



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

Desenvolvimento de marcadores moleculares de
microssatélites para o estudo do sistema reprodutivo
em três espécies de tartarugas do gênero
Podocnemis

Cleiton Fantin

Manaus
2008



**Universidade Federal do Amazonas
Instituto de Ciências Biológicas
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia**

Cleiton Fantin

**Desenvolvimento de marcadores moleculares de
microssatélites para o estudo do sistema reprodutivo
em três espécies de tartarugas do gênero
*Podocnemis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof Dr Luiz Alberto dos Santos Monjeló
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Izeni Pires Farias

Manaus
2008

Cleiton Fantin

Desenvolvimento de marcadores moleculares de
microssatélites para o estudo do sistema reprodutivo
em três espécies de tartarugas do gênero
Podocnemis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Banca Examinadora:
Tomas Hrbek
Richard Carl Vogt
Albertina Pimentel Lima
Doriane Picanço Rodrigues

Manaus
2008

Ficha Catalográfica
(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central – UFAM)

Fantin, Cleiton

F216d

Desenvolvimento de marcadores moleculares de microssatélites para o estudo do sistema reprodutivo em três espécies de tartarugas do gênero *Podocnemis* / Cleiton Fantin. - Manaus: UFAM, 2008.

98 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2008.

Orientador: Prof. Dr Luiz Alberto dos Santos Monjeló

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Izeni Pires Farias

1. Tartarugas – Reprodução - Estudo 2. Quelônios – Amazônia 3. Quelônios – Genética de populações 4. Ácido desoxirribonucléico microssatélite I. Monjeló, Luiz Alberto dos Santos II. Farias, Izeni Pires III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 598.13(043.2)

*A todas as pessoas que superam a dor da distância
em busca de um sonho.*

“O que somos é consequência do que pensamos”.

Alanis Morissette

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais por terem me criado para acreditar que a decência e a integridade são as maiores realizações na vida, possuindo um profundo senso de honra e humildade.

À toda minha família por sempre acreditar em meu potencial e me apoiar em tudo o que faço, incentivando assim a conquista de novos caminhos e principalmente aos meus irmãos que mesmo estando longe estão sempre presentes em minha vida.

À minha querida orientadora Dra. Izeni Pires Farias, por todo seu ensinamento, com quem tanto aprendi, com seu exemplo de trabalho que será de grande valia para meu futuro profissional. Sinto-me extremamente privilegiado em integrar seu grupo de Pesquisa!

Ao meu orientador Dr. Luiz Alberto dos Santos Monjeló, pela oportunidade de realizar um sonho de trabalhar com as tartarugas da Amazônia e pela confiança em mim depositada.

Ao Dr. Tomas Hrbek, por suas importantes críticas e sugestões, e principalmente pela oportunidade da realização de grande parte deste trabalho em seu laboratório.

Às minhas grandes amigas Sol, Dri e Renata, sempre presentes quando foi preciso, principalmente pelo companheirismo partilhado pelos vários momentos que vivemos (ótimos, divertidos, cômicos, hilários, trágicos...), enfim; tantas aventuras inesquecíveis.

À minha “colega” Neves, por me ensinar os primeiros passos no laboratório, pelo conhecimento, companheirismo e ajuda, não só nos momentos profissionais, mas também nas mais diferentes situações.

À Luciana Viana (Dona Pessoa) pela amizade, companheirismo, alegria, paciência e ajuda durante a execução deste trabalho.

À minha “ex-orientada” Ciça, pela amizade, alegria, paciência e companheirismo nos diferentes momentos.

Ao Dr. Richard C. Vogt, por suas contribuições, revisões e conselhos durante a realização da tese, pelo material bibliográfico e parceria no Projeto de Pesquisa.

Às PESSOAS do LEGAL. Principalmente as CULEGAS Andréa, Concy, Themis e Rafinha.

Ao Laboratório de Genética Animal da Universidad de Puerto Rico por me deixar realizar grande parte deste trabalho.

À Silvia Planas e Dania Rodrigues, pela amizade, ajuda e por terem me recebido tão bem na Universidad de Puerto Rico, a ponto de me sentir tão à vontade, que quase não volto ao Brasil. Gracias muchachas!

Ao Projeto Pé-de-Pincha, pelo apoio nas coletas dos filhotinhos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Programa IEB- Programa BECA pelo auxílio financeiro.

Ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM, em especial ao secretário Roberto pela ajuda nos trâmites finais.

Ao projeto CNPq CT-Amazônia Processo: 55326012005-7 “Desenvolvimento de marcadores moleculares de microssatélites para a análise genética de populações de quelônios da Amazônia e determinação de paternidade” coordenado pelo Dr. Richard Carl Vogt.

É ISSO AÍ, VALEU!!!!!!!

RESUMO

Poucos dados estão disponíveis com relação à biologia da reprodução no gênero *Podocnemis*, mais especificamente com relação ao sistema de reprodução. Até hoje os estudos sobre sistema de reprodução realizados no gênero *Podocnemis* foram realizados somente com *P. expansa*. No presente trabalho desenvolvemos 18 iniciadores específicos para regiões microssatélites em *P. unifilis*, e testamos sua transferibilidade nas outras espécies do gênero *Podocnemis* (*P. expansa*, *P. sextuberculata*, *P. erythrocephala*, *P. vogli* e *P. lewyana*) e também em *Peltocephalus dumerilianus*. Estes microssatélites apresentaram um grande potencial como marcadores moleculares para investigar o sistema de reprodução em *P. unifilis*, *P. sextuberculata* e *P. erythrocephala*. Utilizando diferentes grupos de locos de microssatélites, encontrou-se o mínimo de dois pais contribuindo para as ninhadas de *P. unifilis*, e o mínimo de três pais contribuindo para as ninhadas de *P. sextuberculata* e *P. erythrocephala*. Esses resultados contribuem diretamente para o conhecimento do sistema de reprodução e indiretamente para estudos relacionados ao impacto de manejo e reprodução tanto na natureza como em cativeiro destas espécies. Além disso, nossos resultados poderão contribuir para um melhoramento nos programas de reprodução em criadouros.

ABSTRACT

Few data are available about reproductive biology of the genus *Podocnemis*, especially with respect to the type of mating system. To date studies of mating system with species of the genus *Podocnemis* have been done only with *P. expansa*. In the present study we developed 18 primer pairs specific to microsatellite regions in *P. unifilis*, and we tested their transferability to other species of the genus *Podocnemis* (*P. expansa*, *P. sextuberculata*, *P. erythrocephala*, *P. vogli* and *P. lewyana*) and also to *Peltocephalus dumerilianus*. These microsatellite markers have proven to be powerful molecular tools for investigating mating systems of *P. unifilis*, *P. sextuberculata* and *P. erythrocephala*. Using different microsatellite panels a minimum of two contributing parents were found in nests of *P. erythrocephala*, and the presence of up to three contributing parents was found in nests of *P. unifilis* and *P. sextuberculata*. These results directly contribute to the knowledge of the reproductive system and indirectly to studies related to the impact of management and reproduction in nature as well as in captivity. Moreover, our results will contribute to improvements in captive breeding programs.

