRA.RAG.C – 3’

A amplificação gênica foi realizada em um termociclador através do seguinte ciclo:

<i>92° C – 2 min.</i>	}	<i>35 ciclos</i>
<i>92° C – 1 min.</i>		
<i>55° C – 1 min.</i>		
<i>72° C – 1 min.</i>		
<i>72° C – 1 min.</i>		
<i>4° C – 1 min.</i>		

A detecção das seqüências foi feita em eletroforese utilizando gel de agarose 1%. A visualização das bandas no gel foi realizada diretamente por coloração com brometo de etídio, depois de corados os géis foram fotografados no equipamento Image Master VDS.

4.5 Purificação das Amostras

Consiste na eliminação dos vários tipos de produtos não incorporados na reação de amplificação como iniciadores, dNTPs, sais e outras moléculas de peso molecular baixo. Foi realizada com kit específicos para purificação (Concert Nucleic Acid Purification System , Life Technologies), de acordo com as especificações do fabricante.

4.6 Seqüenciamento de DNA

O DNA foi seqüenciado no seqüenciador automático do tipo Mega Bace (Pharmacia), utilizando o iniciador 16sF2 para o seqüenciamento.

As seqüências nucleotídicas geradas pelo seqüenciador automático foram conferidas e editadas no programa BioEdit Version 5.0.6. (HALL, 1999). As seqüências foram alinhadas visualmente e comparadas com quelônios *Pelomedusa subrufa* (Figura: 03) e *Chelonia mydas* que possuem a seqüência já publicada, utilizando o programa PAUP 4.0 (SWOFFORD, 1999). Somente seqüências parciais do gene ND1 foram utilizadas e organizadas em um arquivo de dados por população (ver anexo) que foi utilizado para as análises estatísticas pertinentes.

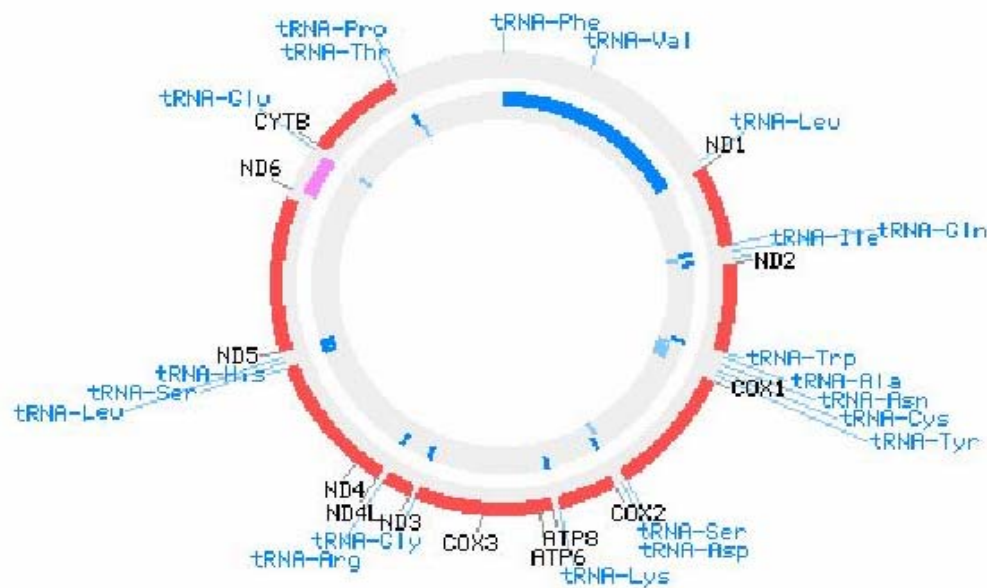


Figura 03: Esquema gráfico do DNA mitocondrial de *Pelomedusa subrufa* (Testudines; Pelomedusidae), copiado do genebank Acesso [NC 001947](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001947).

4.7 Análises Estatísticas e Filogenética

As análises para estimativas e freqüências dos haplótipos foram realizadas utilizando o programa COLAPSE 1.1 (http://www.bioag.byu.edu/zoology/crandall_lab/programs.htm), e as de

polimorfismo de DNA no programa DnaSP 3.0 (ROZAS E ROZAS, 1999), entre os parâmetros calculados estão: a) diversidade haplotípica (probabilidade de cada duas seqüências serem diferentes em uma população; b) diversidade nucleotídica, P_i (número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre as seqüências) (NEI, 1987); c) estimador do fluxo gênico (NEI, 1982); d) número total de mutações (Θ).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi utilizada para verificar a variabilidade dentro e entre populações, esta e a estimativa do índice de fixação (F_{ST}) foram realizadas no programa ARLEQUIN 2.0 (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Foi utilizado também o programa TCS (CLEMENT, *et al.*, 2000) que retira as seqüências redundantes e constrói um cladograma conectando os clados separados por uma seqüência diferente, mas se dois haplótipos forem diferentes em uma ou mais bases, o programa TCS assume um haplótipo intermediário, que representa um haplótipo hipotético (BATISTAS, 2001). Haplótipo pode ser definido como variações na seqüência de pares de base (FUTUYMA, 1992) ou segundo MATIOLI (2001) haplótipo é uma combinação de alelos de um segmento colinear de DNA, existem também os “singletons” que são os haplótipos representados por uma única seqüência ou indivíduo na população.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e amplificação da região ND1

