



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

**DOROTHY IVILA DE MELO PEREIRA**

**ANÁLISE DE PARENTESCO ENTRE FILHOTES DA TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA**  
**(*Podocnemis expansa*) PROVENIENTES DE CATIVEIRO E NATUREZA UTILIZANDO**  
**MARCADORES MICROSSATÉLITES**

**MANAUS**  
**2013**

**DOROTHY IVILA DE MELO PEREIRA**

**ANÁLISE DE PARENTESCO ENTRE FILHOTES DA TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA  
(*Podocnemis expansa*) PROVENIENTES DE CATIVEIRO E NATUREZA 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 parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientador: Prof Dr Cleiton Fantin Rezende**

**MANAUS  
2013**

*Aos meus queridos avós Raimundo e Zaíra.*

*“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”*

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo maravilhoso dom da vida e pela força concedida todos os dias para nunca desistir de alcançar meus sonhos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA pela oportunidade.

Aos meus pais queridos, a minha irmã e toda minha família que me sempre me apoiam e me dão forças para lutar pelos meus sonhos. E sempre quando preciso estão dispostos a me ajudar. Obrigada por tudo.

Ao meu orientador e amigo Dr. Cleiton Fantin pelo apoio, incentivo, amizade e ajuda em todos os momentos na realização desse trabalho. E principalmente por ter acreditado em mim desde a graduação quando comecei na Iniciação científica e a trilhar os primeiros passos na pesquisa. Sem dúvida alguma tenho aprendido muito com você, obrigada pela oportunidade de estarmos há 5 anos trabalhando juntos.

Ao projeto Pé-de-Pincha que financiou todas as coletas e parte dos equipamentos/reagentes do laboratório de genética da UEA, em especial ao Paulo César, Jânderson Rocha, Eleyson Barboza e Karen Martins.

A Universidade Federal do Amazonas, em especial ao LEGAL, onde pude utilizar o equipamento necessário para a genotipagem, e onde puder contar com o apoio da Dra. Izeni Farias e da ajuda do Mario Nunes.

Aos meus queridos, preciosos e lindos amigos do Mestrado: Diego Liciard, Soraya Félix e Simone Maciel pela grande amizade que desenvolvemos nesse período de 2 anos. Passamos momentos felizes, tristes e caóticos juntos, nunca me esquecerei dos momentos que dividimos, das experiências compartilhadas e dos conselhos. Sem dúvida ter a oportunidade de cursar na mesma turma de Mestrado que vocês foi um presente de Deus.

Ao meu amado Carlos Avelino com quem muitas vezes dividi os meus medos, e quem tantas vezes foi meu ombro amigo quando eu me encontrava cansada a ponto de desistir. Obrigada meu amado pelas palavras de conforto e consolo quando eu precisei.

A minha mana Luciana Viana, que sempre me aconselhou e esteve do meu lado. Sempre que eu precisava compartilhar das minhas dúvidas, você estava ali para me ajudar e aconselhar. Obrigada por sua amizade.

A minha querida BFF Jéssica Nogueira pela amizade e pelos momentos descontraídos que passamos juntas.

Aos amigos do laboratório Juliana, Monik, Thais, Mylla, Mara, Gabriel Assis, Gabriel Miguel e Higa por toda ajuda e amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Não foi fácil chegar até aqui, mas sem dúvida valeu muito a pena!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

## RESUMO

Conhecida popularmente como Tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa* é um importante representante da fauna de quelônios da Amazônia, seu grande tamanho o torna um dos quelônios mais consumidos pela população humana local, além disso, é uma espécie bastante comercializada ilegalmente. Por esses motivos, sua população foi reduzida e atualmente essa espécie encontra-se classificada como baixo risco/dependente de conservação, segundo a IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza). Como medida de conservação, a fim de amenizar a pressão de captura na natureza, essa espécie pode ser comercialmente criada em cativeiro. No entanto, a falta de suporte técnico aos cativeiros em relação a informações ecológicas importantes a respeito da biologia da espécie dificulta seu adequado manejo. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi determinar, a partir da análise de parentesco dos filhotes, o tipo de comportamento reprodutivo que essa espécie apresenta em amostras de cativeiro e natureza. Amostras de sangue foram coletadas, através da punção da veia femural, de 191 filhotes de cativeiro, provenientes da Fazenda São Francisco, Manacapuru-AM e 165 filhotes provenientes do rio Juruá, Carauari-AM. Foram genotipados no total 356 filhotes somados das duas localidades utilizando 5 locos de microssatélites. A análise dos locos revelou 100% a ocorrência de paternidade múltipla tanto em cativeiro quanto em natureza. Os marcadores utilizados neste trabalho mostraram-se bastante polimórficos e com grande poder discriminatório para a análise de parentesco com valores de identidade (I)  $IC=1,08 \times 10^{-6}$  para as amostras de cativeiro e  $IC= 2,85 \times 10^{-6}$  para as amostras de natureza, e de probabilidade de exclusão de paternidade de (Q)  $QC=99,9\%$  nos dois casos, indicando o poder de detecção de paternidade múltipla dos locos utilizados. A partir do método de contagem de alelos, em que é possível estimar o número de machos que estavam contribuindo em cada prole, foi observado a contribuição de no mínimo 10 machos em dois ninhos provenientes de cativeiro e 9 machos em um dos ninhos de natureza. Esses resultados também revelam a capacidade que as fêmeas dessa espécie possuem em armazenar esperma de múltiplos acasalamentos. O conhecimento a respeito do tipo de comportamento que essa espécie apresenta é fundamental e possui grande implicação quando se pensa na conservação de *P. expansa*, os dados obtidos neste trabalho contribuirão

como suporte a programas de manejo e conservação adequados para essa espécie, tanto para populações naturais quanto para os cativeiros.



## ABSTRACT

Popularly known as Turtle-the-amazon, the Giant River turtle, *Podocnemis expansa* is an important representative of the turtle fauna of the Amazon, her large size makes it one of the most consumed turtles by the local human population, furthermore, is an altogether marketed illegally. For these reasons, your population was reduced and currently this species is classified as low risk/conservation dependent, according to the IUCN (International Union for Conservation of Nature). As a conservation measure, to ease the pressure of capture in nature, this species can be commercially raised in captivity. However, the lack of technical support regarding captivity important ecological information about the biology of the species hinders their proper management. In this context, the aim of this study was to determine, based on the analysis of relationship of clutch, the type of reproductive behavior in this species about samples of captivity and nature. Blood samples were collected by puncture of the femoral vein, of 191 offspring in captivity, from Fazenda São Francisco, Manacapuru-AM and 165 hatchlings from the Juruá, Carauari-AM. We genotyped a total of 356 offspring added two locations using 5 microsatellite loci. The analysis of the loci revealed 100% occurrence of multiple paternity both in captivity and in nature. The markers used in this study were quite polymorphic and highly discriminatory power for the analysis of kinship with identity values (I)  $IC=1,08 \times 10^{-6}$  for samples of captivity and  $IC= 2,85 \times 10^{-6}$  for samples of nature, and the probability of paternity exclusion (Q)  $QC = 99.9\%$  in both cases, indicating the detection power paternity multiple of these loci used. The allele counting method, it is possible to estimate the number of males that were contributing each offspring, was observed contribution of at least 10 males from nests two in captive and nine males in one of the nests of nature. These results also reveal the ability of females of this species have in store sperm from multiple matings. Knowledge about the type of behavior that this species has is fundamental and has great implications when considering the conservation of *P. expansa*, the data obtained in this study will contribute to support the management and conservation programs suitable for this species, both natural populations and for the captivity.

## 1 LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Descrição das características dos locos de microssatélites que foram utilizados para as análises.....	42
Tabela 2. Caracterização dos cinco locos de microssatélites em <i>Podocnemis expansa</i> proveniente de cativeiro e natureza.....	45
Tabela 3. Evidência de paternidade múltipla nos ninhos de <i>P. expansa</i> de cativeiro e natureza.....	47

## 2 LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Exemplar adulto de <i>Podocnemis expansa</i> .....	17
Figura 2. Esquema de uma região microssatélite apresentando a unidade de repetição dinucleotídica (CA) <sub>n</sub> .....	26

### CAPÍTULO I

Figure 1. Mapa mostrando os 2 locais de coleta dos ninhos de filhotes de <i>P. expansa</i> .....	41
--	----

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1 Características gerais dos Testudines.....	15
2.2 Família Podocnemididae.....	16
2.3 <i>Podocnemis expansa</i> .....	16
2.4 Comportamento reprodutivo em quelônios.....	18
2.5 Poliandria e armazenamento de esperma.....	21
2.6 Genética da conservação.....	23
2.7 Marcadores moleculares .....	24
2.7.1 Marcadores microssatélites.....	25
2.8 Estudos de paternidade em quelônios.....	27
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
CAPÍTULO I .....	36

## 1 INTRODUÇÃO

A fauna de tartarugas na América do Sul é rica e variada, aproximadamente 20% das espécies de tartarugas do mundo estão na América do Sul (PRITCHARD, 1975). Conhecida como o berçário dos quelônios de água doce, a região do estado do Amazonas abriga quatro espécies de quelônios dulcícolas do gênero *Podocnemis*: *P. expansa*, *P. unifilis*, *P. sextuberculata* e *P. erythrocephala*. Dentre estas quatro, *P. expansa* e *P. unifilis* são as preferidas pelo seu grande porte e seu maior rendimento em carne, sendo a tartaruga a mais consumida nas amostras urbanas (PRITCHARD e TREBBAU, 1984; REBELO e PEZZUTI, 2000).

Conhecida popularmente como Tartaruga-da-Amazônia, *P. expansa* possui ampla distribuição, podendo ser encontrada nos maiores tributários 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 (VOGT, 2008). É o maior quelônio de água doce da América do Sul podendo atingir 80 cm de comprimento por 60 cm de largura e pesar 60 kg (IBAMA, 1989).

Assim como a maioria dos quelônios, *P. expansa* apresenta demorada maturação sexual (ocorrendo entre 11 a 15 anos na fêmea e 7 anos para os machos), o que influencia uma baixa taxa de substituição de indivíduos na população (PRITCHARD, 1979), suas populações são caracterizadas por uma baixa taxa de mortalidade dos animais adultos e alta taxa de mortalidade de filhotes e embriões (SOARES, 2000), sendo a predação natural um dos fatores mais importantes do baixo sucesso de eclosão dessas espécies (VALLE et al., 1973). Como medida de conservação dessa espécie, pelo fato do consumo de quelônio ser um hábito arraigado na região e por esses animais sofrerem com a comercialização ilegal, é que houve a liberação para a criação em cativeiro da Tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) e o Tracajá (*Podocnemis unifilis*) a partir da publicação da portaria 142/92, ocorrendo assim um estímulo à construção de criadouros destinados a criação desses animais para fins econômicos. No entanto, os criadores continuam com pouca ou nenhuma assistência, e as criações existentes no Estado do Amazonas vêm sendo desenvolvidas com base no empirismo (ANDRADE, 2004).