1 LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I (artigo publicado (Fantin et al. 2007))

Tabela 1 - Characterization of 18 microsatellites loci of *Podocnemis unifilis*.....20

Tabela 2 - Cross-species amplification test.....21

CAPÍTULO II (artigo submetido)

Tabela 1 - Microsatellites loci screened for the paternity test in *P. unifilis* (from Fantin *et al.* 2007).....47

Tabela 2 – Number of alleles (N), Number of homozygotes (*Nh*), and Inferred number of extra alleles (*Inea*) in each locus per nest of *P. unifilis*.48

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Número de alelos, heterozigozidade observada (*Ho*), heterozigozidade esperada (*He*), probabilidade de exclusão de paternidade (*Q*) e probabilidade de identidade (*I*) dos 6 locos de microsatélites usados no teste de paternidade em *P. sextuberculata*.....59

Tabela 2 - Quantidade de alelos maternos inferidos/ número de alelos encontrados para cada loco nos ninhos de *P. sextuberculata*.....60

CAPÍTULO IV

Tabela 1 - Características dos quatro microsatélites utilizados na genotipagem de *P. erythrocephala*.76

Tabela 2 - Fórmulas utilizadas para o calculo da verossimilhança entre os pares de indivíduos analisados.....77

Tabela 3 - Quantidade de alelos maternos inferidos/ número de alelos encontrados para cada loco nos ninhos de *P. erythrocephala*.....79

2 LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Exemplar de <i>P. unifilis</i>	4
Figura 2 – Exemplar jovem de <i>P. sextuberculata</i> (A). Plastrão exibindo os tubérculos (B).....	5
Figura 3 – Filhote de <i>P. erythrocephala</i>	7

CAPÍTULO II

Figure 1 - Map showing the location of Barreirinha site for the nests of <i>P. unifilis</i> studied in the present work.).....	49
Figure 2. Distribution of relatedness (r_{xy}) values for pairs of offspring from each clutch of <i>P. unifilis</i> .).....	50

CAPÍTULO III

Figura 1 - Mapa mostrando o local de coleta dos ninhos de <i>P. sextuberculata</i>	56
Figura 2 - Gráficos da relação de parentesco entre os filhotes, para cada ninho analisado.....	61

CAPÍTULO IV

Figura 1 - Mapa mostrando os 2 locais de coleta dos ninhos de <i>P. erythrocephala</i>	75
Figura 2 - Gráficos da relação de parentesco entre os filhotes de <i>P. erythrocephala</i> , para cada ninho analisado.	80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações gerais.....	1
1.2 Família <i>Podocnemididae</i>	2
1.3 <i>Podocnemis unifilis</i>	4
1.4 <i>Podocnemis sextuberculata</i>	5
1.5 <i>Podocnemis erythrocephala</i>	6
1.6 Sistemas de Acasalamento.....	8
1.7 Sistema reprodutivo em quelônios.....	11
1.8 Genética da conservação.....	13
1.9 Técnicas para a análise da variabilidade genética.....	15
1.9.1 Marcadores moleculares.....	15
1.9.2 Marcadores baseados em DNA microsatélite.....	15
1.10 Estudos de paternidade no gênero <i>Podocnemis</i>	17
Referências Bibliográficas.....	18
CAPÍTULO I.....	22
CAPÍTULO II.....	27
CAPÍTULO III.....	51
CAPÍTULO IV.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Os quelônios são os mais antigos répteis existentes. Surgiram na Era dos répteis, há cerca de 230 milhões de anos, sendo de linhagem mais antiga que os dinossauros fósseis (Ferri, 2002). Os quelônios são encontrados em locais diversos como lagos, rios, mares e pântanos, desertos e florestas. A dimensão é variável de acordo com as espécies, encontrando-se formas de dois a três metros de comprimento e também pequenas formas que atingem somente sete a doze centímetros.

A ordem Chelonia caracteriza-se por répteis terrestres, marinhos e dulcícolas, cujos corpos são envolvidos por duas conchas ósseas, uma carapaça dorsal e um plastrão ventral, que estão ligados lateralmente por uma ponte óssea; dentes ausentes; mandíbulas desenvolvidas, assumindo a forma de bico córneo; língua não extensível; pálpebras presentes; pescoço geralmente retrátil e com oito vértebras cervicais; membros basicamente pendáctilos; vivem em regiões tropicais e temperadas (Orr, 1986).

São os únicos répteis que possuem casco, o qual é utilizado como um instrumento de defesa. Muitas espécies podem recolher a cabeça, as pernas e a cauda para dentro do casco, servindo como escudo de proteção. Entretanto, muitas espécies não conseguem executar esse movimento, como por exemplo, a tartaruga marinha.

Os quelônios têm vida mais longa que qualquer outro vertebrado, podendo as espécies terrestres viver mais de cem anos e geralmente estão associados à baixa substituição de indivíduos na população. No entanto, a maior parte do desenvolvimento biológico destes animais só ocorre durante os 5 a 10 anos de existência e, segundo pesquisas, a maturidade

sexual só acontece aproximadamente aos sete anos para os machos e 11 a 15 anos para as fêmeas (IBAMA, 1989).

Muitas espécies de quelônios estão em vias de extinção, consequência da perseguição desmedida do homem, que destrói os ovos e pratica a caça predatória na época de reprodução, além de promover a destruição do habitat natural desses animais.

Em uma estratégia para conservação, o IBAMA fornece aos criadores cadastrados no órgão, cerca de 4000 filhotes e os criadores comprometem-se a criá-los até a idade adulta e reproduzi-los em cativeiro, com a permissão de comercializar 60%. Entretanto ainda falta um suporte técnico adequado aos órgãos governamentais e aos criadores, para indicar de onde devem ser fornecidos os filhotes para cada local, a fim de manter em cativeiro os mesmos níveis de variabilidade genética das populações naturais, bem como para um manejo adequado das espécies em cativeiro.

Embora ilegal, a venda de quelônios capturados na natureza ainda é extremamente elevada no Estado do Amazonas. Isto não é só devido ao hábito local de consumir estes animais, mas também devido à ineficiência da fiscalização pelos órgãos competentes (Alho, Pádua, 1982).

O manejo de diversas espécies ameaçadas é baseado em conhecimento incompleto da dinâmica populacional. Faltam informações demográficas específicas, principalmente em relação ao manejo de organismos de vida longa (Pezzuti, Vogt, 1999).

1.2 Família *Podocnemididae*

A família Podocnemididae compreende um grupo que reúne três gêneros de quelônios de água doce: *Erymnochelys* (Baur, 1888); *Peltocephalus* (Duméril & Bibron,

1835) e *Podocnemis* (Wagler, 1830). O gênero *Erymnochelys* está representado por apenas uma espécie vivente, *E. madagascariensis* (Grandidier, 1867), restrita a Madagascar (Pritchard, Trebbau, 1984). *Peltocephalus*, grupo-irmão de *Podocnemis*, é monoespecífico, estando *P. dumerilianus* (Schweigger, 1812) distribuída pelo leste da Colômbia, sudoeste da Venezuela e noroeste do Brasil (Pritchard, Trebbau, 1984). O gênero *Podocnemis*, distribuído pela região setentrional cisandina da América do Sul, é o mais representativo, com seis espécies viventes: *P. erythrocephala* (Spix, 1824), *P. expansa* (Schweigger, 1812), *P. lewyana* (A. Duméril, 1852), *P. sextuberculata* (Cornalia, 1849), *P. unifilis* (Troschel, 1848) e *P. vogli* (L. Muller, 1935) (Mittermeier, Wilson, 1974a; Pritchard, 1979; Pritchard, Trebbau, 1984).