Foi extraído o DNA total de *Podocnemis sextuberculata* de 29 indivíduos de Abufari, 11 de Tefé e 24 de Terra Santa, totalizando 64 indivíduos. Ao término da extração e quantificação foram realizadas com estes indivíduos amplificações da região ND 1 (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) DNA mitocondrial. (Figura 04).

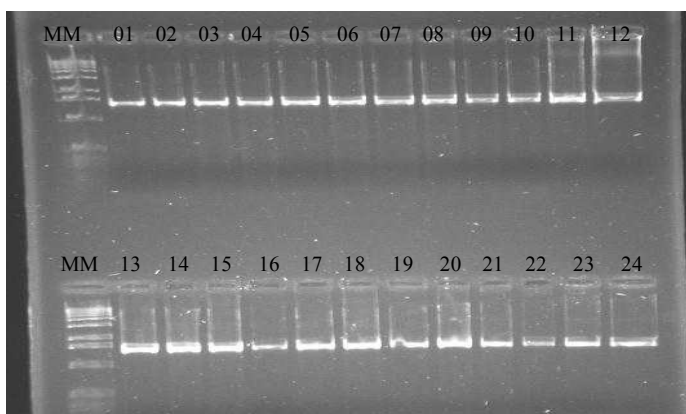


Figura 04: Eletroforese em gel de agarose da amplificação de uma região do gene mitocondrial **ND1**, onde MM – marcador molecular ladder 1Kb e de 1 a 24 - indivíduos da população de Abufari.

5.2 Purificação e Seqüenciamento do gene mitocondrial ND1

Na purificação foi retirado o excesso de iniciadores e outros produtos não incorporados na amplificação como dNTPs e sais que pudessem atrapalhar o seqüenciamento (Figura 05).

As seqüências foram conferidas, editadas e posteriormente alinhadas visualmente. O alinhamento das seqüências foi obtido no programa BioEdit Versão 5.0.6. (HALL, 1999) e gerou um total de 415 pb (Anexo 01).

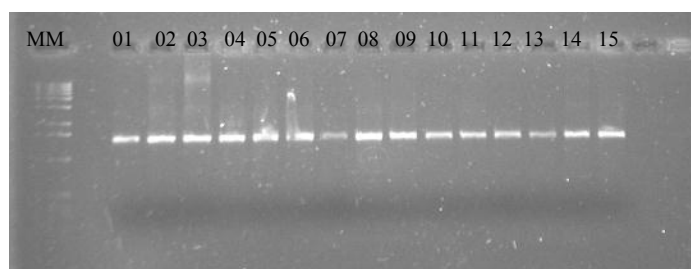


Figura 05: Eletroforese em gel de agarose 1% da purificação. MM- marcador molecular (ladder 1Kb), indivíduos 1 – 15 da população de Terra Santa.

5.3 Variabilidade Nucleotídica

A média de bases nucleotídicas calculada foi de 27,7% para citosina, 32,1% para timina, 28,4% para adenina e 10,8% para guanina (figura 06). A tabela 01 mostra a composição nucleotídicas encontrada em cada população.

Nas três populações foram encontrados um total 23 sítios polimórficos sendo que 9 deste foram decorrentes de transições e 14 de transversões. NORMAN *et al.*, (1994) analisando *Chelonia mydas* de 12 diferentes regiões do Pacífico encontraram somente substituições do tipo transição e uma inserção simples de 1pb. ENCANDALA *et. al.*, (1998), estudando a espécie *Carreta carreta* obtiveram um total de 380pb, deste 26 sítios polimórficos, consistindo em 21 transições e 5 deleções/inserções. Mutações do tipo transições são mais comuns, mas segundo MEYER (1993) transversões podem ser acumuladas lentamente e eventualmente ultrapassam o número de transições.

Tabela 01: Porcentagem de bases nucleotídicas encontradas em cada população.