Com base nisso, estudos a respeito da biologia reprodutiva dessa espécie são fundamentais para gerar informações ecológicas importantes a respeito de seu comportamento reprodutivo. Devido à falta de suporte técnico adequado, sobre a dinâmica de populações de

quelônios, para os órgãos governamentais e para os criadores, existe a necessidade de dados que forneçam suporte aos cativeiros sobre a biologia reprodutiva de *P. expansa*. Como ainda não há relatos de estudos que avaliem o tipo de comportamento reprodutivo de indivíduos dessa espécie criados em cativeiro, é que o presente estudo investigará, a partir da análise de parentesco, seu tipo de comportamento, estudando indivíduos recém-eclodidos provenientes de criadouros e provenientes da natureza, através de marcadores microssatélites. Esse tipo de conhecimento é fundamental para o manejo diferenciado e adequado da espécie.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Características Gerais dos Testudines

A ordem Testudines está representada por espécies aquáticas, semi-aquáticas e terrestres que compreendem as tartarugas, cágados e jabutis. Esses quelônios que surgiram há cerca de 250 milhões de anos descobriram um modo de vida bem sucedido no Triássico, e desde então pouco se modificaram (POUGH et al., 2008).

Esses animais desenvolveram um sistema de proteção e defesa diferenciado, pois apresentam seu corpo encaixado num casco formado por duas conchas ósseas, uma parte dorsal e convexa (a carapaça) e outra, ventral e plana (o plastrão) que estão ligados lateralmente por uma ponte óssea. A morfologia do casco reflete a ecologia da espécie, sendo o casco sua característica mais marcante e também o que limitou a diversidade do grupo. Cascos com a cúpula bem elevada e pés semelhantes ao dos elefantes são representados pelos jabutis, cascos achatados e patas com membranas interdigitais são representados pelos cágados e cascos achatados com patas modificadas em forma de remo são representados pelas tartarugas marinhas (POUGH et al., 2008).

São amniotas, anápsidos, ectotérmicos (regulam a temperatura corporal de acordo com a temperatura do ambiente), todos são ovíparos e não apresentam cuidado parental, também apresentam mandíbulas desenvolvidas formando bico córneo, língua não extensível, ausência de dentes e pescoço retrátil (POUGH et al., 2008). Possuem alta expectativa de vida, podendo as espécies terrestres viver mais de cem anos. Esse longo período de vida geralmente está associado a uma baixa taxa de substituição de indivíduos na população, e espécies com essas características correm risco de extinção quando seu número é reduzido pela caça ou destruição do habitat.

Os Testudines atuais são classificados em 13 famílias com aproximadamente 300 espécies, sendo divididos em duas subordens. Os Cryptodira (grego, crypto = escondido, dire = pescoço) retraem a cabeça para dentro do casco curvando o pescoço na forma de um S vertical, já os Pleurodira (grego, pleuro = lado) retraem a cabeça curvando o pescoço horizontalmente. O grupo dominante são os Cryptodira, encontrados atualmente na maior parte do hemisfério norte,

e existem formas aquáticas e terrestres na América do Sul e formas terrestres na África, sendo ausente apenas na Austrália. Já os Pleurodira são encontrados apenas no Hemisfério Sul, e todos são semi-aquáticos (POUGH et al., 2008). Esta última subordem possui três famílias de Testudines aquáticos: Chelidae, Pelomedusidae e Podocnemididae.

## 2.2 Família Podocnemididae

A família Podocnemididae reúne três gêneros de quelônios dulcícolas *Erymnochelis* Baur (1888), *Peltocephalus* Duméril e Bibron (1835) e *Podocnemis* Wagler (1830). O gênero *Erymnochelis* está representado por apenas uma espécie vivente, *Erymnochelis madagascariensis* Grandidier (1867), restrita a Madagascar (PRITCHARD e TREBBAU, 1984). Já o gênero *Peltocephalus*, é monoespecífico, estando *Peltocephalus dumerilianus* Schweigger (1812) distribuída pelo leste da Colômbia, sudoeste da Venezuela e noroeste do Brasil (PRITCHARD e TREBBAU, 1984). Na Amazônia brasileira encontramos quatro espécies do gênero *Podocnemis* Wagler (1830): *Podocnemis unifilis* Troschel (1848), *P. erythrocephala* Spix (1824), *P. sextuberculata* Cornália (1849) e *P. expansa* Schweigger (1812).

Dentre as espécies localizadas na América do Sul destaca-se a *Podocnemis expansa* que é encontrada nos rios Amazonas e Orinoco, sendo o maior Pleurodira existente, o casco das fêmeas chega a alcançar 90 centímetros de comprimento (POUGH et al., 2008).

## 2.3 *Podocnemis expansa*

Conhecida popularmente como Tartaruga-da-amazônia, arrau (Venezuela), chapanera ou samurita (Colômbia), charapa (Colômbia, Equador e Peru), *Podocnemis expansa* é o maior Pleurodira e também o maior quelônio de água doce na América do Sul, com sua carapaça com 70 cm (65-79) e pesando 25 kg (15-45). Apresentam ampla distribuição nos maiores tributários



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 (VOGT, 2008).

*Podocnemis expansa*, assim como outras espécies de quelônios, apresenta demorada maturação sexual, ocorrendo apenas entre os 11 a 15 anos na fêmea e 7 anos para os machos (IBAMA, 1989). Os machos são ligeiramente menores do que as fêmeas de carapaça mais estreita, comprida e cauda mais espessa e evaginação anal maior. *P. expansa* possui carapaça larga, achatada e lisa com coloração entre cinza e preto, sendo a parte posterior mais larga que a anterior, além de extremamente grossa e pesada. Fêmeas adultas perdem o padrão de coloração da cabeça como o dos filhotes, gradualmente desbotando para o marrom. Machos tendem a manter o padrão por mais tempo. Existem dois barbelos no queixo presentes na maioria dos indivíduos das populações (VOGT, 2008).



Figura 1. Exemplar adulto de *Podocnemis expansa*.  
Fonte: Richard C. Vogt, 2008.

Como essa espécie habita na bacia Amazônica, no período da cheia, adultos e indivíduos do mesmo tamanho possuem o hábito de adentrar os lagos e as florestas alagadas em busca de frutas e sementes para se alimentar. Além de possuírem uma dieta herbívora, seu conteúdo estomacal pode apresentar pequena quantidade de alimento de origem animal (PRITCHARD e TREBBAU, 1984), como por exemplo esponjas, o que foi observado na Venezuela por Vogt (2008). Em um estudo que avaliava o comportamento e preferência alimentar em *Podocnemis expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata* de cativeiro, foi observado que *P. expansa* e *P. unifilis* podem ser consideradas espécies onívoras, pois em todas as fases de desenvolvimento aceitaram alimento de origem animal e vegetal (MALVASIO et al., 2003).

*P. expansa* juntamente com *Podocnemis unifilis* (tracajá) são os mais importantes representantes da fauna de quelônios da Amazônia, onde sua carne, vísceras e ovos servem de alimento para as comunidades locais e os seus cascos são utilizados como adorno e utensílios domésticos (PRITCHARD e TREBBAU, 1984). Além de ser uma espécie bastante consumida pelos ribeirinhos, *P. expansa* sofre com a exploração ilegal e a venda de quelônios capturados na natureza ainda é elevada no Estado do Amazonas. Atualmente *P. expansa* está classificada como 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, 2012).

Como o consumo de quelônios é um hábito arraigado na população local, houve a liberação para a criação em cativeiro da Tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) e o Tracajá (*Podocnemis unifilis*) a partir da publicação da portaria 142/92, ocorrendo assim um estímulo à construção de criadouros destinados a criação desses animais para fins econômicos, com o intuito de amenizar a atividade predatória e contribuir para a sua conservação. O crescimento de tartarugas em cativeiro em uma grande escala comercial já foi comprovado como economicamente praticável e *P. expansa* tem se reproduzido com sucesso em cativeiro nas praias artificiais (VOGT, 2008). Sendo o Estado do Amazonas o maior criador de quelônios do país, com 85 criadores registrados e cerca de 250.000 animais em cativeiro, sendo 27% em Manacapuru, 16% em Manaus, 16% em Rio Preto da Eva, 11% em Manicoré, 5% em Iranduba e 5% Itacoatiara, 5% em Parintins, 5% em Carauari, 5% no Careiro e 5% em São Gabriel da Cachoeira (ANÍZIO, 2008). E 87 praias reprodutivas (tabuleiros) protegidas em diferentes calhas do rio no Amazonas (ANDRADE, 2008).

## 2.4 Comportamento reprodutivo em quelônios

Como a maioria das espécies de Testudines são aquáticas, há uma dificuldade na observação de seu comportamento na natureza, muitas vezes faltando detalhes nas informações. Segundo Carpenter e Ferguson (1977) o comportamento dos répteis é considerado estereotipado, o que significa dizer que o padrão de comportamento observado na natureza pode ser o mesmo que o observado em cativeiro, sendo pouco alterado.

Como todos os répteis, as tartarugas apresentam fecundação interna e como possui uma grande cavidade corporal, as fêmeas são capazes de produzir e guardar uma grande quantidade de número de ovos. Durante suas interações sociais as tartarugas podem empregar sinais táteis, visuais e olfativos. Na época do acasalamento, os machos nadam à procura de fêmeas e 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).

De forma geral, observam-se 4 fases básicas no padrão de acasalamento entre os quelônios: (1) encontro do casal, (2) perseguição ou acompanhamento à fêmea, (3) pré-cópula e (4) cópula. Este padrão ocorre tanto em famílias de sub-ordens diferentes, como em espécies aquáticas e terrestres. Nem sempre todas as fases ocorrem, e algumas espécies exibem corte mais elaborada, com etapas adicionais (MOLINA, 1992).

No que diz respeito ao período reprodutivo de *P. expansa*, quando o rio está em seu nível mais baixo é quando inicia-se o comportamento de nidificação da espécie (ALHO e PÁDUA, 1982). Nesse período foi observado que grupos de fêmeas costumam tomar sol na praia, nas horas mais quentes do dia, por pelo menos duas a três semanas antes da nidificação. Esse comportamento está associado, presumivelmente, a uma rápida formação de ovos (VOGT, 2008).