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

Os podocnemidídeos sul-americanos constituem um grande recurso para os habitantes da região, sendo explorada sua carne, ovos, óleo, e outros valiosos produtos para a sobrevivência. Entre seus membros mais apreciados se encontra a tartaruga-da-amazônia, que é a maior tartaruga de água doce do continente e da qual se chegou a capturar, em um só ano, mais de 50 milhões de indivíduos (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007).

1.3 *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848)

Podocnemis unifilis (Figura 1), conhecida popularmente como tracajá (fêmea) e Zé prego (macho), possui a carapaça cinza escura quando molhada. Apresenta as patas curtas e cobertas com pele rugosa, cabeça achatada e cônica, de pequeno tamanho em relação ao corpo. Os olhos, bastante juntos, são separados por um sulco. A fêmea adulta pesa em torno de oito quilos e mede cerca de 38 cm (Pritchard, Trebbau, 1984). É uma tartaruga essencialmente aquática. Pritchard e Trebbau, (1984) e Iverson (1992) citam que esta espécie pode ser encontrada nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco e seus afluentes, no norte da América do Sul, ocorre em rios de água preta, clara e branca bem como em lagos e reservatórios.



Figura 1 – Exemplar de *P. unifilis*.

Esta é, provavelmente, a espécie de tartaruga mais comum na América do Sul tropical. Quanto à alimentação, é predominantemente herbívora, ingerindo macrófitas

aquáticas como aguapés e gramíneas; e em algumas ocasiões, moluscos e frutos que caem durante a estação chuvosa. No entanto, em cativeiro segundo Fachín-Terán *et al.* (1997), a dieta desta espécie é onívora.

A fêmea de *P. unifilis* não forma agregações de nidificação, e desova em praias arenosas, barrancos às margens dos rios e lagos, e outra grande variedade de substratos (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007). Estudos realizados por (Haller, Rodrigues, 2005), em ninhos de *P. unifilis* da Reserva Biológica do rio Trombetas-PA, Brasil, demonstram que as covas são de aproximadamente 17 cm de profundidade, apresentando uma média de 19 ovos por ninho, variando de 7 a 27, e o período de incubação vai de 58 a 66 dias.

1.4 *Podocnemis sextuberculata* (Cornália, 1849)

Podocnemis sextuberculata (Figura 2) é conhecida popularmente como iaçá, pitiú ou cambéua (Smith, 1979b). A carapaça tem coloração que vai de marrom-clara a marrom-escura. O plastrão nos indivíduos jovens apresenta seis tubérculos de cor cinza ou marrom, os quais conferem o nome à espécie, *P. sextuberculata*. A fêmea não possui manchas amarelas com um par de barbelos logo abaixo da boca, e é maior que os machos.

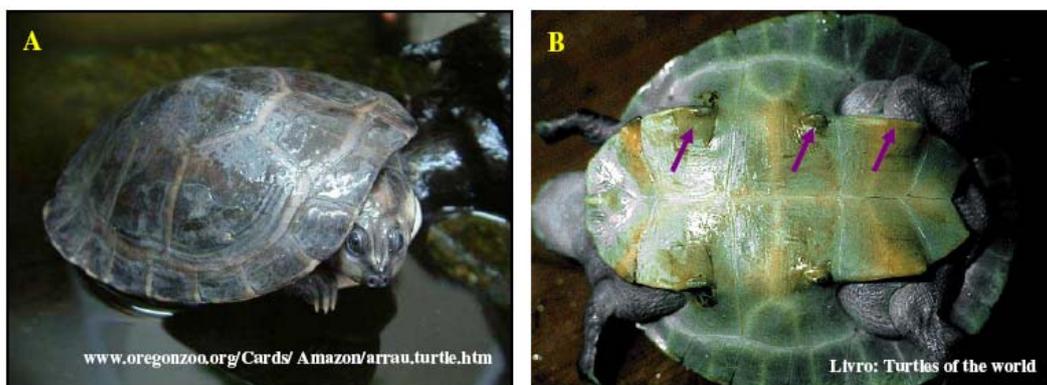


Figura 2 – Exemplar jovem de *P. sextuberculata* (A). Plastrão exibindo os tubérculos (B).

Sua distribuição geográfica abrange a drenagem do rio Amazonas no Brasil, Peru e Colômbia (Ernst, Barbour, 1989b; Iverson, 1992). No Brasil é encontrada em rios de água barrenta como Solimões, Japurá e Branco; e em rios de água clara como Trombetas e Tapajós (Cantarelli, Herde, 1989). Na Reserva Sustentável de Mamirauá-RDSM, é encontrada em águas pretas e barrentas, nos canais dos rios, paranás, ressacas e lagos, sendo relativamente abundante e constituindo uma importante fonte alimentar para a população local (Fachín, 1999).

A alimentação é predominantemente de matéria vegetal, tendo como principal componente as sementes. Fachín (1999), estudando conteúdo estomacal desta espécie encontrou 86,81% de sementes e quantidades mínimas de insetos e restos de peixes como escamas e nadadeiras, isto indica que esta espécie é principalmente herbívora e esporadicamente carnívora.

Podocnemis sextuberculata desova a noite, em pequenos grupos formados por 3 ou 4 fêmeas, durante o verão (outubro a dezembro) e deposita em média 16 ovos, com uma variação que oscila entre 6-25. Seleciona praias arenosas largas e amplas para desovar, e em uma mesma noite podem subir até 40 fêmeas para nidificar na mesma praia. Os ovos são relativamente grandes (41 x 27 mm, e um peso médio de 19,6g), de forma elíptica e casca dura e quebradiça. Os filhotes eclodem do ninho aos 87 dias de incubação e se refugiam de imediato para o rio (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007).

1.5 *Podocnemis erythrocephala* (Spix, 1824)

Podocnemis erythrocephala (Figura 3), é a menor espécie do gênero, facilmente distinguida de suas congêneres devido ao seu pequeno tamanho (medindo menos que 32 cm,

geralmente as fêmeas medem em torno de 27 cm e os machos são menores ainda), a coloração vai de marrom-escuro a preto, a carapaça é expandida na porção posterior; apresenta um par de barbelos embaixo do queixo, e uma faixa vermelha brilhante que se estende da parte de traz da cabeça até os tímpanos.



Figura 3 – Filhote de *P. erythrocephala*.

Vários autores, incluindo Williams (1954a) e Wermuth e Mertens (1961b) citam que *P. erythrocephala* ocupa uma grande área ao norte da América do Sul, contudo, Mittermeier e Wilson (1974a) relatam que as amostras com informações de procedência segura foram todas coletadas no sistema do rio Negro. É quase completamente confinada a rios de água preta e a maioria dos exemplares conhecidos é proveniente do rio Negro, o maior tributário de água doce do Amazonas. Dentro do sistema do rio Negro, a espécie mostra preferência por pequenos lagos de água preta e seus afluentes, sendo raramente encontrados no leito principal do rio (Mittermeier, Wilson, 1974a). O pequeno tamanho da espécie pode

refletir em parte uma adaptação a pequenos corpos de água bem como o potencial nutricional limitado de baixa produtividade dos sistemas de água preta.

Em relação a dieta natural desta espécie Mittermier & Wilson (1974a) analisando o conteúdo estomacal, revelaram que os adultos são principalmente herbívoros, se alimentando de plantas aquáticas e frutas que caem no igapó. Contudo, por serem freqüentemente capturados com linhas de pescar, acredita-se que incluam ocasionalmente peixe em sua dieta.