Composição nucleotídicas	Abufari	Tefé	Terra Santa
C %	27,73	27,69	27,63
T %	32,04	32,05	32,08
A %	29,41	29,42	29,38
G %	10,82	10,84	10,91

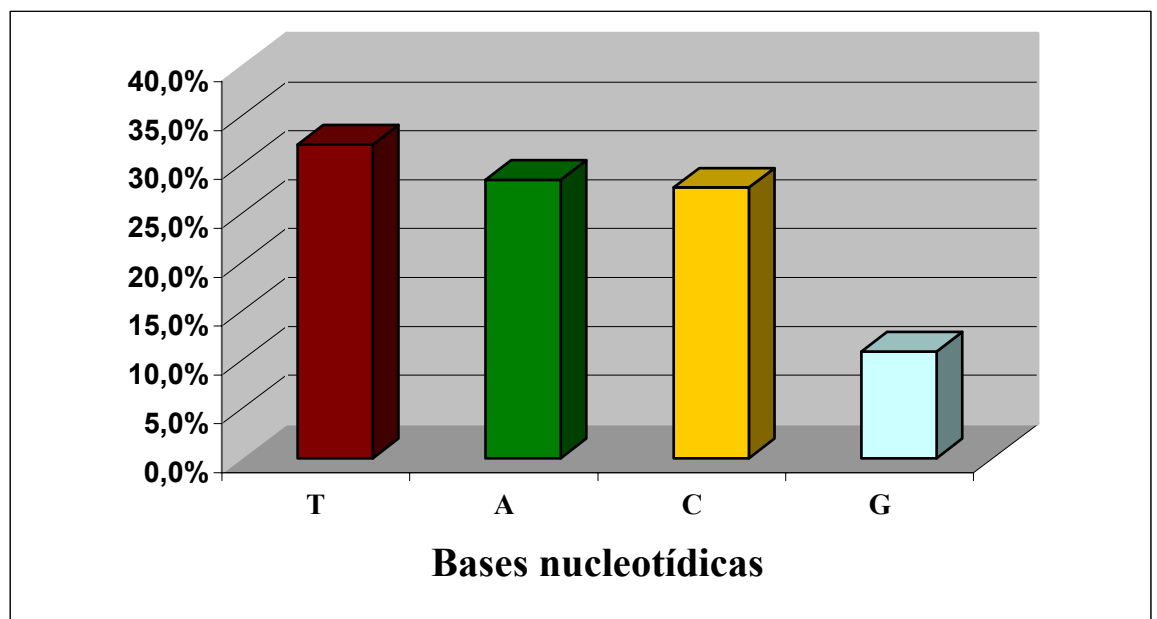


Figura 06: Porcentagem média da frequência de bases nucleotídicas encontradas nas três populações.

5.4 Distribuição e análise dos haplótipos

O número de haplótipos encontrados nas três populações separadamente foi 13, mas quando analisadas juntas definiu-se somente 10 tipos devido a repetição do tipo HaPod 1, que se encontra nas três populações. Foi também observada a presença de vários “singletons”. (Figura: 07). ENCALADA *et al.* (1998), seqüenciaram 380pb da região controle do mtDNA de *Caretta caretta* onde foram distinguidos dez haplótipos sendo que dois desses estavam presentes

em 88% dos indivíduos. Com este resultado a composição demográfica e genética de tartaruga cabeçada (*Caretta caretta*) do sistema Atlântico-Mediterrâneo ficou melhor compreendida. DUTTON *et. al.* 2001, combinaram dados de mtDNA com DNA nuclear para analisar a estrutura genética da tartaruga de couro (*Dermochelys coriacea*) do Pacífico, oito amostras do Norte do Pacífico possuíam haplótipos do mtDNA encontrados somente no Pacífico ocidental. Houve a caracterização de um haplótipo (F) comum para as duas áreas do Oceano Pacífico, porém com uma frequência muito baixa.

Tabela 02: Frequência relativa de Haplótipos.

Haplótipos	Abufari (29)	Tefé (9)	Terra Santa (21)
HaPod 1	0.793	0.818	0.875
HaPod2	0.0345	0	0
HaPod3	0.0345	0	0
HaPod4	0.069	0	0.0417
HaPod5	0.0345	0	0
HaPod6	0.0345	0	0
HaPod7	0	0.0909	0
HaPod8	0	0.0909	0
HaPod9	0	0	0.0417
HaPod10	0	0	0.0417

O haplótipo comum foi o HaPod1 encontrado em 53 indivíduos, o haplótipo HaPod 4 foi encontrado em três indivíduos nas populações de Abufari e Terra Santa os outros são chamados de “singletons”, pois foram encontrados em um único indivíduo. (Anexo 02)