Para as tartarugas a escolha do local de desova é de grande importância para o desenvolvimento embrionário de sua prole. Essa escolha possui reflexo no sexo dos filhotes, na sobrevivência dos embriões e na taxa de predação dos ninhos (SWINGLAND e STUBBS, 1985; FERREIRA JUNIOR, 2009). Geralmente grandes grupos de fêmeas de tartaruga nadam rio acima até as praias planas expostas onde preferem areia grossa à fina para a nidificação em profundidade de 1 a 2m. Os ninhos de *P. expansa* apresentam cerca de 80 cm de profundidade (IBAMA, 1989). Nos cativeiros, as praias artificiais para as tartarugas devem ser construídas com areia fina ou média, situadas às margens dos tanques, ou no centro, em forma de ilha. (ANDRADE, 2008).

Alho e Pádua (1982) reconhecem sete fases durante o comportamento de nidificação das tartarugas: (1) agregação da população nas águas rasas próximas a praia de nidificação; (2) subida a praia para se exporem ao sol durante as horas quentes do dia; (3) subida à praia à noite com caminhada de vistoria e escolha do sítio de nidificação; (4) escavação do ninho; (5) postura;

(6) preenchimento e compactação do ninho; (7) retorno à água. O tempo de ovoposição pode durar de 1,5 a 4 horas aproximadamente.

Para as espécies de *P. expansa* o período médio de incubação varia de acordo com a temperatura, sendo de aproximadamente 48 dias e apresentam uma taxa de fecundação de 85 a 98% desde que permaneçam em equilíbrio a umidade e temperatura, pois tanto esses dois fatores quanto as concentrações de oxigênio e dióxido de carbono exercem influência sobre o desenvolvimento embrionário das tartarugas. Em média a postura é de 87 ovos, sendo os ovos redondos de cascas flexíveis, com diâmetro de 36 a 49 mm e de 24 a 35 g (ALHO e PÁDUA, 1982; VOGT, 2008).

Os fatores ambientais exercem grande efeito na reprodução das tartarugas, como citada anteriormente à temperatura do ninho afeta a taxa de desenvolvimento embrionário e temperaturas excessivamente altas ou baixas podem ser letais. Além da temperatura, existe uma relação entre a duração da incubação com o sucesso da eclosão, de acordo com Ferreira Junior (2003) para *P. expansa* os ninhos com menor duração de incubação tiveram um menor sucesso de eclosão, possivelmente por causa das elevadas temperaturas.

A determinação do sexo dependente da temperatura foi demonstrada em algumas famílias de tartarugas, essa descoberta tem implicações importantes para a compreensão dos padrões de história de vida e também para a conservação das espécies (POUGH et al., 2008). Geralmente temperaturas mais elevadas resultam em fêmeas e temperaturas mais baixas em machos. Em um estudo realizado por Valenzuela (2001), sobre o efeito da temperatura na determinação sexual em filhotes de *P. expansa*, foi observado que temperaturas na faixa de 30,5 °C e 32,5 °C foram mais tendenciosas a produção de filhotes do sexo feminino, e temperaturas em torno de 29,5 °C resultaram em filhotes do sexo masculino. O mesmo foi observado por Vogt (2008) no rio Trombetas, em que temperaturas em torno de 34,5-35,4 °C produz principalmente indivíduos fêmeas.

É importante ressaltar que os filhotes de *P. expansa* não eclodem simultaneamente, havendo dois grupos com taxas de desenvolvimento diferenciadas, o que possivelmente é devido a diferenças de temperatura entre o topo e a base dos ninhos e que também pode gerar machos e fêmeas (MALVASIO et al., 2002).

## 2.5 Poliandria e armazenamento de esperma

A estratégia reprodutiva das fêmeas de tartarugas constitui aspectos muito interessantes. Mesmo que um único acasalamento seja suficiente para que ocorra a fertilização, essas fêmeas escolhem acasalar com vários machos, ou seja, apresentam comportamento poliândrico, o que resulta na paternidade múltipla dentro dos ninhos comumente observado na natureza (LEE e HAYS, 2004).

Um dos aspectos importantes da biologia reprodutiva das fêmeas de tartarugas é a capacidade de armazenar esperma em seus ovidutos por um longo período de tempo. Os túbulos de armazenamento de espermatozoides das tartarugas estão localizados na porção posterior da região secretora de albumina do oviduto (GIST e JONES, 1989). Entre os vertebrados, destacam-se por armazenarem por maior período de tempo esperma em seus ovidutos, as cobras e as tartarugas (PEARSE e AVISE, 2001).

Essa capacidade de estoque de esperma somada ao fato de que essas fêmeas acasalam com vários machos resulta em múltiplos reprodutores dentro de um mesmo ninho. Outra potencial consequência do armazenamento é, por exemplo, uma fêmea que acasalou com um macho de alta qualidade, optar por não acasalar no ano seguinte, mas utilizar o esperma desse macho para fertilizar ovos adicionais numa segunda época de nidificação (PEARSE e AVISE, 2001). Em cativeiro, de acordo com Olsson e Madsen (1998), o armazenamento de esperma está bem estabelecido, uma vez que foi observado que tartarugas fêmeas isoladas de machos, continuam a produzir descendentes ao longo do tempo.

As evidências de múltiplos reprodutores em um mesmo ninho também pode ser resultado da competição de esperma, que é possível uma vez que as fêmeas de tartarugas possuem a capacidade de armazenar espermatozoides de múltiplos acasalamentos, por exemplo, a evidência de paternidade múltipla na espécie *Testudo horsfeldii* pode ser resultado da competição de esperma, e isso sugere que a escolha de acasalamento da fêmea trás bons benefícios (JOHNSTON et al., 2006). No entanto, estudos recentes na espécie *Chelonia mydas* (tartaruga marinha conhecida como tartaruga verde) discutem sobre os significativos custos para as fêmeas em seus múltiplos acasalamentos. Muitas vezes o resultado de acasalar com vários machos as expõe à doença (THRALL et al., 2000), aumento no risco de predação (ROWE, 1994), tempo e

custo de energia bem como danos físicos (WATSON et al., 1998). A persistência das fêmeas nesse tipo de acasalamento deve ser compensada pelos benefícios que a prole obtém (LEE e HAYS, 2004; WRIGHT et al., 2013).

De forma geral, essa decisão das fêmeas de escolherem acasalar com vários machos incluem possíveis benefícios genéticos para a prole como a manutenção da diversidade genética dos descendentes. No entanto, para as fêmeas não há nenhum benefício genético direto, porém o efeito da promiscuidade feminina resulta em garantia de fertilização, seleção de esperma e redução dos custos resultantes de falhas reprodutivas por incompatibilidade genética (STOCKLEY et al., 1993; LEE e HAYS, 2004). O conhecimento a respeito do comportamento de acasalamento das fêmeas é importante quando se pensa em espécies ameaçadas de extinção, pois espécies com diferentes sistemas reprodutivos requerem manejo diferenciado, sendo vital a identificação desses sistemas (FRANKHAM et al., 2008).

## 2.6 Genética da Conservação

O estudo de todas as informações biológicas a respeito de uma espécie (modo de vida, comportamento, alimentação, habitat e etc.) contribui para uma melhor estratégia de conservação. É exatamente isso do que se trata a genética da conservação, é uso tanto da teoria quanto das técnicas da genética para reduzir o risco de extinção das espécies ameaçadas. Além disso, o foco da genética da conservação está em averiguar quais são as consequências da diminuição de uma população ameaçada e também inclui o uso de técnicas de genética molecular para investigar informações biológicas importantes para o manejo e conservação adequados de uma espécie (FRANKHAM et al., 2008).

A matéria bruta nos estudos de biodiversidade molecular é a mesma envolvida na evolução das espécies: a variabilidade gênica. O uso da genética auxilia no conhecimento da diversidade de alelos nos vários locos de uma espécie, e é esta variabilidade que nos permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes (SOLÉ-CAVA, 2001). O componente genético da biodiversidade é fundamental, pois é a variação genética que fornece o material

básico para a seleção natural e, portanto, para a evolução de todas as espécies (ALLCOCK et al., 1995)

Normalmente populações naturais apresentam altos níveis de variação genética. Essa variação é introduzida continuamente nas populações por mutação ou migração de indivíduos de outras populações e é perdida por deriva genética e por endocruzamento (SOLÉ-CAVA, 2001). Dessa forma, um dos objetivos buscados na conservação das espécies é a manutenção da heterozigosidade e a diminuição do endocruzamento, principalmente com espécies mantidas em cativeiro para a recolonização (BORLASE et al., 1993; AVISE e HAMRICK, 1996). O endocruzamento pode ser evitado, através da manutenção dos tamanhos populacionais acima de um nível crítico, com o monitoramento regular dos níveis de heterozigosidade e com cruzamentos que maximizem a variabilidade gênica e minimizem o endocruzamento (BORLASE et al., 1993).

A variabilidade genética é, portanto, importante para a persistência evolutiva das espécies e como instrumento de investigação possui inúmeras funções: verificar as afinidades e os limites entre as espécies, detectar modos de reprodução e estrutura familiar, estimar níveis de migração e dispersão nas populações e até mesmo ajudar na identificação de restos de animais, como conteúdos estomacais e produtos industrializados (AVISE, 1994). As análises genéticas geram informações importantes sobre o sistema reprodutivo, paternidade, sexo e relações de parentesco entre os indivíduos fundadores.

Como a Genética da Conservação está interligada a Ecologia Molecular, dentre as técnicas de genética molecular disponíveis encontram-se os marcadores genéticos que apresentam grande potencial para o estudo da biodiversidade molecular nas populações naturais das espécies sob impacto antropogênico, sendo esse o objetivo central da genética da conservação (SOLÉ-CAVA, 2001)

Entre os marcadores moleculares empregados nos estudos populacionais, evolutivos e/ou voltados para a conservação destacam-se: a eletroforese de proteínas, que deu início aos estudos genéticos em populações naturais; estudos com RFLP (*Restriction fragment Length Polymorphism*) e sequenciamento do DNA mitocondrial (mtDNA) ou genes nucleares; DNA *fingerprinting* utilizando sondas para regiões minissatélites; RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); e polimorfismos em regiões de microssatélites (AVISE, 1994; EIZIRIK, 1996).