Esta espécie se reproduz no final do ano, entre os meses de outubro e janeiro e apresenta dois picos máximos de desova, um em outubro e outro em dezembro (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007). Nidifica individualmente ou em pequenos grupos, pela noite, em praias arenosas. O número de ovos varia de 5 a 14, e a postura ocorre geralmente à noite na areia, em áreas chamadas de campinas. Os ovos são alongados, podendo apresentar a casca dura ou levemente flexível (Mittermeier, Wilson, 1974a). Apesar desta espécie não ser a mais importante na economia, é extensivamente caçada no rio Negro por sua carne e seus ovos (Vogt, 2001).

1.6 Sistemas de Acasalamento

O conjunto de estratégias e interações sociais que ocorrem entre os indivíduos de uma população e formam um contexto dentro do qual tem lugar a união de gametas se denomina sistema de acasalamento (Carranza, 1994). Dinamicamente, o acasalamento é a aceção de duas fases sucessivas na reprodução, o pareamento e a cópula. Pode haver ainda uma terceira fase: a corte nupcial que se situa cronologicamente entre as duas já mencionadas (Davis, 1955).

Acredita-se que os sistemas de acasalamento dos vertebrados reflitam a competitividade por recursos, tais como a distribuição de alimento, os locais de reprodução e os parceiros em potencial. Estes recursos afetam diretamente os indivíduos dos dois sexos; alguns tipos desta distribuição dão a um dos sexos a oportunidade de possuir múltiplos acasalamentos, pelo controle de acesso a esses recursos (Emlen, Oring, 1977; Oring, 1982).

Os vertebrados sociais exibem uma das duas grandes categorias de sistema de acasalamento – monogamia ou poligamia. A monogamia refere-se a uma ligação de parceiros, entre um macho e uma única fêmea. O casal pode permanecer junto parte de uma estação reprodutiva, uma estação inteira ou por toda vida. A poligamia refere-se a uma situação na qual um indivíduo tem mais de um parceiro na estação reprodutiva

A poligamia pode ser exibida pelos machos ou pelas fêmeas. Na poliginia um macho acasala-se com mais de uma fêmea, enquanto que na poliandria uma fêmea acasala-se com dois ou mais machos (Del Hoyo *et al.*, 1992).

Para vários autores a poliandria é um sistema de acasalamento vantajoso por ter maior potencial reprodutivo. Bump & Bump (1969) afirmam que a fêmea presumivelmente aumenta sua resposta reprodutiva se vários machos puderem ser induzidos a cuidar de seus ovos e filhotes, nesta situação a posição dos machos será desvantajosa, apesar de dentro da poliandria, normalmente serem os machos que se beneficiam, ao aumentarem o número de fêmeas com que se acasalam (Carranza, 1994).

A estocagem de esperma pelas fêmeas, é fundamental em diversas espécies. Ela permite a sincronização para a fecundação quando os ciclos folicular e testicular são dissociados (Schuett, 1992). Além disso, a estocagem de esperma pela fêmea pode propiciar seleção sexual pós-copulatória (Birkhead, Muller, 1993; Birkhead, 2000; Olsson *et al.*, 1996; Schuett, 1992). Essa seleção ocorre por meio da competição dos espermatozóides no interior

do trato reprodutivo da fêmea (Birkhead, 2000; Olsson *et al.*, 1996; Parker, 1970). Uma fêmea pode copular com mais de um macho e estocar seus espermatozóides. No corpo da fêmea, esses gametas estocados podem se misturar e deverão competir pela fecundação dos óvulos (Birkhead, 2000; Parker, 1970).

Até 1956 ainda não havia sido descoberto nenhum local específico do oviduto dos répteis que fosse responsável pela estocagem de espermatozóides. Nesse ano, Fox (1956) descreveu a estrutura responsável pela estocagem de esperma no oviduto de *Thamnophis* spp. (Colubridae) e posteriormente estruturas semelhantes foram descritas em lagartos (Cuellar, 1966; Fox, 1963; Saint-Girons, 1962). Gist & Jones (1989) identificaram túbulos contendo espermatozóides por microscopia óptica em ovidutos de 11 espécies de tartarugas representando seis diferentes famílias. Túbulos de armazenamento de sêmen foram encontrados em uma pequena região da porção posterior da tuba uterina, localizada entre o infundíbulo e o útero. Espermatozóides foram encontrados em túbulos de tartarugas fêmeas, isolados de machos, por um período de 423 dias.

Em muitos insetos os espermatozóides provenientes de diferentes cópulas não se misturam na espermateca das fêmeas. Assim, o último macho a copular com a fêmea tem vantagem: seus espermatozóides fecundam a maioria dos ovos permitindo que ele se torne pai da maioria dos filhotes, aumentando seu sucesso reprodutivo (Birkhead, 2000; Parker, 1970).

A vantagem da poligenia para os machos é óbvia: seu sucesso reprodutivo depende quase exclusivamente do número de filhotes do qual é pai. Portanto, ele deve copular com o maior número de fêmeas possíveis e tentar garantir que a fêmea não copule com outros machos (Birkhead, 2000; Parker, 1970). Já para as fêmeas, a vantagem da poliandria nem sempre foi clara. O sucesso reprodutivo das fêmeas depende mais do número de filhotes que ela gera. O número de cópulas não está associado à fecundidade da fêmea e a quantidade de

esperma inseminada por um único macho é suficiente para fecundar todos os seus óvulos (Madsen *et al.*, 1992; Stille *et al.*, 1986). Assim, o sucesso reprodutivo da fêmea não deveria estar associado ao número de parceiros. Entretanto, a estocagem de esperma e múltipla paternidade são conhecidas em várias espécies (Duvall *et al.*, 1992; Gibson, Falls, 1975; Schuett, 1992; Schuett, Gillingham, 1986; Stille *et al.*, 1986). De fato, a grande vantagem de cópulas com diferentes machos, para as fêmeas, é a competição dos espermatozóides. Essa competição deve selecionar os melhores espermatozóides aumentando a aptidão dos filhotes e, portanto, aumentando o sucesso reprodutivo da fêmea (Birkhead, 2000; Madsen *et al.*, 1992; Parker, 1970).

A estocagem de esperma parece ser uma estratégia freqüente entre os quelônios, o que favorece a existência de paternidade múltipla, e facilita a fertilização de seus ovos ainda que seja escassa a disponibilidade de machos. Com esta estratégia, as tartarugas podem fertilizar seus primeiros ovos antes que aconteça as primeiras cópulas, o que pode contribuir a incrementar o número de desovas que cada fêmea pode desenvolver em seu período de atividade reprodutiva (Roques *et al.*, 2004).

1.7 Sistema reprodutivo em quelônios

À semelhança da maioria dos répteis, as tartarugas apresentam fecundação interna. Em consequência da grande cavidade corporal, as fêmeas são capazes de produzir e guardar um grande número de ovos. Um aspecto importante da biologia reprodutiva de tartarugas é a capacidade das fêmeas em armazenar esperma viável em seus ovidutos por longos períodos de tempo, permitindo-lhes assim fertilizar inúmeros ovos sem terem de acasalar em cada período de reprodução (Gist, Jones, 1989). Algumas espécies de tartarugas

realizam várias posturas durante a época de nidificação, que varia entre espécie e entre populações. Ao contrário de muitas aves e mamíferos, as tartarugas não formam pares sexuais ou grupos sociais coesos, e nem fornecem cuidado parental após nidificação (Shine, 1988).