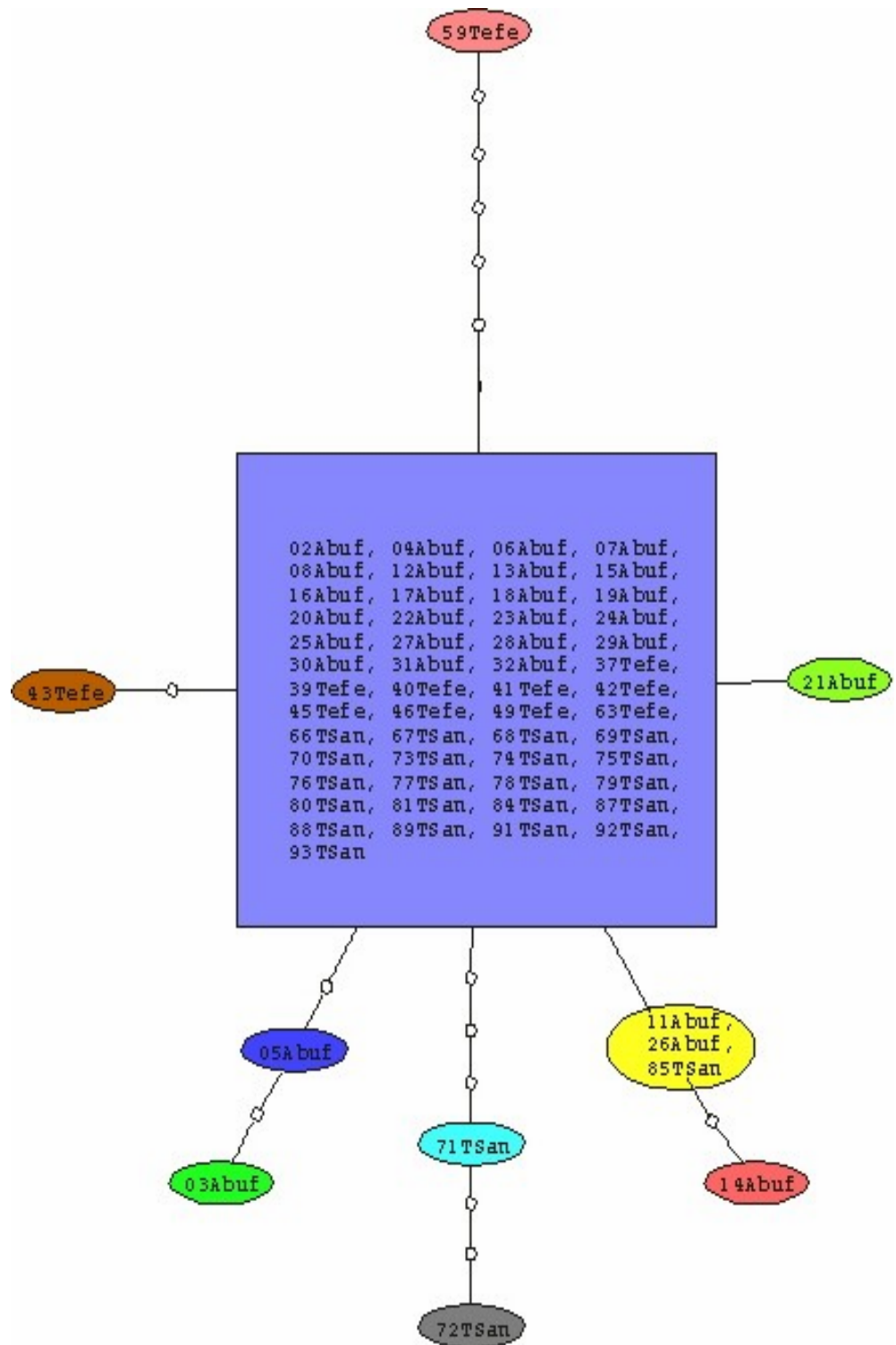


Figura 07: Representação gráfica dos haplótipos encontrados nas três populações.

5.5 Análises de polimorfismo de DNA

A taxa média de sítios polimórficos para as três populações analisadas juntas foi de 0,055, por população foi em Abufari 0,019, em Mamirauá 0,022 e em Terra Santa 0,019. Estes dados sugerem que as três populações possuem o mesmo grau de variabilidade. O fluxo gênico encontrado ($N_m = 21,24$) confirma estes dados. Segundo KIMURA & MARUYAMA em 1971 quando a estimativa de N_m assumir valores maiores que quatro as populações panmíticas podem ser consideradas como uma única unidade populacional, quando N_m for menor que um as populações podem ser diferenciadas.

A tabela 03 mostra o fluxo gênico entre as três populações, sendo o maior encontrado entre Abufari e Terra Santa. Com o número elevado de N_m pode-se sugerir que essa espécie tem uma alta taxa de migração. A migração de quelônios marinhos é bem conhecida. (CARR *et al.*, 1978). O mesmo padrão encontrado nestes quelônios, como o movimento da área de alimentação para locais de nidificação e retorno para área de alimentação foi observado em *Podocnemis sextuberculata*, e outros quelônios de água doce (VOGT, 1980). Segundo GIBBONS, (1986) muitas espécies de quelônios se movimentam a grandes distâncias, em resposta à mudanças sazonais, mas a resposta para condições adversas pode variar dentro e entre espécies. Na reserva Mamirauá acontece um evento similar; *Podocnemis sextuberculata* movimenta-se em função do nível da água, ao contrário de *Podocnemis unifilis* que fica no interior da reserva e permanece no período de seca (FACHIN, 1999). Esta característica de *P. unifilis* foi encontrada por FORNER (2001) utilizando RAPD como marcador

molecular onde os resultados sugeriram que a espécie não apresenta altas migrações.