## 2.7 Marcadores moleculares

Marcador molecular é definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, ou ainda de uma sequência direta da estrutura do DNA. Quando seu comportamento segue os padrões mendelianos de herança, o marcador é denominado marcador genético (AVISE, 2004).

Do ponto de vista da genética da conservação, o fato de que marcadores moleculares diferentes podem ter taxa de substituição/evolução diferentes, de modo que, através de uma escolha judiciosa desses marcadores, podemos estudar desde problemas de identificação de indivíduos à identificação de espécies crípticas ou formulação de hipóteses filogenéticas. Os marcadores disponíveis atualmente podem ser classificados de acordo com a existência de dominância: padrões com dominância, como os gerados com RAPD ou AFLP, são menos úteis em análises populacionais, pois existe um pressuposto importante, o equilíbrio de Hardy-Weinberg, para que possam ser estimadas as frequências gênicas a partir dos dados brutos obtidos. Podem ainda ser classificados em relação à possibilidade de viés sexual (DNA mitocondrial é em geral transmitido apenas pelas fêmeas), às taxas evolutivas (microssatélites e RAPDs evoluem muito rapidamente, aloenzimas evoluem mais lentamente) (SOLÉ-CAVA, 2001).

Para cada estudo, a escolha do método adequado a ser utilizado deve ser avaliado. Marcadores que evoluem rapidamente são úteis para o estudo de indivíduos, famílias e populações, enquanto que marcadores que evoluem mais lentamente são melhor utilizados no estudo de espécies ou táxons supra-específicos. A escolha do marcador ideal para o tipo de estudo a ser realizado é crítica, pois, ao escolher um marcador que evolui de forma demasiadamente lenta para o nível estudado, terá pouca variabilidade e uma saturação de plesiomorfias nos dados (ou seja, todas as semelhanças observadas serão devidas à ancestralidade dos alelos, e não haverá eventos novos capazes de discriminar os grupos estudados). E ao escolher um marcador que evolui rápido demais para o nível estudado, se terá um excesso de variabilidade e uma saturação de homoplasia nos dados (ou seja, as semelhanças observadas serão frequentemente devidas à convergência acidental dos alelos, devido ao caráter



finito do espaço amostral, e serão cometidos erros na discriminação dos grupos) (SOLÉ-CAVA, 2001). Para cada estudo uma escolha de abordagem diferente será utilizada.

De forma geral, o uso de marcadores moleculares nos estudos de genética populacional, filogenéticos ou ecológicos tem sido bastante úteis para responder certas questões da biologia de uma espécie a fim de que estratégias corretas de manejo e conservação possam ser empregadas a partir do conhecimento obtido pelo uso da genética molecular. Em princípio qualquer marcador variável, transmitido de pais para filhos pode ser utilizado em análises de parentesco, no entanto, certos tipos de marcadores são mais adequados para esta aplicação do que outros, portanto a escolha do marcador a ser utilizado é muito importante/crítica porque deve estar de acordo com o estudo a ser investigado.

Segundo Queller et al. (1993), o marcador molecular ideal para estudo genômicos seria um de fácil uso e que diferenciasse locos com alelos co-dominantes, que fornecesse valores não ambíguos, e preferivelmente com alta variação.

### 2.7.1 Marcadores microssatélites

Os eucariotos possuem em seu genoma uma fração significativa de sequências de DNA repetitivo. Nesta classe de DNA repetitivo encontram-se as sequências altamente repetitivas (minissatélites e microssatélites). Estas regiões apresentam altas taxas mutacionais muito maiores do que as observadas nas sequências de cópia única, assim são regiões instáveis do genoma. Essa instabilidade resulta em marcadores altamente polimórficos, multialélicos, ideais para o estudo da genética. Os marcadores microssatélites também são conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou STR (*Short Tandem Repeat*) (LITT e LUTY, 1989).

Locos de microssatélites são repetições em *tandem* com um à quatro nucleotídeos de comprimento, altamente variáveis no número de repetições e flanqueiam sequências conservadas (AVISE, 1994). No caso dos microssatélites, a natureza da variação consiste no número de repetições que existem nas unidades repetidas (TAUTZ, 1989). O número de nucleotídeos repetidos classifica-se em: mononucleotídeos, dinucleotídeos, trinucleotídeos e tetranucleotídeos



replicação, esta enzima pode parar sua atividade, provocando a dissociação das fitas de DNA. Por se tratar de sequências altamente repetitivas, a homologia entre as mesmas é grande. Assim, quando as fitas voltam a se anelar, nem sempre ocorre o alinhamento correto das repetições. A fita que não se alinhou forma uma alça, que pode levar as adições ou deleções de algumas repetições. O segundo mecanismo relaciona-se com a ocorrência de *crossing over* desiguais entre as fitas de DNA não alinhadas, podendo ocorrer entre cromátides irmãs ou mesmo entre cromossomos diferentes, gerando grandes adições ou deleções de sequências repetitivas (LEVINSON e GUTMAN, 1987; MOXON e WILLS, 1999).

As principais características dos microssatélites são: a alta especificidade (as sequências de DNA são bastante conservadas entre os indivíduos da mesma espécie), são marcadores co-dominantes (ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto podem ser visualizados), ampla e uniformidade na distribuição dos genomas dos eucariotos, altamente multialélicos, amplificados via PCR (o que facilita sua obtenção mesmo com poucas quantidades de DNA) e uma vez desenvolvidos os *primers* que amplificam tais regiões do genoma, estes podem ser facilmente compartilhados entre os laboratórios (LIMA e BITTENCOURT, 2008)

Os microssatélites têm sido a principal ferramenta em estudos de análise de parentesco, como a determinação do tipo de paternidade, pois apresentam vantagens sobre os outros métodos 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).

## 2.8 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* (KICHLER et al., 1999; HOEKERT et al., 2002; JENSEN

et al., 2006) 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* (RIEDER et al., 1998; DUTTON et al., 2000; CURTIS et al., 2000). 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 expansa* (VALENZUELA, 2000; PEARSE et al., 2006), *Podocnemis unifilis* (FANTIN et al., 2008), *Podocnemis sextuberculata* (FANTIN et al., 2008; PEREIRA et al., 2011) e *Podocnemis erythrocephala* (FANTIN et al., 2010).

O primeiro estudo em espécies do gênero *Podocnemis* foi o de Valenzuela (2000), que evidenciou em 2 ninhos de *Podocnemis 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 (2000), estudou 32 ninhos de *P. expansa* da Isla 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 (VALENZUELA, 2000; PEARSE et al., 2006) 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 et al. (2008), que evidenciou a presença de paternidade múltipla em seis ninhos de *P. unifilis* de Barreirinha-AM utilizando oito locos de microssatélites, por Fantin (2008) em *P. sextuberculata* de Barreirinha-AM, em sete ninhos utilizando seis locos de microssatélites e Fantin et al. (2010) que também verificaram paternidade múltipla ao utilizar 4 locos de microssatélites em 6 ninhos de *P. erythrocephala* de 2 locais da Amazônia brasileira. 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.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, v. 12. nº 2, p. 323-326, 1982.

ALLCOCK, A. L.; CHAUVET, M.; CRANDALL, K. A.; GIVEN, D. R.; HALL, S. J. G.; IRIONDO, J. M.; LEWINSOHN, T. M.; LYNCH, S. M.; SOLÉ-CAVA, A. M.; STACKEBRANDT, E.; TEMPLETON, A. R. WATTS, P.C. Genetic diversity as a component of biodiversity. In: HEYWOOD, V. H.; WATSON, R. T. (eds.). *Global Biodiversity Assessment*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 57-88.

ANDRADE, P. C. M. Criação e Manejo de Quelônios no Amazonas. Projeto Diagnóstico da Criação de Animais Silvestres no Estado do Amazonas. In: I Seminário de Criação e Manejo de Quelônios da Amazônia Ocidental. 1ª Edição. FAPEAM/SDS. Manaus/AM. p. 447 , 2004

ANDRADE, P. C. M. **Criação e Manejo de quelônios no Amazonas. Projeto Diagnóstico da criação de quelônios no Estado do Amazonas, Manaus - IBAMA, Pró-várzea/Aquabio.** 528 p, 2008.

ANÍZIO, T. L. F. **Avaliação dos sistemas de produção e da cadeia produtiva da criação comercial de quelônios nos municípios de Iranduba, Manacapuru e Itacoatiara.** Monografia de conclusão de Curso, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 54p, 2008.

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

AVISE, J. C.; HAMRICK, J. L. **Conservation Genetics: Case Histories from Nature.** Chapman & Hall, New York, 512 p, 1996.

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

BORLASE, S. C.; LOEBEL, D. A.; FRANKHAM, R.; NURTHEN, R. K.; BRISCOE, D. A.; DAGGARD, G. E. Modeling problems in conservation genetics using captive *Drosophila*

populations: consequences of equalization of family sizes. **Conserv. Biol.** v. 7, nº 1, p. 122—131, 1993

CARPENTER, C. C.; FERGUSON, G. W. Variation and evolution of stereotyped behavior in reptiles, p. 335-554. In: GANS, C.; TINKLE, D. W. (eds.), **Biology of the Reptilia**. Academic Press, London, 1977.

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

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.

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.

DUTTON, P.; BIXBY, E.; DAVIS, S. Tendency towards single paternity in leatherbacks detected with microsatellites. In: Proc 18<sup>th</sup> 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.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de Unidades Evolutivamente Significativas. **Revista Brasileira de Genética** (Suplemento), v. 19, p. 23-29, 1996.

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. **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.; FARIA, 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 Researches**, p. 435-440, 2010.

FERREIRA JUNIOR, P. D. **Influência dos processos sedimentológicos e geomorfológicos na escolha das áreas de nidificação de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-amazônia) e *Podocnemis unifilis* (tracajá) na bacia do rio Araguaia**. Tese de doutorado, Departamento de Geologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, 296 p, 2003.

FERREIRA JUNIOR, P. D. Efeitos de Fatores Ambientais na Reprodução de Tartarugas. **Acta Amazônica**, v. 39, p. 319-334, 2009.

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.

GIST, D. H.; JONES, J. M. Sperm storage within the oviduct of turtles. **Journal Morphol**, v. 199, p. 379–384, 1989.

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.

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

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.

IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em 10 February 2012.

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.

JOHNSTON, E. E.; ZWEIFEL, S. G. Detection of multiple paternity and sperm storage in a captive colony of the central Asian tortoise, *Testudo horsfieldii*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 84, p. 520–526, 2006

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 Acad Sci. USA.** v. 101, p. 6530–6535, 2004.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology Evolution**, v. 4, p. 203-221, 1987.