No comportamento social, as tartarugas podem empregar sinais táteis, sonoros, visuais e olfativos. Na época do acasalamento, os machos nadam a procura de outras fêmeas, e a cor e o padrão das patas posteriores podem permitir que os machos identifiquem as fêmeas. Sendo também utilizado o ferormônio na identificação das fêmeas das espécies (Pough *et al.*, 1993).

Em relação ao comportamento de corte e cópula observa-se um padrão de acasalamento entre os quelônios, com 4 fases básicas, que podem ser denominadas pó (1) procura pela fêmea, (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 ocorre, e algumas espécies exibem corte mais elaborada, com etapas adicionais (Molina, 1996).

Na maioria das espécies de quelônios, o macho aproxima-se da fêmea por trás e examina olfativamente sua região cloacal. Este exame olfativo da cloaca parece servir para determinar a espécie do indivíduo examinado (Carpenter, 1980), o seu sexo (Carpenter, 1980; Mahmoud, 1967); e o grau de receptividade das fêmeas (Shealy, 1976).

Em inúmeras espécies, a fêmea tenta fugir do macho, que tem então de persegui-la. Mahmoud (1967) acredita que na família Kinosternidae, a perseguição tenha função estimulante.

Durante a pré-cópula, machos de várias espécies mantêm-se sobre as fêmeas agarrando-se com as mãos e pés à sua carapaça, o que segundo Carpenter (1980), também funciona como estímulo tátil.

O comportamento de nidificação é extremamente estereotipado, ocorrendo sempre cinco etapas básicas: (1) deambulação, (2) abertura da cova, (3) postura dos ovos, (4) fechamento da cova e (5) abandono do ninho. Duas etapas adicionais, que ocorrem antes da deambulação (agregação em águas rasas e subida a praia) são executadas pelas tartarugas marinhas e por espécies do gênero *Podocnemis* (Alho *et al.*, 1979; Carr, Giovannoli, 1957; Foote, 1978).

1.8 Genética da conservação

O objetivo geral da genética da conservação é o estudo da biodiversidade molecular nas populações naturais das espécies sob impacto antropogênico (Frankham *et al.*, 2002) , bem como a caracterização da estrutura genética e história evolutiva de metapopulações naturais, que possibilite o apoio a programas de manejo e conservação.

A genética nos auxilia a conhecer a diversidade de alelos nos vários locos de uma espécie. A matéria bruta dos estudos em biodiversidade molecular é a mesma envolvida na evolução das espécies: a variabilidade gênica. É esta variabilidade que nos permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes. A variabilidade genética também é chamada de biodiversidade molecular, além de ser muito importante para a evolução, pode ser usada para avaliar as afinidades e os limites entre as espécies, para detectar modos de reprodução e estrutura familiar e para estimar níveis de migração e dispersão nas populações (Awise, 2004).

Entre os principais parâmetros genéticos populacionais estudados com o uso de marcadores moleculares estão às medidas do grau de heterozigose, que pode também ser relacionada a parâmetros tais como: eficiência reprodutiva e resistência a doenças; análise de estruturas familiares; e estimativa do tipo de distribuição das populações em relação ao fluxo

gênico. O entendimento de processos que regulam tais parâmetros permite desenhar políticas adequadas de parques, reservas, criadouros e outros ambientes naturais que podem ser preservados com o auxílio das populações ribeirinhas (Viana *et al.*, 2004).

Um dos objetivos na conservação de espécies ameaçadas é a manutenção do grau de heterozigose e a diminuição da endogamia, principalmente com espécies mantidas em cativeiro para recolonização (Avise, Hamrick, 1996; Borlase *et al.*, 1993). Assim, é imprescindível o conhecimento do nível de variabilidade genética nas populações silvestres, em particular, quando se trata de espécies ameaçadas de extinção, e especialmente quando as populações locais possuem um reduzido número de indivíduos, aumentando a probabilidade de endogamia. No estabelecimento de planos de conservação para espécies em perigo, como as tartarugas, é essencial manter um intercâmbio de fêmeas (portanto de genes) entre as colônias reprodutoras, depois de definidas as unidades de manejo.

A diminuição do tamanho efetivo da população é um dos principais responsáveis pela perda da variabilidade genética em populações ameaçadas de extinção (Frankham *et al.*, 2002). O tamanho efetivo de população, além de considerar o número de indivíduos participantes na produção da próxima geração, está influenciado por outras características referentes a aspectos da ecologia reprodutiva, tais como o número de machos que fecundam uma fêmea, a razão sexual, etc. Deste modo, a presença de paternidade múltipla tem importantes conseqüências no aumento do tamanho efetivo de uma população em relação à paternidade única (Chesser, Baker, 1996; Sugg, Chesser, 1994), principalmente, quando estamos tratando de espécies em perigo de extinção. Quanto maior a freqüência de paternidade múltipla, melhor será a condição de manter ou de incrementar a variabilidade genética inter e intra populações (Chesser, Baker, 1996; Sugg, Chesser, 1994).

1.9 Técnicas para análise da variabilidade genética

1.9.1 Marcadores moleculares

Marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou ainda como uma seqüência direta da estrutura do DNA (Avisé, 2004). Quando seu comportamento, quanto à segregação, segue os padrões mendelianos de herança, o marcador é definido como "marcador genético".

Existem numerosas técnicas moleculares disponíveis para avaliar a diversidade genética entre indivíduos e entre populações. Segundo Queller *et al.* (1993), o marcador genético ideal para estudos em população seria um de fácil uso e que distinguísse locos com alelos co-dominantes, que fornecesse valores não ambíguos, e preferivelmente com alta variação. Quando usamos marcadores genéticos estamos tentando estimar o número de modificações dos nucleotídeos entre alelomorfos.

1.9.2 Marcadores baseados em DNA microssatélite

Diferentes experimentos no início dos anos 80 demonstraram que genomas eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de seqüências repetidas, umas mais complexas e outras mais simples (Hamada *et al.*, 1982; Tautz, Renz, 1984). Seqüências Simples Repetidas ("SSR – *Simple Sequence Repeats*"), mais tarde denominadas "microssatélites" (Litt, Luty, 1989), consistem de pequenas seqüências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem, altamente variáveis no número de repetições e flanqueiam seqüências conservadas (Avisé, 1994). Elas ocorrem em animais e plantas sendo

que em genomas de eucariotos estas seqüências simples são mais freqüentes, melhor distribuídas ao acaso e formam locos genéticos muito mais polimórficos do que os locos hipervariáveis constituídos com minissatélites.

Estes locos altamente polimórficos, amplificados via PCR foram também denominados de “STMS” - *Sequence Tagged Microsatellite Site*, (Beckmann, Soller, 1990), ou seja, sítios de microssatélite marcados por seqüência, e constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponível hoje. Tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores SSR são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo, ou seja, “PIC” (“*Polymorphism Information Content*”) na terminologia de marcadores moleculares. Por causa disso, essencialmente toda e qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento genético.