FACHÍN (1999), observando *Podocnemis sextuberculata* na reserva de Mamirauá através de rádio-telemetria verificou a migração dos locais de alimentação para as áreas de reprodução nos rios Japurá e Solimões.

Tabela: 03. Fluxo gênico entre as três populações

Populações	Abufari	Tefé	Terra Santa
Abufari	-	-	-
Tefé	16,93	-	-
Terra Santa	23,36	18,68	-

5.6 Análise de Variância Molecular (AMOVA)

Os resultados da AMOVA ($F_{ST} = 0,023$ e $Nm=20,65$) sugerem que não existe diferenciação genética entre as três populações. Interpretando os números de F_{ST} (Tabela 04) segundo WRIGHT (1931) sugeriu, resultado menor que 0,05 pode ser considerado como indicador de pouca (baixa) diferenciação genética. O valor elevado de Nm pode ser explicado pela migração. FACHIN (1999) utilizando o método marcação-recaptura observou que as distâncias viajadas entre os indivíduos de *P. sextuberculata* variaram grandemente, não foi encontrada evidência de territorialidade em *P. sextuberculata* na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, presumindo que esta espécie tem um comportamento social, tolerando a sobreposição da área de vida em ambos os sexos, ficou evidente ainda que a população de *P. sextuberculata* é aberta, pois houve uma taxa de recaptura baixa indicando dispersão de altos números de indivíduos marcados.

AVISE *et al.*, 1992 estudando o mtDNA de seis espécies de Testudines verificaram uma baixa variabilidade genética e uma taxa de microevolução muito baixa na Ordem Testudines. SITES *et al.*, (1999) estudando padrões da variabilidade genética em *Podocnemis expansa* (tartaruga gigante da Amazônia), utilizando o gene mitocondrial *D-loop* e marcadores de microsatélites, encontraram um extenso fluxo gênico intra-bacia fluvial, mas pouco entre bacias.

A maior variação encontrada foi dentro das populações: uma porcentagem de 97,64%, e entre as populações foi apenas de 2,36%. A baixa divergência encontrada entre populações de *Chelonia mydas* utilizando mtDNA e DNA nuclear é provavelmente devido ao fluxo gênico (FITZSIMMONS, 1997).

Tabela 04: Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA)

Tipos de Variantes	Componentes Variantes	Porcentagem de variação
Interpopulacional	0,01214Va	2,36%
Intrapopulacional	0,50147Vb	97,64
Total	0,51362	

Índice de Fixação (F_{ST}): 0,02364

Tabela 05: Resultados Gerais das Análises.

	Três Populações	Abufari	Tefé	Terra Santa
Nº de seqüências	64	29	11	24
Sítios polimórfico	23	8	9	8
“Singleton”	15	5	9	4
Nº de haplótipos	10	6	3	4
Diversidade haplotípica	0,315	0,374	0,345	0,239
Diversidade nucleotídica	0,00245	0,00193	0,00394	0,00234

6. CONCLUSÃO

Nas três populações analisadas foi possível observar, um total de dez haplótipos, seis na população de Abufari, três na população de Mamirauá e quatro na população de Terra Santa, ocorrendo à predominância de um haplótipo comum. As análises apresentaram taxas de sítios polimórficos similares nas três populações. Foi também verificado que não existe diferenciação genética entre as três populações, estes dados são confirmados pelo alto fluxo gênico encontrado e por estudos ecológicos desta espécie, onde *Podocnemis sextuberculata* migra da área de alimentação para locais de nidificação e retorna para área de alimentação, outra característica importante é que estudos mostram que para esta espécie não foi encontrada evidência de territorialidade.

O monitoramento genético dessas populações naturais de quelônios na região Amazônica torna-se, portanto de grande relevância como suporte para projetos de manejo e conservação específicos para cada espécie da região.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.;

WATSON, J. D. 1997. **Biologia Molecular da Célula**. 3ª

edição. Editora Artes Médicas, Porto Alegre. 1294p.

ALHO, C. J. R. & PADUA, L. F. M. 1982. Reproductive parameters and

nesting behaviour of Amazon turtle *Podocnemis expansa*

(Testudinata: Pelomedusidae) in Brazil. **Canadian Journal of**

Zoology, Canadá.

ALLARD, M.W; MIYAMOTO, M.M; BJORNDAL, K. A; BOWEN,

B,W. 1994. Support for natal homing in turtles from mitochondrial

DNA sequences. **Copeia**.: 34-41.

AVISE, J. C.; HELFMAN, G. S.; SAUNDERS, N. C.; STANTON, L. H.

1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels:

Population Genetic consequence of an unusual History Pattern.

Proc. Nat. Acad. Sci., (83):4350-4354.