LIMA, M. L. A.; BITTENCOURT, J.V. Marcadores Codominantes Microsatélites. In: BITTENCOURT, J. V. M.; LIMA, M. L. A. (eds.). **Manual de Biologia Molecular em Plantas Arbóreas**. Curitiba: CBAB, p. 157, 2008.

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.

MALVASIO, A.; SOUZA, A. M.; FERREIRA JÚNIOR, P. D.; REIS, E. S.; SAMPAIO, F. A. A. Temperatura de incubação dos ovos e granulometria dos sedimentos das covas relacionadas à determinação sexual em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e *P. unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae). **Publicações Avulsas do Instituto Pau Brasil de História Natural**. São Paulo, v. 5, nº 1, p. 11-25, 2002.

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.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v. 3, p. 175-182, 1993.

MOXON, R. E.; WILLS, C. DNA Microsatellites: Agents of Evolution? **Scientific American**, p. 72-77, 1999.

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.

OLSSON, M.; MADSEN, T. Sexual selection and sperm competition in reptiles. In: BIRKHEAD, T. R.; MOLLER, A. P. (eds). **Sperm competition and sexual selection**. San Diego: Academic Press. p. 503–578, 1998.

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.

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, n° 2, p. 232-238, 2006.

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 Makers. In: XL Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, **Resumo**, Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011.

PRITCHARD, P. C. H. Distribution of tortoises in tropical South America. **Chelonia**. San Francisco, v. 2, n° 1, p. 3-10, 1975.

QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R. Microsatellites and kinship. **Tree**, v. 8, p. 285-298, 1993.

REBELO, G.; PEZZUTI, J. Percepções sobre o consumo de quelônios na Amazônia. Sustentabilidade e alternativas ao manejo atual. **Ambiente & Sociedade**, nº 6, 2000.

RIEDER, J.; PARKER, P.; SPOTILA, J.; IRWIN, M. The mating system of the leatherback turtle: a molecular approach. In: Proc 16<sup>th</sup> 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-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.

ROWE, L. The costs of mating and mate choice in water striders. **Anim Behav.**, v. 48, p. 1049–1056, 1994.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. (ed). **Biologia Molecular e evolução**. Ribeirão Preto. Ed. Holos, 2001

STOCKLEY, P.; SEARLE, J. B.; MACDONALD, D. W.; JONES, C. S. Female multiple mating behaviour in the common shrew as a strategy to reduce inbreeding. **Proceedings of the Royal Society of London Series**. p.173–179, 1993.

SWINGLAND, I. R.; STUBBS, D. The ecology of a Mediterranean tortoise (*Testudo hermanni*): reproduction. **Journal Zool. Lond.**, v. 205, p. 595-610, 1985.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nuc. Acids Res.**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

THRALL, P.H.; ANTONOVICS, J.; DOBSON, A. P.; 2000. Sexually transmitted diseases in polygynous mating systems: prevalence and impact on reproductive success. **Proc Biol Sci.**, v. 267, p. 1555–1563, 2000.

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.

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

VALENZUELA, N. Constant, shift, and natural temperature effects on sex determination in *Podocnemis expansa* turtles. **Ecology**, v. 82, n° 11, p. 3010-3024, 2001

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

WATSON, P. J.; ARNQVIST, G.; STALLMANN, R. R. Sexual conflict and the energetic costs of mating and mate choice in water striders. **Am Nat.**, v. 151, p. 46–58, 1998.

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

WRIGHT, L. I.; FULLER, W. J.; GODLEY, B. J.; MCGOWAN, A.; TREGENZA, T.; BRODERICK, A. C.; No benefits of polyandry to female green Turtles. **Behavioral Ecology**, 2013.

ZBINDEN, J. A.; LARGIADER, C. R.; LEIPPERT, F.; MARGARITOUULIS, 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.

## CAPÍTULO I

**ANÁLISE DE PARENTESCO ENTRE FILHOTES DA TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA  
(*Podocnemis expansa*) PROVENIENTES DE CATIVEIRO E NATUREZA  
UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES**

## “ANÁLISE DE PARENTESCO ENTRE FILHOTES DA TARTARUGA-DA-AMAZONIA (*Podocnemis expansa*) PROVENIENTES DE CATIVEIRO E NATUREZA UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES”

### Resumo

Foram utilizados 5 locos de microssatélites para investigar a incidência de paternidade múltipla em filhotes de *Podocnemis expansa* provenientes de um cativeiro localizado na Fazenda São Francisco, Manacapuru-AM, e de natureza no rio Juruá, Carauari-AM. Foram genotipados no total 356 filhotes somados das duas localidades e a análise dos resultados revelou 100% a ocorrência de paternidade múltipla tanto em cativeiro quanto em natureza. O número de alelos encontrado em cada ninho foi usado para determinar o número de machos contribuindo em cada prole por meio da distribuição mendeliana de alelos na progênie. Com base nesse critério foi possível estimar a contribuição de no mínimo 10 machos nas amostras de cativeiro e de no mínimo 9 machos nas amostras de natureza. Estas foram as maiores incidências já registradas do número de machos contribuindo na prole de *P. expansa*. Esses resultados possuem grande implicação na conservação dessa espécie, pois a presença de paternidade múltipla é importante para a manutenção da variabilidade genética e tem importantes consequências no aumento do tamanho efetivo de uma população em relação à paternidade única.

### 1 Introdução

Muitos estudos de comportamento reprodutivo realizados por meio da análise molecular em quelônios, reportam paternidade múltipla ocorrendo em diferentes espécies. Nas tartarugas marinhas já foi observada a ocorrência nas espécies: *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* (KICHLER et al., 1999;

HOEKERT et al., 2002; JENSEN et al., 2006) e *Natator depressus* (THEISSINGER et al., 2009). Estudos em tartarugas de água doce também evidenciaram paternidade múltipla nas espécies: *Chrysemys picta* (MCTAGGART, 2000; PEARSE et al., 2001), *Emydoidea blandingii* (REFSNIDER, 2009) e *Emys orbicularis* (ROQUES et al., 2006). Em espécies do gênero *Podocnemis*, estudos anteriores comprovaram a presença de paternidade múltipla em *Podocnemis expansa* (VALENZUELA, 2000; PEARSE et al., 2006), *Podocnemis unifilis* (FANTIN, 2008), *Podocnemis sextuberculata* (FANTIN, 2008; PEREIRA et al., 2011) e *Podocnemis erythrocephala* (FANTIN et al., 2010).

Essa evidência é possível, uma vez que já se sabe que esses animais apresentam comportamento poliândrico (LEE e HAYS, 2004), e que as fêmeas possuem a capacidade de armazenar esperma de múltiplos acasalamentos em sua cavidade interna por longos períodos de tempo (PEARSE e AVISE, 2001). Esse comportamento poliândrico, que explica a ocorrência de paternidade múltipla, pode ser atribuído a diversos fatores como benefícios genéticos indiretos para a prole, assim como o aumento da variabilidade genética da progênie (PEARSE et al., 2001; PEARSE et al., 2006), diminuição da probabilidade de endogamia e a redução dos custos resultantes de falhas reprodutivas por incompatibilidade genética (STOCKLEY et al., 1993). Por outro lado, alguns autores ressaltam que esse comportamento da fêmea de acasalar com vários machos resulta em exposição à doença (THRALL et al., 2000), aumento no risco de predação (ROWE, 1994), tempo e custo de energia, bem como danos físicos (WATSON et al., 1998). A persistência das fêmeas nesse tipo de acasalamento deve ser compensada pelos benefícios que a prole obtém (LEE e HAYS, 2004; WRIGHT et al., 2013). Como muitos estudos já observaram a ocorrência de paternidade múltipla em diversas espécies de vertebrados e invertebrados (REFSNIDER, 2009), podemos afirmar que paternidade múltipla não é mais novidade, contudo não deixa de ser uma informação importante a respeito da biologia da espécie, pois poliandria e paternidade múltipla são estratégias reprodutivas com implicações potenciais para a conservação das espécies.

Conhecida popularmente como Tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa* é o maior Pleurodira e também o maior quelônio de água doce na América do Sul (VOGT, 2008). Possui ampla distribuição, podendo ser encontrada nos maiores tributários 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 (VOGT, 2008). O tamanho da sua ninhada é grande,

sendo a postura média de aproximadamente 100 ovos (ALHO e PÁDUA, 1982). *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* (tracajá) são os mais importantes representantes da fauna de quelônios da Amazônia, onde sua carne, vísceras e ovos servem de alimento para as comunidades locais e os seus cascos são utilizados como adorno e utensílios domésticos (PRITCHARD e TREBBAU, 1984). Por esse motivo são as espécies mais procuradas para a criação com finalidade comercial. Além de ser uma espécie bastante consumida, *P. expansa* sofre com a exploração ilegal e a venda de quelônios capturados na natureza ainda é elevada no Estado do Amazonas. Atualmente *P. expansa* está classificada como 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, 2011).

Como medida de conservação para essas espécies é que em 1992, após a aprovação de uma lei, houve então a liberação para a criação em cativeiro da Tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) e o Tracajá (*Podocnemis unifilis*) a partir da publicação da portaria 142/92, ocorrendo assim um estímulo à construção de criadouros destinados a criação desses animais para fins econômicos. Essa lei permite a criação desses quelônios para a venda como alimento na Amazônia a fim de diminuir a pressão de captura na natureza, dessa forma o IBAMA fornece aos criadores cadastrados, cerca de 4000 filhotes com o compromisso de criá-los até a idade adulta e reproduzi-los em cativeiro. Porém, a falta de suporte técnico aos órgãos governamentais e aos criadores, sobre a biologia da espécie e a dinâmica de populações de quelônios, fazem com que as criações existentes no Estado venham sendo desenvolvidas com base no empirismo (ANDRADE, 2004).

Evidências de paternidade múltipla já foram observadas em *Podocnemis expansa* por Valenzuela (2000) e Pearse et al. (2006) em filhotes provenientes de natureza, entretanto ainda não foram documentadas evidências de seu comportamento reprodutivo em cativeiro. Existe a probabilidade de que múltiplos acasalamentos ocorram com maior frequência entre indivíduos de cativeiro, já que nestes locais os indivíduos estão dispostos mais próximos um do outro do que na natureza. Como *P. expansa* apresenta demorada maturação sexual, ocorrendo apenas entre os 11 a 15 anos na fêmea e 7 anos para os machos (IBAMA, 1989), a poliandria pode ser uma importante estratégia para manter a diversidade genética de seus descendentes.