A observação, pelo menos em genomas animais, de que ocorre conservação de sítios de microssatélites entre espécies relacionadas, torna possível pelo menos em alguns casos, a transferência de marcadores entre espécies, ou mesmo gêneros, usando-se *primers* heterólogos (Menottiraymond, Obrien, 1995; Moore *et al.*, 1991; Pepin *et al.*, 1995). Somado a estas características genéticas, os segmentos polimórficos gerados são pequenos o suficiente para serem detectados utilizando-se a reação de PCR. Todas estas características fazem com que marcadores baseados em SSR sejam marcadores ideais para o mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações.

1.10 Estudos de paternidade no gênero *Podocnemis*

Poucos dados estão disponíveis em relação ao sistema reprodutivo no gênero *Podocnemis*, principalmente no que diz respeito ao tipo de sistema reprodutivo. Dentre os poucos trabalhos existentes, Valenzuela (2000) e Pearse et al (2006), relataram a existência de paternidade múltipla em ninhos de *Podocnemis expansa*. Entretanto, os estudos existentes foram realizados apenas nesta espécie do gênero e nada a respeito sobre o sistema reprodutivo está disponível para as outras espécies do gênero.

Valenzuela (2000), encontrou paternidade múltipla estudando 2 ninhos de *Podocnemis expansa*, utilizando 8 locos de microssatélites, sugerindo ainda que exista estocagem de esperma nesta espécie, ocorrendo mistura a cada período de reprodução.

Pearse et al. (2006) utilizou 7 locos de microssatélites em 32 ninhos de *P. expansa* da Venezuela e encontrou paternidade múltipla em apenas 10,3% dos ninhos analisados, mostrando a existência de diferenças no padrão de paternidade entre diferentes populações desta espécie.

Referências Bibliográficas

- Alho, C. J. R., Carvalho, A. G. & Pádua, L. F. M. (1979). Ecologia da tartaruga da Amazônia e avaliação de seu manejo na Reserva Biológica do Trombetas. *Brasil Florestal*, **38**, 29-47.
- Alho, C. J. R. & Pádua, L. F. M. (1982). Sincronia entre o regime de vazante do rio e o comportamento de nidificação da tartaruga da Amazônia *Podocnemis expansa* (Testudinata – Pelomedusidae). *Acta Amazônica*, **12**(2), 323-326.
- Avise, J. C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, NY.
- Avise, J. C. (2004). *Molecular Markers, Natural History and Evolution, second edition*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Avise, J. C. & Hamrick, J. L. (1996). *Conservation Genetics*. Chapman & Hall, London.
- Beckmann, J. S. & Soller, M. (1990). Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Biotechnology*, **8**, 930-932.
- Birkhead, T. & Muller, A. P. (1993). Female control of paternity. *Trends in Ecology and Evolution*, **8**, 100-104.
- Birkhead, T. R. (2000). *Promiscuity: an evolutionary approach of sperm competition*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Borlase, S. C., Loebel, D. A., Frankham, R., Nurthen, R. K., Briscoe, D. A. & Daggard, G. E. (1993). Modeling problems in conservation genetics using captive *Drosophila* populations- consequences of equalization of family sizes. *Conservation Biology*, **7**, 122-131.
- Bump, G. & Bump, J. W. (1969). A study of the Spotted Tinamous and the Pale Spotted Tinamous of Argentina. *Spec. Scient. Rep. U. S. Fish Wildl. Serv.*, **120**, 1-160.
- Cantarelli, V. H. & Herde, L. C. (1989). *Projeto quelônios da Amazônia 10 anos*. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA., Brasília.
- Carpenter, C. C. (1980). An ethological approach to reproductive success in reptiles. In *Reproductive Biology and Diseases of Captive Reptiles*, eds. J. Murphy & J. T. Collins, Society for the Study of Amphibians and Reptiles. Kansas, pp. 33-48.
- Carr, A. & Giovannoli, L. (1957). The ecology and migrations of sea turtles, 2. Results of field work in Costa Rica. *Am. Mus. Novit.*, **1835**, 1-32.
- Carranza, J. (1994). *Introducción a la ciencia del comportamiento*. Universidade de Extremadura, Cáceres.
- Chesser, R. K. & Baker, R. J. (1996). Effective sizes and dynamics of uniparentally and diparentally inherited genes. *Genetics*, **144**, 1225-1235.
- Cuellar, O. (1966). Oviductal anatomy and sperm storage structures in lizards. *J. Morphol.*, **119**, 7-20.
- Davis, D. E. (1955). Breeding biology of birds. In *Avian Biology*, ed. S. Wolfson, Univ. of Illinois Press. Urbana, pp. 264-308.
- Del Hoyo, J., Elliot, A. S. & Sargatal, J. (1992). *Handbook of the birds of the world*. Lynx Edicions, Barcelona.
- Duvall, D., Arnold, S. J. & Schuett, G. W. (1992). Pitviper mating systems: ecological potential, sexual selection, and microevolution. In *Biology of the pit vipers*, eds. J. A. Campbell & E. D. Brodie Jr., Selva. Tyler, Texas, pp. 321-336.

- Emlen, S. T. & Oring, L. W. (1977). Ecology, sexual selection and the evolution of mating systems. *Science*, **197**, 215-223.
- Ernst, C. H. & Barbour, R. W. (1989). *Turtles of the World*. Smithsonian Institution Press., Washington, D. C.
- Fachín, A. T. (1999). Ecologia de *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Pelomedusidae), na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade do Amazonas, pp. 189.
- Fachín-Terán, A., Acosta, A., Vilchez, I. & Taleixo, G. (1997). Reproducción de la taricaya *Podocnemis unifilis* (Reptilia: Testudinidae), en cautiverio. *Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonía*. Iquitos, Peru. 207-209.
- Ferri, V. (2002). *Turtles & Tortoises. 1st ed. ed.* Firefly Books, New York.
- Foote, R. W. (1978). Nesting of *Podocnemis unifilis* (Testudines: Pelomedusidae) in the Colombian Amazon. *Herpetologica*, **34**(4), 333-339.
- Fox, W. (1956). Seminal receptacles of snakes. *Anat. Rec.*, **124**, 519-539.
- Fox, W. (1963). Special tubules for sperm storage in female lizards. *Nature*, **198**, 500-501.
- Frankham, R., Ballou, J. R. & Briscoe, D. A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Gibson, R. A. & Falls, B. J. (1975). Evidence for multiple insemination in the common garter snake, *Thamnophis sirtalis*. *Canadian Journal of Zoology*, **53**, 1362-1368.
- Gist, D. H. & Jones, J. M. (1989). Sperm storage within the oviduct of turtles. *Journal of Morphology*, **199**, 379-384.
- Haller, E. C. P. & Rodrigues, M. T. (2005). *Podocnemis unifilis* (Yellow-spotted River Turtle). Nests and Nesting. *Herpetological Review*, **36**(1), 60.
- Hamada, H., Petrino, M. G. & Kakunaga, T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA forming potencial is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6465-6469.
- IBAMA. (1989). *Projeto Quelônios da Amazônia, 10 anos*. Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília.
- Iverson, J. B. (1992). *A Revised Checklist with Distribution Maps of the Turtles of the World*. Printed Privately, Richmond, VA.
- Litt, M. & Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, **44**, 397-401.
- Madsen, T., Shine, R., Loman, J. & Hakansson, T. (1992). Why do female adders copulate so frequently? *Nature*, **355**, 440-441.
- Mahmoud, I. Y. (1967). Courtship behaviour and sexual maturity in four species of kinosternid turtles. *Copeia*, **1967**, 314-319.
- Menottiraymond, M. A. & Obrien, S. J. (1995). Evolutionary conservation of tem microsatellite loci in four species of Felidae. *Journal of Heredity*, **86**, 319-322.
- Mittermeier, R. A. & Wilson, R. A. (1974). Redescription of *Podocnemis erythrocephala* (Spix, 1824), an Amazonian Pelomedusid turtle. *Papeis Avulsos de Zoologia*, **28**, 147-162.
- Molina, F. B. (1996). Biología e comportamento reprodutivo de quelônios. *Anais de Etologia*, **14**, 211-221.
- Moore, S. S., Sargeant, L. L., King, T. J., Mattick, J. S., Georges, M. & Hetzel, D. J. S. (1991). The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *T. Genomics*, **10**, 654-660.