AVISE, J. C.; BOWEN, B. W. LAMB; T. MEYLAN, A. B. &

BERMINGHAM E. 1992. Mitochondrial DNA Evolution at a

Turtle's Pace: Evidence for Low Genetic Variability and Reduced Microevolutionary Rate in the Testudines. **Mol. Biol. Evol.** 9(3): 457-473.

AVISE, J. C. 1994. Molecular Markers, **Natural History, and Evolution**. Chapman and Hall, New York, NY.

AYALA, F. J.; DOBZHANSKY, T.; STEBBINS, L.G.; VALENTINE, J. W. **Evolution**. Freeman Company, 1977. 552p.

BARBOSA, A. M. M. 1997. Análise da Variabilidade Genética em Progenies de Pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) por caracteres agronômicos e RAPD. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Jaboticabal.

BASS, A.L.; GOOD, D.A.; BJORNDAL, K.A.; RICHARDSON, J.I.; HILLIS, Z.M.; HORROCKS, J.; BOWEN, B.W. 1996. Testing models of female migratory behavior and population structure in the Caribbean hawksbill turtle. *Eretmochelys imbricata* with mtDNA control region sequences. **Molec. Ecol.** 5: 321-328.

BATISTA, J. S. 2001. Estimativa da Variabilidade Genética intra-específica da dourada - *Brachyplatystoma flavicans* Castelnau 1855

(Pimelodidae – Siluriformes) no Sistema Estuário-Amazonas-Solimões. **Dissertação de mestrado do PPG-BTRN, INPA/FUA.**

BOWEN, B. W.; MEYLAN, A.B. and AVISE, J.C. 1991. Evolutionary distinctiveness of the endangered Kemp's Ridley sea turtle. **Nature** 352:709-711.

BOWEN, B.W; MEYLAN, A.B; ROSS, J.P; LIMPUS, C.J; BALAZS, G.H; AVISE, J.C. 1992. Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. **Evolution** 46: 865-881.

BOWEN, B.W.; AVISE, J.C.; RICHARDSON, J.I.; MEYLAN, A.B.; MARGARITOU LIS, D.; HOPKINS-MURPHY, S.R. 1993. Population structure of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in the northwestern Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. **Conserv. Biol.** 7: 834-844.

BROWN, W. M. 1981. Mechanisms of Evolution in Animal Mitochondrial DNA. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** (361): 119-134.

BROWN, W. M. 1985. The Mitochondrial Genome of Animals. In: MacIntyre, R.J. (edit). **Molecular Evolutionary Genetics**. Plenum Press, New York. p. 95-130.

BRODERICK, D.; MORITZ, C.; MILLER, D.J.; GUINEA, M.; PRINCE, R.J.; LIMPUS, C.J. 1994. Genetic studies of the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*): evidence for multiple stocks in Australian waters. **Pacif. Conserv. Biol.** 1: 123-131.

CANN, R. I.; BROWN, W. M.; WILSON, A C. 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. **Genetics**, (106) 479-499.

CARR, A.,; CARR, M. H. & MEYLAN, A. B. 1978. The ecology and migrations of sea turtles. 7. The West Caribbean green turtle colony. **Bulletin of the American Museum Natural History**, v162, p. 1-46.

CHETVERIKOV, S. S. 1926. On certain features of the evolutionary process from the viewpoint of modern genetics. **Exp. Biol.**2;3-54.

CLEMENT, M; POSADA, D. CRANDALL, K. A. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, 9: 1657-1659.

CORRÊA, H. B. 1978. Contribuição Efetiva dos Quelônios Amazônicos. **Boletim Técnico** nº5. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal – IBDF. Pp. 3-26.

DUTTON, P.H.; FREY, A.; LEROUX, R.; BALAZS, G. 2001. Molecular Ecology of Leatherback Turtles in the Pacific. **Review of Biodiversity and Environmental Conservation**.

ENCANDALA, S.E.; BJORNDAL, K.A.; BOLTEN, A.B.; ZURITA, J.C.; SCHROEDER, B.; POSSARDT, E.; SEARS, C.J.; BOWEN, B.W. 1998. Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. **Marine Biology** 130: 567-575.

ERNEST, C. H. & BARBOUR, R. W. 1989. Turtles of the world.

FACHÍN, A. T. 1999. Ecología de *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Pelomedusidae), na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. **Tese de Doutorado**, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade do Amazonas, p. 189.

FAIRBANKS, D. J.; WALDRIGUES, C.F.; RUAS, C.F.; ENOS, P.M.; MAUGHAN, P.J.; ROBISON, L.R.; ANDERSEN, W.R.; RIEDE, C.R.; PAULEY, C.S.; CAETANO, L.E.; ARANTES, O.M.N.; FUNGARO, M.H.P.; VIDOTTO, M.C. & JANDEVICIUS, S.E. 1993. Efficient characterization of biological diversity using field DNA markers. **Re. Bras. Genet.** 16 (1): 11-22.