A conservação da diversidade genética de *Podocnemis expansa* requer um entendimento a respeito de seu comportamento reprodutivo, com base nisso, nesse estudo foram utilizados

marcadores microssatélites para avaliar o grau de parentesco entre filhotes dessa espécie provenientes de cativeiro e provenientes da natureza, a fim de investigar a presença de paternidade múltipla nesses dois ambientes e comparar se o que foi observado na natureza é o mesmo que acontece em cativeiro, já que a frequência de paternidade múltipla varia entre as espécies de quelônios. As informações obtidas nesse estudo em adição a outros dados a respeito da biologia da espécie contribuirão para uma melhor estratégia de conservação e manejo de *P. expansa*.

## 2 Material e Métodos

Foram estudadas amostras sanguíneas de *Podocnemis expansa* de indivíduos recém eclodidos de 12 ninhos previamente coletados. No total foram analisados 191 filhotes de cativeiro, provenientes da Fazenda São Francisco, Manacapuru-AM, distribuídos da seguinte forma em cada ninho: N1=37, N2=37, N3=36, N4=29, N5=30 e N6=22. Também foram analisados no total 165 filhotes provenientes do rio Juruá, Carauari-AM, distribuídos da seguinte forma: N7=30, N8=30, N9=23, N10=32, N11=21 e N12=29. O método utilizado para a coleta de sangue foi através da punção da veia femural utilizando seringa de 1mL, coletando até 100 µL de sangue e armazenando-os em microtubos de 2mL contendo 500 µL de etanol absoluto, e armazenados a 4°C. Após a coleta de sangue, os filhotes foram libertados no local de origem.



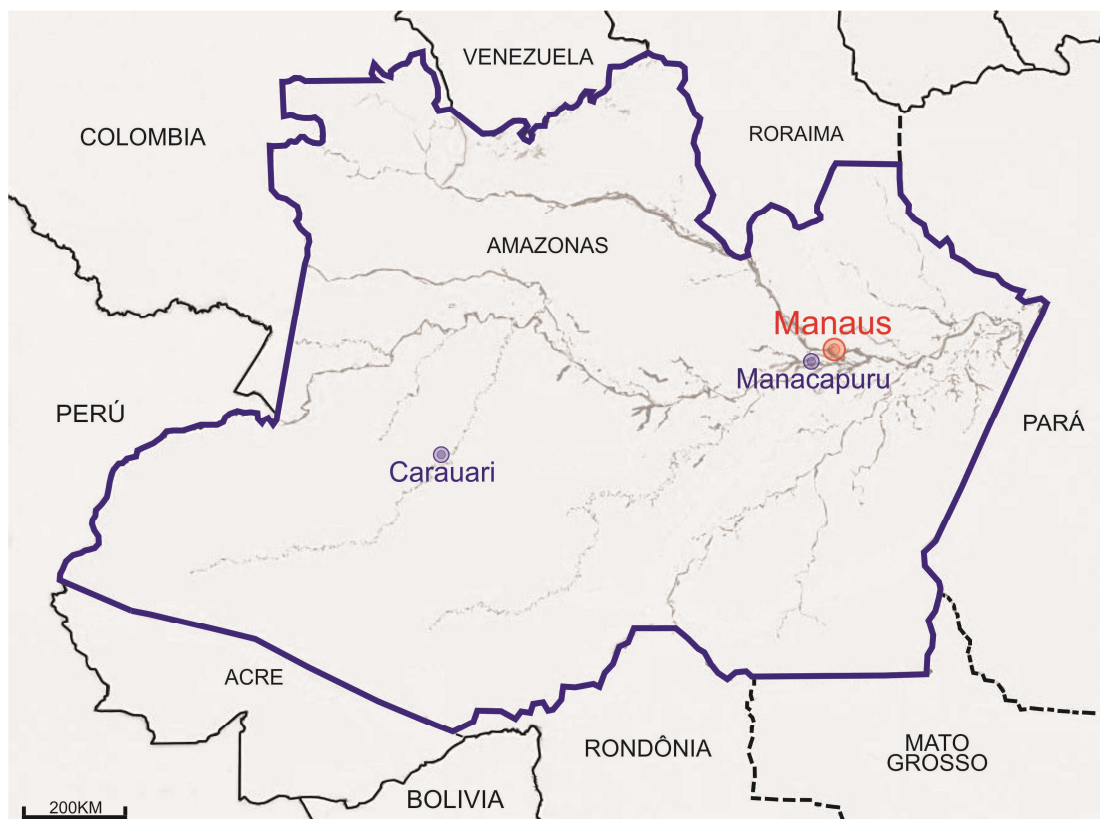


Figura 1. Mapa mostrando os 2 locais de coleta dos ninhos de filhotes de *P. expansa*.

Fonte: Google Earth, 2013.

O DNA genômico foi extraído pelo método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987), com algumas modificações. Para a amplificação do DNA, foram utilizados 5 locos de microssatélites, sendo 2 locos descritos por Fantin et. al. (2007) e 3 locos descritos por Valenzuela (2000), cujas descrições estão detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição das características dos locos de microssatélites que foram utilizados para as análises.

<b>Loco</b>	<b>Repetição</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Referência</b>
Puni_1D12	(GA) <sub>10</sub>	55	Fantin et al. (2007)
Puni_1E1	(CT) <sub>9</sub> tt(CT) <sub>7</sub>	64	Fantin et al. (2007)
PE344	(AG) <sub>13</sub>	50	Valenzuela (2000),
PE519	(CT) <sub>7</sub> (CA) <sub>8</sub> (CG) <sub>2</sub> (CA) <sub>8</sub>	56	Valenzuela (2000),
PE1075	(AC) <sub>11</sub>	54	Valenzuela (2000),

A amplificação do DNA via PCR (Reação em cadeia da polimerase) utilizando o protocolo econômico descrito por Schuelke (2000), com volume final de reação 13,5µL: 4,8µL de H<sub>2</sub>O, 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1,5µL de dNTP mix (0,2 µM de cada dNTP), 1,5µL de PCR Buffer, 0,75µL do *primer forward* M13 (0,2 µM), 0,75µL do *primer* M13 (TET) (0,2 µM), 1,5µL do *primer reverse* (0,2 µM), 0,2µL de Taq polimerase (2U/ul) e 1,0 µL de DNA. As condições de termociclagem foram: temperatura inicial de desnaturação de 94°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos à 94°C por 50 segundos; 55°C à 64°C, dependendo da temperatura específica de hibridização para cada *primer* por 50 segundos; e 72°C por 1 minuto, logo após, 20 ciclos à 94°C por 40 segundos, 53°C por 35 segundos e 72°C por 40 segundos, para hibridização do *primer* M13 e extensão final à 72°C por 20 minutos. O produto amplificado foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para que sua eficiência fosse verificada. Em seguida, os produtos de PCR foram diluídos na proporção de 1:100 e adicionando o marcador de tamanho ROX pUC-19 (90, 105, 131, 151, 182, 201, 254, 306, 337, 362, 425, 486, 509 e 560) modificado de DeWoody et al. (2004). As genotipagens foram realizadas no sequenciador automático de DNA ABI 3130xl. A análise dos alelos observados para cada loco, foi por meio do programa GeneMarker V2.2.0.

A frequência alélica de cada loco analisado na população foi calculada pelo programa Arlequin 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005). A partir das frequências obtidas dos 5 locos de microssatélites foram calculadas as probabilidades de identidade genética (I) e exclusão de paternidade (Q) de acordo com Paetkau et al. (1995) e Weir (1996) respectivamente. Assim

como o cálculo de probabilidade conjunta: de identidade genética (IC) e de exclusão de paternidade (QC). A probabilidade de identidade genética (I) é um parâmetro que calcula a possibilidade de dois indivíduos, não relacionados, possuírem o mesmo genótipo dentro de uma população, já a probabilidade de exclusão de paternidade é o parâmetro que se baseia na exclusão de vários machos, envolvidos no acasalamento, mas que podem ser estaticamente distinguidos. É possível excluir por esse método prováveis pais escolhidos ao acaso na população em estudo. Se os valores de probabilidade de exclusão forem próximos de 1, é 100% confiável excluir corretamente um indivíduo da paternidade.

Para a identificação de possíveis erros de genotipagem devido a alelos nulos nos microssatélites de populações diplóides, foi utilizado o programa Micro-Checker (OOSTERHOUT et al., 2004) que estimou a frequência desses alelos para os locos de microssatélites estudados.

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

Outro método de análise foi por meio do programa Kinalyzer (BERGER-WOLF et al., 2007) que infere grupos de irmãos utilizando o genótipo de marcadores co-dominantes, como os microssatélites. A partir da análise de herança mendeliana e inferência de combinações sob o pressuposto de parcimônia, é formulado um algoritmo que então reconstrói corretamente o menor grupo de irmãos sob estas restrições. Esse método não depende do conhecimento prévio da população em estudo, sendo apropriado então para reconstruir grupos de irmãos de populações selvagens.

### 3 Resultados

#### 3.1 Caracterização dos locos de microssatélites

Todos os cinco locos utilizados mostraram-se bastante polimórficos para o estudo de análise de parentesco em *Podocnemis expansa*. Dentre os locos analisados, o loco PE519 mostrou-se o mais polimórfico, apresentando 32 alelos diferentes para as amostras de cativeiro e 29 alelos diferentes para as amostras de natureza. Para os filhotes provenientes de cativeiro o número de alelos variou entre 19-32 por loco, com uma média de 26,4 alelos, e para os filhotes de natureza os alelos variaram entre 15-29 alelos por loco, com uma média de 22,4 alelos (Tabela 2).

De modo geral, a probabilidade de identidade genética conjunta foi baixa (cativeiro -  $IC=1,08 \times 10^{-6}$ ; natureza -  $IC=2,85 \times 10^{-6}$ ), e isso demonstra o poder de discriminação desses locos em relação a dois indivíduos não relacionados apresentarem o mesmo genótipo. Enquanto que a probabilidade de exclusão de paternidade foi alta (cativeiro -  $QC=0,9999$ ; natureza -  $QC=0,9999$ ), indicando uma probabilidade de cerca de 99,99% de uma eficiente detecção de paternidade múltipla desses locos em *P. expansa* (Tabela 2).