- Olsson, M., Shine, R., Madsen, T., Gullberg, A. & Tegelström, H. (1996). Sperm selection by females. *Nature*, **383**, 585.
- Oring, L. W. (1982). Avian mating systems. In *Avian Biology*, eds. D. S. Farner, J. R. King & K. C. Parkes, Vol. 6, Academic. New York, pp. 1-92.
- Orr, R. T. (1986). *Biologia dos Vertebrados. 5ª Edição ed.* Editora Roca Ltda., São Paulo.
- Parker, G. A. (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol. Rev.*, **45**, 525-567.
- Pearse, D. E., Dastrup, R. B., Hernandez, O. & Sites Jr, J. W. (2006). Paternity in an Orinoco Population of Endangered Arrau River Turtles, *Podocnemis expansa* (Pleurodira; Podocnemididae), from Venezuela. *Chelonian Conservation and Biology*, **5**(2), 232-238.
- Pepin, L., Amigues, Y., Lepingle, A., Berthier, J. L., Bensaid, A. & Vaiman, D. (1995). Sequence conservation of microsatellites between *Bos tauros* (catle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testings and phylogeny analysis. *Heredity*, **74**, 53-61.
- Pezzuti, J. C. B. & Vogt, R. C. (1999). Nesting Ecology of *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Pelomedusidae) in the Japurá River, Amazonas, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology*, **3**(3), 419-424.
- Pough, F. H., Heiser, J. B. & Mcfarland, W. N. (1993). *A vida dos vertebrados*. Atheneu, São Paulo.
- Pritchard, P. C. H. (1979). *Encyclopedia of turtles*. T. F. H. Publ., Inc, New Jersey.
- Pritchard, P. C. H. & Trebbau, P. (1984). *The Turtles of Venezuela*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ann Arbor, MI.
- Queller, D. C., Strassmann, J. E. & Hughes, C. R. (1993). Microsatellites and kinship. *Tree*, **8**, 285-298.
- Roques, S., Díaz-Paniagua, C. & Andreu, A. C. (2004). Microsatellite markers reveal multiple paternity and sperm storage in the Mediterranean spurthighed tortoise, *Testudo graeca*. *Canadian Journal of Zoology*, **82**, 153-159.
- Rueda-Almonacid, J. V., Carr, J. L., Mittermeier, R. A., Rodríguez-Mahecha, J. V., Mast, R. B., Vogt, R. C., Rhodin, A. G. J., Ossa-Velásquez, J., Rueda, J. N. & Mittermeier, C. G. (2007). *Las tortugas y los cocodrilos de los países andinos del Trópico*. Conservación Internacional, Bogotá, Colombia.
- Saint-Girons, H. (1962). Presence de receptacles séminaux chez les caméléons. *Beaufortia*, **9**, 165-172.
- Schuett, G. W. (1992). Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pit vipers? In *Biology of the pit vipers*, eds. J. A. Campbell & E. D. Brodie Jr., Selva. Tyler, Texas, pp. 169-184.
- Schuett, G. W. & Gillingham, J. C. (1986). Sperm storage and multiple paternity in the copperhead *Agkistrodon contortrix*. *Copeia*, **1986**, 807-811.
- Shealy, R. M. (1976). The natural history of the Alabama map turtle, *Graptemys pulchra* Baur, in Alabama. *Bull. Fla. St. Mus. biol. Sci.*, **21**(2), 47-111.
- Shine, R. (1988). Parental care in reptiles. In *Biology of the Reptilia*, eds. C. Gans & R. B. Huey, Vol. 16, Alan R. Liss. New York, pp. 275-329.
- Smith, N. J. H. (1979). Aquatic turtles of Amazonia: an endangered resource. *Biological Conservation*, **16**, 165-176.
- Stille, B., Madsen, T. & Niklasson, M. (1986). Multiple paternity in the adder, *Vipera berus*. *Oikos*, **47**, 173-175.

- Sugg, D. W. & Chesser, R. K. (1994). Effective population sizes with multiple paternity. *Genetics*, **137**, 1147-1155.
- Tautz, D. & Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, **12**, 4127-4138.
- Valenzuela, N. (2000). Multiple paternity in side-neck turtles *Podocnemis expansa*: evidence from microsatellite DNA data. *Molecular Ecology*, **9**, 99-105.
- Viana, M. N. S., Farias, I. P., Santos, R. C., Sampaio, M. I. & Monjeló, L. A. S. (2004). Genética molecular das populações das espécies de quelônios do gênero *Podocnemis* da Amazônia: resultados preliminares. In *1º Seminário de Criação e Manejo de Quelônios da Amazônia Ocidental Projeto de Diagnóstico de Criação de Animais Silvestres no Estado do Amazonas/PTU-CNPq*, eds. P. A. Andrade, S. Canto & L. A. S. Monjeló. Brasília, pp. 107-127.
- Vogt, R. C. (2001). Turtles of the Rio Negro. In *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazônia, Brazil - Projeto Piaba*, ed. N. L. Chao, Editora da Universidade do Amazonas. Manaus, pp. 245-262.
- Wermuth, H. & Mertens, R. (1961). *Schildkrotten, Krokodile, Bruckenhsen*. Gustav Fischer Verlag.
- Williams, E. E. (1954). A key and description of the living species of the genus *Podocnemis* (sensu Boulenger). *Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard*, **111**(8), 279-295.

CAPÍTULO I

Microsatellite DNA markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle

Artigo publicado na revista *Molecular Ecology Notes* em 2007 como pré-requisito para a defesa de Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

PRIMER NOTE

Microsatellite DNA markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle

CLEITON FANTIN,* CECÍLIA F. CARVALHO,* TOMAS HRBEK,*† JACK W. SITES JR.,‡
LUIZ A. S. MONJELÓ,* SPARTACO ASTOLFI-FILHO§ and IZENI P. FARIAS**

*Laboratório de Evolução e Genética Animal, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Amazonas, Avenida Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000, Manaus, AM, Brazil, †Biology Department, University of Puerto Rico – Río Piedras, San Juan, PR 00931, Puerto Rico, ‡Department of Integrative Biology, Brigham Young University, Provo, UT 84602, USA, §Laboratório de Tecnologias de DNA, Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, Avenida Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000, Manaus, AM, Brazil

Abstract

We developed specific primers for microsatellite DNA regions of *Podocnemis unifilis* and tested their utility in population genetic and paternity studies on the species and other closely related Amazonian chelonians. Seventeen microsatellite loci were polymorphic in *P. unifilis* and all, plus two monomorphic microsatellites in *P. unifilis*, were polymorphic in at least one additional chelonian species, including *Peltocephalus dumeriliana*.