FERRARIS, J. D., & PALUMBI, S. R. (Eds.). 1996. **Molecular Zoology**. Advances, Strategies, and Protocols. Wiley-Liss, New York. In: SITES, J. W.; FITZSIMMONS, N. N., SILVA; N. J. & CANTARELLI, V. H. 1999. Conservation Genetics of the Giant Amazon River Turtle (*Podocnemis expansa*; Pelomedusidae) – Inferences From Two Classes of Molecular Markers. **Chelonian Conservation and Biology** 3 (3):454-463.

FERREIRA LUZ, V. L. 1994a. Criação de Tartarugas em Cativeiro. **Chelonia**, n 4, abril. Goiânia.

FERREIRA LUZ, V. L. 1994b. Os quelônios e a sua Biologia. **Chelonia**, n 4, junho. Goiânia.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao Uso de Marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética. Brasília. **EMPRABA-CENARGEN**, PP.220.

FORNER, O. 2001. Estudo da Variabilidade Genética Intrapopulacional em *Podocnemis unifilis* com Marcadores RAPD. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de São Carlos/ Universidade Federal do Amazonas. P.82.

FITZSIMMONS, N. N.; GOLDIZEN, A. R.; MORITZ, C.; MILLER, J. D. & LIMPUS, C. J. 1997. Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial DNA markers. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 94: 8912-8917.

FUTUYMA, D. J. 1992. **Biologia Evolutiva**. Sociedade Brasileira de Genética. Cap 4-5.

GIBBONS, J. W. 1986. Movement patterns among turtle populations: applicability to management of the desert tortoise. **Herpetologica**, v. 42, n. 1, p.104-113.

HALL, T.A. 1999. **BioEdit**: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

HARTL, D. L. and CLARCK, A. G. 1997. **Principles of Population Genetics**. 3rd ed. Sinauer Associates. Sunderland. Massachusetts. 542 p.

HRBEK, T., KUCUK, F, FRICKEY, T., STOLTING, R. WILDEKAMP, and A. MEYER. 2002. Molecular phylogeny and historical biogeography of the *Aphanius* (Pisces, Cyprinodontiformes) species complex of Central Anatolia, Turkey. (in press)

HILLIS, D.M.; MABLE, B.K.; LARSON, A.; DAVIS, S.K.; ZIMMER, E.A., 1996. Nucleic acids. IV. Sequencing and cloning. In: HILLIS, D.M.; MABLE, B.K.; MORITZ, C. (eds) **Molecular Systematics**. 2nd ed. Sinauer Associates. Sunderland. Massachusetts. Pp 321-384.

IBAMA, 1989. **Projeto Quelônios da Amazônia – 10 anos**. Brasília. 119p.

IUCN. 1996. Red List of Threatened Animals. Compiled and Edited by Jonathan Baillie and Brian Groombridge. IUCN, Gland, Switzerland. 368p.

KIMURA, M.; MARUYAMA, T. 1971. Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population. **Genet. Res.**, 1: 123-131.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. 1995. **Princípios de Bioquímica**. 2^a edição. Editora Sarvier, São Paulo. 839p.

LI, W. H. 1997. **Molecular Evolution**. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland. 284p.

MARGULIS, L. 1970. **Origin of eukaryotic cells**. CT: Yale Univ. Press, New Haven.

MATIOLI, S. R. 2001. **Biologia Molecular e Evolução**. 1ª edição. Editora Holos, Ribeirão Preto – SP. 202p.

MEYER, A 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. **Biochemistry and molecular biology of fishes**. (2): 1-38.

MEDEIROS-GALVÃO, R. 1998, Variabilidade genética detectada por RAPD em *Glomerella cingulata*, um dos fungos endofíticos mais freqüentes isolados em *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos / Universidade do Amazonas, p.151.

MORITZ, C.; DOWLING,; BROWN, W. M. 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematic. **Ann. Ver. Ecol. Syst.**, (18): 269-292.

MULLIS, K. & FALOONA, F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol**. 55: 335-350.

NEI, M. 1982. Evolution of the human races at gene level. *In*: Bonne-Tamir, B.;Cohen, T.; Goodman (eds). **Human genetics**, part A: The unfolding genome. Alan R. Liss, NY.

NEI, M. 1987. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York, NY, USA. 512p.

NORMAN, J. A.; MORTIZ, C. & LIMPUS, J. 1994. Mitochondrial DNA region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. **Molecular Ecology**. (3), 363-373.

ORR, R. T. 1986. *Biologia dos Vertebrados*. 5^aEd. São Paulo.

PÁDUA, L. F. M. & ALHO, C. J. R. 1982. Comportamento de Nidificação da tartaruga da Amazônia, *Podocnemis sextuberculata* (Testudinata, Pelomedusidae), na Reserva Biológica do rio Trombetas, Pará. **Brasil Florestal**, v. 12, 33-44.

PARHAM, J. F.; SIMISON, W. B.; KOZAK, K. H.; FELDMAN, C. R. and SHI, H. 2001. New Chinese turtles: endangered or invalid? A reassessment of two species using mitochondrial DNA, allozyme electrophoresis and known-locality specimens. **Animal Conservation**. (4), 357-367.