A heterozigosidade observada variou entre 0.61081 (PE519) e 1.00000 (Puni\_1D12) para as amostras de cativeiro e para as amostras de natureza variou entre 0,59748 (PE1075) e 1.00000 (Puni\_1D12). Para os dois ambientes estudados somente o loco Puni\_1D12 apresentou excesso de heterozigosidade ( $P<0,001$ ), enquanto que os locos Puni\_1E1, PE344, PE519 e PE1075 apresentaram baixa heterozigosidade ( $P<0,001$ ). Em geral, tanto em cativeiro quanto em natureza, foi observado que todos os locos de microssatélites estudados não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, e isso pode em parte ser explicado pelo excesso de homozigotos que foi encontrado em três locos - Puni\_1E1, PE344 e PE519 - conforme as análises realizadas utilizando o software Micro-Checker (OOSTERHOUT et al., 2004), após a correção de Bonferroni para múltiplas comparações (RICE, 1989). De acordo com as análises, os locos que apresentaram a presença de alelos nulos e excesso de homozigotos foram os locos: Puni\_1E1, PE344 e PE519. Já os locos Puni\_1D12 e PE1075 não apresentaram alelos nulos. Em seu estudo

com *P. expansa*, Valenzuela (2000) também observou baixa heterozigosidade e ausência de alelos nulos para o loco PE1075.

Tabela 2. Caracterização dos cinco locos de microssatélites em *Podocnemis expansa* proveniente de cativeiro e natureza. Sendo: A – número de alelos, Ho – Heterozigosidade observada, He – Heterozigosidade esperada, I – probabilidade de identidade genética, Q – probabilidade de exclusão de paternidade, IC – probabilidade combinada de identidade genética, QC – probabilidade de exclusão conjunta para os cinco locos. \*Valores significantes  $P < 0,001$ .

Amostras Cativeiro						
Loco	A	Ho	He	I	Q	Referência
Puni_1D12	19	1.00000*	0.91625	0,0139	0,8308	Fantin et al. (2007)
Puni_1E1	28	0.62778*	0.93545	0,0085	0,8610	Fantin et al. (2007)
PE344	22	0.67045*	0.93229	0,0088	0,8610	Valenzuela (2000)
PE519	32	0.61081*	0.90364	0,0168	0,8174	Valenzuela (2000)
PE1075	31	0.62295*	0.94542	0,0062	0,8871	Valenzuela (2000)
Média	26,4	0,70639	0,92661	$IC=1,08 \times 10^{-6}$	$QC=0,999935$	

Amostras Natureza						
Loco	A	Ho	He	I	Q	Referência
Puni_1D12	20	1,00000*	0,93025	0,0100	0,8567	Fantin et al. (2007)
Puni_1E1	15	0,76774*	0,90356	0,0183	0,8059	Fantin et al. (2007)
PE344	23	0,63580*	0,93202	0,0095	0,8602	Valenzuela (2000)
PE519	29	0,76316*	0,89999	0,0190	0,8084	Valenzuela (2000)
PE1075	25	0,59748*	0,93494	0,0087	0,8665	Valenzuela (2000)
Média	22,4	0,752836	0,920152	$IC=2,85 \times 10^{-6}$	$QC=0,999900$	

### 3.2 Paternidade em Cativo

Foram genotipados todos os 191 filhotes de seis ninhos de *P. expansa* provenientes da Fazenda São Francisco, Manacapuru-AM. A razão sexual observada nessa localidade era de 1,6♀:1 ♂, com cerca de 500 animais em fase reprodutiva. O número mínimo de alelos encontrado foi 5 (Puni\_1E1) no ninho 5, e o número máximo foi 22 alelos (PE344 e PE1075) presentes nos ninhos 2 e 5. Utilizando o método da simples contagem de alelos (MYERS e ZAMUDIO, 2004), foi encontrada paternidade múltipla nos 6 ninhos analisados, com o máximo de 10 pais contribuindo nos ninhos 2 e 5. O método de inferência do genótipo materno, em que é possível inferir o alelo materno a partir da presença de filhotes homozigotos nos locos não foi utilizado, porque em todos os locos havia a presença de mais de dois filhotes homozigotos para diferentes alelos.

A análise no programa Kinalyser, a partir dos cinco locos utilizados, estimou o número de grupos de irmãos presentes em cada ninho, indicando paternidade múltipla em todos os 6 ninhos analisados dessa população. A evidência de paternidade múltipla nos 6 ninhos, revelou que um mínimo de 5 machos estavam contribuindo na prole do ninho 6 (PE519 e PE1075) e no mínimo 10 machos contribuindo no ninho 2 (PE519 e PE344) e ninho 5 (PE1075) (Tabela 3).

### 3.3 Paternidade em Natureza

Foram genotipados 165 filhotes de seis ninhos de *P. expansa* provenientes do rio Juruá, Carauri-AM. A análise dos locos a partir da simples contagem de alelos (MYERS e ZAMUDIO, 2004) indicou paternidade múltipla ocorrendo nos 6 ninhos analisados nesta população. O número mínimo de alelos encontrado foi de 5 alelos (PE519) no ninho 5, e o número máximo foi de 20 alelos (PE1075) no ninho 2. Assim como as análises realizadas para a população de cativo, também não foi possível inferir o genótipo materno nesta população, devido a presença de mais de dois filhotes homozigotos para diferentes alelos.

O grupo de irmãos estimados a partir da análise dos cinco locos realizada no programa Kinalyser, também detectou a presença de paternidade múltipla para todos os 6 ninhos desta população. Foi observada a contribuição de no mínimo 6 machos no ninho 5 (PE344 e PE1075) e ninho 6 (Puni\_1E1 e PE519) e no mínimo 9 machos no ninho 2 (PE1075) (Tabela 3).

Tabela 3. Evidência de paternidade múltipla nos ninhos de *P. expansa* de cativo e natureza. Número de alelos por loco. \*Número mínimo de pais inferidos. Kynaliser inferindo o número de grupos de irmãos estimados para cada loco, indicando a presença de paternidade múltipla em todos os ninhos estudados. PM = Paternidade múltipla.

Cativeiro										
Ninho	Nº de Filhotes	Número de alelos por loco					Nº de pais inferidos*	Grupo de irmãos inferidos	Kinalyser	Resultado
		Puni_1D12	Puni_1E1	PE344	PE519	PE1075				
N1	37	15	18	16	14	8	8	16	PM	
N2	37	14	16	22	21	19	10	17	PM	
N3	36	15	13	14	13	17	8	14	PM	
N4	29	9	8	10	16	18	8	12	PM	
N5	30	12	5	13	11	22	10	13	PM	
N6	22	10	10	8	11	11	5	8	PM	

Natureza										
Ninho	Nº de Filhotes	Número de alelos por loco					Nº de pais inferidos*	Grupo de irmãos inferidos	Kinalyser	Resultado
		Puni_1D12	Puni_1E1	PE344	PE519	PE1075				
N7	30	13	8	12	11	17	8	13	PM	
N8	30	16	11	14	13	20	9	12	PM	
N9	23	16	12	13	12	9	7	10	PM	
N10	32	17	8	14	18	17	8	13	PM	
N11	21	10	9	13	5	13	6	9	PM	
N12	29	10	14	10	14	8	6	11	PM	

#### 4 Discussão

Este presente estudo é a primeira documentação que reporta a presença de paternidade múltipla ocorrendo em espécies de *Podocnemis expansa* provenientes de cativeiro, além de reforçar essa evidência já observada em populações provenientes da natureza, conforme os

estudos de Valenzuela (2000) e Pearse et al. (2006) em populações do rio Caquetá (Colômbia) e da Isla Playita (Venezuela) respectivamente. Valenzuela (2000) evidenciou em 2 ninhos de *P. expansa* 100% a existência de paternidade múltipla, utilizando oito locos de microssatélites. A análise dos locos, estimou a contribuição de no mínimo 2 machos para um ninho e de três para outro ninho. Enquanto que Pearse et al. (2006) utilizando um número amostral maior que o de Valenzuela (2000) (32 ninhos), analisando sete locos de microssatélites, evidenciaram apenas 10,3% de contribuição de mais de um macho na prole. Todavia, apesar de Pearse et al. (2006) utilizar um número amostral de ninhos maior que Valenzuela (2000), seu número de filhotes variava entre 9 a 76 filhotes por ninho. Enquanto que ninhos de menor quantidade de filhotes indicava paternidade única, os ninhos com maior quantidade de filhotes indicava paternidade múltipla. Como a incidência de paternidade é o foco do estudo, torna-se essencial levar em consideração o número amostral tanto de ninhos, quanto de filhotes por ninho. A incidência de paternidade múltipla de 100% baseada em apenas dois ninhos, como avaliado por Valenzuela (2000), e a frequência mínima de apenas 10,3% a ocorrência de paternidade múltipla encontrada por Pearse et al. (2006), impede que se faça uma comparação direta nas taxas de detecção de paternidade múltipla entre os dois estudos, quando se observa nos dois trabalhos a variação no número de ninhos e filhotes por ninho utilizado em cada um.

No presente estudo, o número amostral total de 12 ninhos (n=6 em cativeiro e n=6 em natureza) com uma média de aproximadamente 31,8 filhotes por ninho no cativeiro e uma média de 27,5 filhotes em natureza, obteve como resultado 100% de paternidade múltipla nas duas populações de *P. expansa*, ou seja, essa espécie apresentou o mesmo padrão de comportamento de acasalamento nos dois casos. O número de locos de microssatélites utilizados foi bastante eficaz, suficiente e com grande poder discriminatório para determinar o tipo de paternidade que ocorre em *P. expansa*, como demonstrado pelos valores de probabilidade de 2 indivíduos não relacionados apresentarem o mesmo genótipo (I)  $IC=1,08 \times 10^{-6}$  para as amostras de cativeiro e  $IC= 2,85 \times 10^{-6}$  para as amostras de natureza, e o valor encontrado de probabilidade de exclusão de paternidade de (Q)  $QC=99,9\%$  nos dois casos, indicando o poder de detecção de paternidade múltipla dos 5 locos utilizados (Tabela 2). A partir da contagem simples de alelos foi possível estimar o número de machos contribuindo em cada prole, foi observada a contribuição de no máximo 10 machos na prole dos ninhos 2 e 5 em cativeiro, e o máximo de 9 machos no ninho 2 proveniente de natureza. Caso houvesse a amostra de DNA da fêmea de cada ninho estudado,



seu genótipo contribuiria para a melhor análise na contagem dos alelos para cada loco, pois dessa forma poderíamos estimar quais seriam os possíveis alelos dos pais que estariam contribuindo na prole.

Fica claro ao se notar nos três estudos (Valenzuela, 2000; Pearse et al., 2006) e o presente trabalho, que a variação no número de ninhos, proporção de filhotes por ninho e número de locos estudados em cada trabalho influencia na frequência de detecção de paternidade múltipla, pois a probabilidade de detecção também aumenta com a proporção de ninhos e filhotes por ninho que é amostrado (PEARSE et al., 2002).