PEZZUTI, J. C. B. 1998. Reprodução de Iaçá, *Podocnemis sextuberculata* (Testudine, Pelomedusidae), na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil.
Dissertação de mestrado do PPG-BTRN, INPA/FUA.

PRITCHARD, P. C. H. 1979. Encyclopedia of turtles. T. F. H. Publ., Inc., Neptune, New Jersey, 895 p.

PRITCHARD, P. C. H., & TREBBAU, P. 1984. Turtles of Venezuela. Soc. Stud. Amphib. Rept. P: 33-43.

QUINN, T. W. 1997. Molecular Evolution of the Mitochondrial Genome. **Avian Molecular Evolution and Systematics**. Academic Press. pp. 03-23.

ROZAS, J. & R. ROZAS. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174-175.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. and MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning. **A Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. AND EXCOFFIER, L. 2000. Arlequin Version 2.000: A software for population genetic data analysis.

Laboratório de genética e biometria. Universidade de Geneva, Suíça. Adquirido de: <http://anthropologie.unige.ch/arlequin>.

SEBRAE, 1995. Criação de quelônios em cativeiro. **Programa de Informação. SEBRAE-AM**, Manaus. 62p.

SERB, J. M.; PHILLIPS, C. A. and IVERSON, J. B. 2001. Molecular Phylogeny and Biogeography of *Kinosternon flavescens*. Base on Complete Mitochondrial Control Region Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** vol. 18, n. 1, January, pp. 149-162.

SITES, J. W.; FITZSIMMONS, N. N. ; SILVA, N. J. & CANTARELLI, V. H. 1999. Conservation Genetics of the Giant Amazon River Turtle (*Podocnemis expansa*; Pelomedusidae) – Inferences From Two Classes of Molecular Markers. **Chelonian Conservation and Biology** 3 (3): 454-463.

SMITH, M. J. H. 1979. Destructive Exploitation of the South American River Turtles. **Assoc. Pacif. Coast Geog. Yearbook**, 36:85-102.

SWOFFORD, D. L. 1999. PAUP: Phylogenetic Analysis using parsimony, version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland.

TEIXEIRA, A. S., JAMIESON, A., RAPOSO, J. C. P. & VIEIRA, A.

A. 1996. Transferrina polymorphism in Amazon turtle (*Podocnemis expansa*) stocks. Brazilian Journal of Genetics, 19, 4, 559-564

TORGGLER, M G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER S. P. 1995.

Isoenzimas – Variabilidade Genética em Plantas. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética. 175p.

VOGT, R. C. 1980. Natural history of the map turtles *Graptemys*

***pseudogeographica* and *G. ouachitensis* in Wisconsin. *Tulane Studies in Zoology and Botany*, v. 22, n. 1, p. 65-67.**

VOGT, R. C.; CANTARELLI, V. H.; CARVALHO, A. G. 1994.

Reproduction of the cabeçudo, *Peltocephalus dumerilianus*, in the Biological Reserve of Rio Trombetas, Pará, Brazil. *Chelonia Conservation and Biology*, v.1, n.2p. 145-148.

WEIR, B. S., 1984. *Genetic Data Analysis*. 2nd ed., by Sinauer Associates, 444p.

WHITLOCK, M. C. & MCCAULEY, D. E. 1999. Indirect measures of

gene flow and migration: $F_{st} \neq 1/ 94Nm+1$. *Heredity*. 82 (117-125).

WOOD, R. C. 1976. Two new species of *Chelus* (Testudines: Pleurodira) from the late Tertiary of Northern South America. *Breviora, Mus. Comp. Zool. Harvard Univ.*, **435**: 1-26.

WRIGHT, S. 1931. Evolution in Mendelian Population. *Genetics*, **16**: 97-159

YANG, D.; OYAIZU, Y.; OYAIZU, H.; OLSON, G. J. WOESE, C. R. 1985. Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (82): 4443-4447.

ANEXO

Cont.

33333333344444444444444444444444
99999999900000000001111111
Taxon/Node 1234567890123456789012345

02Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
03Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
04Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
05Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
06Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
07Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
08Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
11Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
12Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
13Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
14Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
15Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
16Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
17Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
18Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
19Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
20Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
21Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
22Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
23Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
24Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
25Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
26Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
27Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
28Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
29Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
30Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
31Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
32Abuf AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
37Tefe AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
39Tefe AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
40Tefe AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
41Tefe AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
42Tefe AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
43Tefe AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
45Tefe AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
46Tefe AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
49Tefe AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
59Tefe AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
63Tefe AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
66TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
67TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
68TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
69TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
70TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
71TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
72TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
73TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
74TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
75TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
76TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
77TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
78TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
79TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
80TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
81TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
84TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
85TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
87TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
88TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
89TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
91TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
92TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC
93TSan AAATATGCCTTAATAGGAGCTCTAC