Outras análises de tipo de paternidade em quelônios amazônicos de água doce do gênero *Podocnemis*, foram realizados para as espécies *Podocnemis unifilis* (FANTIN, 2008), *Podocnemis sextuberculata* (FANTIN, 2008; PEREIRA et al., 2011) e *Podocnemis erythrocephala* (FANTIN et al., 2010), e em todos foi detectado paternidade múltipla.

A presença de paternidade múltipla é importante para a manutenção da variabilidade genética nessas espécies, sendo esta última, a matéria prima para adaptação, evolução e sobrevivência dos indivíduos, principalmente quando suas populações estão sob condições de mudanças ambientais e incidência de doenças. Observando o número de alelos encontrado em cada população estudada, verificamos que existe uma boa quantidade de alelos presentes nas duas populações (Tabela 2), porém os valores de  $H_o$  estão abaixo da  $H_e$  para quatro locos (Puni\_1E1, PE344, PE519 e PE1075), isso pode ser explicado pelo excesso de homozigotos e alelos nulos presentes nos locos. Um indivíduo ao ser analisado e detectado aparentemente como homozigoto pode ser na verdade heterozigoto para o alelo nulo. Como esses alelos geralmente são identificáveis eles não consistem em um grande problema na análise de parentesco (JONES e ARDREN, 2003). Apenas para um dos locos analisados (Puni\_1D12) o valor de  $H_o$  foi maior que o valor da  $H_e$ , sendo o mesmo observado nesse loco por Fantin (2008) para a espécie *Podocnemis unifilis*.

Outro ponto importante é que a paternidade múltipla possui grande efeito no tamanho populacional, Chesser e Baker (1996) discutem 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.

Entre as vantagens da ocorrência de paternidade múltipla estão os benefícios genéticos indiretos para a prole (PEARSE et al., 2001), a diminuição da probabilidade de endogamia (STOCKLEY et al., 1993) e aumento da variabilidade genética da prole (PEARSE et al., 2006). A alta frequência de paternidade múltipla ocorrendo na tartaruga marinha *Emys blandingii* (REFSNIDER, 2009) sugerem que a poliandria é uma estratégia reprodutiva muito comum nas fêmeas dessa população, assim como nas populações de quelônios amazônicos já estudados por Fantin et al. (2008, 2010) e como o resultado encontrado no presente estudo.

O comportamento poliândrico da fêmea pode evitar o gasto de energia resultante de falhas reprodutivas por incompatibilidade genética (STOCKLEY et al., 1993), evitando assim que a fêmea evite desperdiçar óvulos e embriões, além disso esse comportamento implica em benefícios diretos para a saúde da prole (LEE e HAYS, 2004). Não há benefícios genéticos para a fêmea em virtude desse comportamento, o benefício real é adquirido para a sua prole, devido a herança de “bons genes” (JENNIONS, 2000). A escolha da fêmea em acasalar com vários machos aliada a capacidade que elas possuem em armazenar esperma de vários acasalamentos por longos prazos (PEARSE et al., 2002) aumenta as chances de ocorrência de paternidade múltipla e resulta em competição de espermatozóides dos machos concorrentes, somando assim as chances de que a prole adquira bons genes (PEARSE et al., 2002; THEISSINGER et al., 2009). Fica claro então que as vantagens do armazenamento de esperma, como forma de seleção sexual, envolve a facilitação da escolha feminina e competição de esperma (OLSSON e MADSEN, 1998).

Poliandria juntamente com o armazenamento de esperma permite que a variabilidade genética dos descendentes possa ser temporariamente desacoplada da disponibilidade de companheiros para acasalar. Como os indivíduos estão relativamente mais próximos em cativeiro é possível afirmar que a paternidade múltipla pode ser comumente encontrada nesse ambiente. A razão sexual no cativeiro estudado apresentava a proporção de  $1,6\text{♀}:1\text{♂}$ , e mesmo que a quantidade de machos em relação as fêmeas seja menor, foi possível observar a ocorrência de paternidade múltipla. Em natureza também foi possível detectar paternidade múltipla, embora os indivíduos estejam relativamente mais distantes do que os de cativeiro. Como nos dois casos estudados foi observado o mesmo resultado, podemos afirmar que diferentes populações expostas a diferentes ambientes podem vir a apresentar o mesmo tipo de comportamento reprodutivo. Esse é um aspecto positivo quando se pensa na conservação dessa espécie, pois

como já discutido anteriormente a ocorrência de paternidade múltipla nas populações de quelônios auxiliam na manutenção da variabilidade genética, além de ter efeito no tamanho efetivo da população.

Nossos resultados sugerem que as fêmeas de *P. expansa* do cativeiro estudado podem carregar esperma de até 10 machos, enquanto que as fêmeas de *P. expansa* provenientes da localidade estudada da natureza podem carregar de até 9 machos (Tabela 3), sendo que esses resultados são apenas uma estimativa do número mínimo de espermatozoides que essas fêmeas carregam. Olsson e Madsen (1998) afirmam que em cativeiro, o armazenamento de esperma está bem estabelecido, uma vez que foi observado que tartarugas fêmeas isoladas de machos, continuam a produzir descendentes por longos períodos, e mesmo que um macho venha a falecer essa fêmea ainda irá carregar seu material genético ao longo do tempo.

Assim, estudos de paternidade que avaliem a ocorrência/frequência de paternidade múltipla através de diversas estações de nidificação serão úteis para determinar a frequência dos acasalamentos múltiplos e como as diferenças ecológicas entre as diferentes populações podem influenciar no comportamento das espécies. Como cada espécie possui um tipo de sistema reprodutivo diferenciado, o conhecimento a respeito do comportamento de acasalamento de *P. expansa* em cativeiro e natureza implica no desenvolvimento de estratégias adequadas de conservação, assim como um dado biológico adicional para o correto manejo dessa espécie nos criadouros.

Como foi verificada uma boa taxa de variabilidade genética nas espécies de cativeiro e de natureza, é possível que em caso de necessidade, esses indivíduos sejam introduzidos em uma população que esteja ameaçada, afim de que minimize a perda de diversidade genética e endogamia. A análise molecular proporciona informações adicionais a respeito da distribuição de uma espécie o que contribui para a reintrodução de uma espécie em outra localidade, já que ecologicamente antes de se reintroduzir uma espécie se faz necessário conhecer sua distribuição (FRANKHAM et al, 2008).

Poliandria e paternidade múltipla são importantes estratégias reprodutivas com implicações potenciais na conservação das espécies bem como no desenvolvimento de práticas de manejo adequadas. No presente estudo foi evidenciada a ocorrência de paternidade múltipla tanto na população de cativeiro quanto na população de natureza e esse resultado sugere que paternidade múltipla pode ser comum em diferentes populações de *P. expansa*, podendo garantir

assim a manutenção da variabilidade genética nessas populações bem como o aumento de seu tamanho efetivo. O número amostral e o número de locos de microssatélites utilizados no trabalho foram eficientes para a detecção de paternidade múltipla nessa espécie. Estes resultados contribuem na literatura sobre comportamento reprodutivo de *P. expansa*, como a detecção de paternidade múltipla, em populações de cativeiro e natureza.

## 5 Referências Bibliográficas

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**, v. 12. nº 2, p. 323-326, 1982.

ANDRADE, P. C. M. Criação e Manejo de Quelônios no Amazonas. Projeto Diagnóstico da Criação de Animais Silvestres no Estado do Amazonas. In: I Seminário de Criação e Manejo de Quelônios da Amazônia Ocidental. 1ª Edição. FAPEAM/SDS. Manaus/AM. p. 447 , 2004

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**, v. 23, p. 49-56, 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.

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.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

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. **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.; FARIA, 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 Researches**, p. 435-440, 2010.

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.

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.

IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em 10 February 2012.

JENNIONS, M. D.; PETRIE, M. Why do females mate multiple? A review of a genetic benefits. **Bio. Rev.**, v. 75, p. 21-64, 2000.

JONES, A. G; ARDREN, W. R. Methods of parentage analysis innatural populations. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2511–2523, 2003.

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

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.

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

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.

OLSSON, M.; MADSEN, T. Sexual selection and sperm competition in reptiles. In: Birkhead TR, Moeller AP (eds) Sperm competition and sexual selection. **Academic Press**, London, p. 503-577, 1998.

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**, v. 4, p. 535-538, 2004.

PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, v. 4, p. 347-354, 1995.

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.

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. **Behav Ecol Sociobiol**, v. 51, p. 164-171, 2002

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, n° 2, p. 232-238, 2006.

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 Makers. In: XL Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, **Resumo**, Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011

PRITCHARD, P. C. H.; TREBBAU, P. The turtles of Venezuela. **Society for the Study of Amphibians and Reptiles**, Ann Arbor, MI, 1984.

REFSNIDER, J. M. High frequency of multiple paternity in Blanding's turtle (*Emys blandingii*). **J Herpetol**, v. 43, p. 74–81, 2009

RICE, W. R. Analysing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223–225, 1989.

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.

ROWE, L. The costs of mating and mate choice in water striders. **Anim Behav.**, v. 48, p. 1049–1056, 1994.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, n° 2, p. 233–234, 2000.

STOCKLEY, P.; SEARLE, J. B.; MACDONALD, D. W.; JONES, C. S. Female multiple mating behaviour in the common shrew as a strategy to reduce inbreeding. **Proceedings of the Royal Society of London Series**. p.173–179, 1993.

THRALL, P.H.; ANTONOVICS, J.; DOBSON, A. P.; 2000. Sexually transmitted diseases in polygynous mating systems: prevalence and impact on reproductive success. **Proc Biol Sci.**, v. 267, p. 1555–1563, 2000.

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.

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**. 1º Edição. Lima, Peru: Gráfica Biblos, 2008.

WATSON, P. J.; ARNQVIST, G.; STALLMANN, R. R. Sexual conflict and the energetic costs of mating and mate choice in water striders. **Am Nat.**, v. 151, p. 46–58, 1998.



WEIR, B. S. Genetic Data Analysis II: Methods for discrete population genetic data. **Sinauer Associates**, Sunderland, MA.,1996.

WRIGHT, L. I.; FULLER, W. J.; GODLEY, B. J.; McGOWAN, A.; TREGENZA, T.; BRODERICK, A. C.; No benefits of polyandry to female green Turtles. **Behavioral Ecology**, 2013.

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.