Keywords: chelonian, microsatellite, *Podocnemis unifilis*, tracaça

Received 11 January 2007; revision accepted 20 April 2007

Many chelonian species are threatened with extinction as a consequence of the excessive harvesting of eggs and adults, as well as the destruction of their natural habitat. In South America, six species of the *Podocnemis* genus are found: *Podocnemis vogli*, *P. lewyana*, *P. expansa*, *P. unifilis*, *P. sextuberculata*, and *P. erythrocephala*, of which the last four are found in Brazil. At present, molecular genetic analyses have been carried out only for the largest species of the genus, *P. expansa* (Sites *et al.* 1999; Pearse *et al.* 2006a, b). *Podocnemis unifilis*, the yellow-spotted Amazon River turtle, popularly known in the Brazilian Amazon as 'tracaça', is classified as 'Vulnerable' in the Red List of the International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources and is listed in Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. It is the second largest and the second most popularly consumed species after *P. expansa*, its increase in popularity coinciding with the drastic decrease in census sizes and local extinctions of *P. expansa*. *Podocnemis unifilis* is more of an ecological generalist than *P. expansa*, and thus appears better suited to captivity and ranching schemes (Fachín-Terán *et al.* 1997). As with most Amazonian vertebrates, no genetic profile

exists for this species, and we have little knowledge of its system of mating. Therefore, the main aim of this study is to develop primers for DNA microsatellite loci of *P. unifilis* and to test their utility for population and paternity analyses of this species. We also test the applicability of these markers in other *Podocnemis* species (*P. sextuberculata*, *P. expansa*, *P. erythrocephala*, *P. vogli*) and a closely related genus represented by *Peltocephalus dumeriliana*.

Total genomic DNA was extracted from blood using GFX DNA extraction kit (GE Healthcare). Microsatellite loci were isolated and identified from a partial genomic library enriched for CT₁₂ repeats following the protocol of Farias *et al.* (2003, 2006). Enriched DNA was ligated into an Invitrogen pCR 2.1 TOPO cloning vector and transformed into chemically competent *Escherichia coli* (TOPO TA Cloning kit) following the manufacturer's recommendations. The transformed cells were grown overnight on a 1 × LB/Amp (Sambrook *et al.* 1989) agar plate. Individual colonies were picked, and regrown for 16 h in a 96-well culture plate containing 150 µL of liquid 1 × LB/Amp (100 µg/mL) solution. Polymerase chain reaction (PCR) amplification using M13 forward (–20) and M13 reverse primers was performed directly on the bacterial cultures following the manufacturer's protocol. PCR products were purified using GFX spin-columns (GE Healthcare), and sequencing reactions were performed with the M13 primers using ET

*Correspondence: Izeni P. Farias, Fax: +55 (92) 3647-4229; E-mail: izeni_farias@ufam.edu.br

1236 PRIMER NOTE

Table 1 Characterization of 18 microsatellite loci of *Podocnemis unifilis*

Locus/GenBank Accession no.	Primer (5'-3')	Repeat motif	Size range (bp)	T (°C)	No. of individuals/ alleles	H _O	H _E	I	Q
Puni_1A5	F-5'-TCTCAGCGTGTGTTCTG-3'	(GA) ₂₂	156-206	62	21/11	0.762	0.892	0.0290	0.7518
EF455680	R-5'-GAGGGGAAAGACACAAATCA-3'	(GA) ₂₇	343-369	55	24/10	0.792	0.858	0.0433	0.7009
Puni_1B2	F-5'-GTATGTGCACTGGCAAAAT-3'	(GA) ₈	238	60	Monomorphic*				
EF455681	R-5'-CCACTTCCACATCTCTGAAAC-3'	(GA) ₈ GG(GA) ₉	265-287	60	24/7	0.750	0.666	0.1772	0.4267
Puni_1B10	F-5'-CCAAACTAGTTCATGTCAAA-3'	(GA) ₈	182-218	62	11/8	0.3648	0.785	0.0720	0.6160
EF455682	R-5'-GGTTCGGCTCTCTTACACR-3'	(GA) ₂₇	113-141	64	23/5	0.5654	0.513	0.2890	0.2990
Puni_1C3	F-5'-CCCTACCGAAACAGCTGAG-3'	(GA) ₁₂	133-157	62	24/8	0.458	0.664	0.1572	0.4510
EF455683	R-5'-ATCTGGCTTGGAGCTGTGTT-3'	(GA) ₉	125	64	Monomorphic†				
Puni_1C9	F-5'-GCTGCAACAGGAGAGTGG-3'	(GA) ₃₀	174-180	55	24/3	0.8758	0.595	0.3199	0.2672
EF455684	R-5'-CCCTTCGGAATTCAGTGA-3'	(CT) ₈ (CT) ₇	185-209	64	23/7	0.783	0.809	0.0738	0.6140
Puni_1D9	F-5'-GCTGGGAACTGACTACTC-3'	(CT) ₈	203-215	60	24/4	0.2088	0.574	0.2785	0.3072
EF455686	R-5'-CAGAACTCTTCATCCAG-3'	(GA) ₁₂	171-191	60	24/7	0.4584	0.594	0.2149	0.3767
Puni_1D11	F-5'-CAGAGGTAGGAAATGCTGT-3'	(GA) ₁₂	161-183	55	20/11	0.950	0.881	0.0355	0.6640
EF455687	R-5'-CTGACACTTCCTGACACTC-3'	(CT) ₂₇	271-287	55	22/9	0.773	0.744	0.0964	0.5300
Puni_1D12	F-5'-AGGACTCGAGTGCAAAC-3'	(GA) _{cat} (GA) ₆	240-246	60	23/5	0.826	0.703	0.1510	0.4612
EF455688	R-5'-GATCACCCGAACTGACCT-3'	(GA) ₈	164-172	55	24/5	0.375	0.395	0.2148	0.3782
Puni_1E1	F-5'-GGCTTCTACTGTTGAAATGTC-3'	(GA) ₈ GC(GA) ₈	260-282	56	24/7	0.7924	0.761	0.1159	0.5235
EF455689	R-5'-GAAAGAGACTTGAATAATGTTG-3'	(CT) ₈ (CT) ₁₀	291-325	60	24/7	0.583	0.727	0.1204	0.5129
Puni_1F10	F-5'-GCTTCAGCTCTCTCATAA-3'								QC = 2.16 × 10 ⁻¹⁵
EF455690	R-5'-GCCCTCAGCTCTCTCATAA-3'								QC = 0.9999910
Puni_1H9	F-5'-GGGCTACAGGAGGAGGA-3'								
EF455692	R-5'-ATTATATGAGCCCTTACC-3'								
Puni_2A9	F-5'-GTTCTCCAGCAGCTGAGG-3'								
EF455693	R-5'-GTTCTCCAGCAGCTGAGG-3'								
Puni_2C11	F-5'-AGGTGCTTGAATAATGAA-3'								
EF455694	R-5'-TGCACCTTCCATTTAAGC-3'								
Puni_2D9	F-5'-CAGCAATTTTTCAGACAGC-3'								
EF455695	R-5'-CCACAGCAACCCCTCAGC-3'								
Puni_2D10	F-5'-GCCAGTCCCTTAAACTTGGG-3'								
EF455696	R-5'-GGGAGCTTCTGCTGCT-3'								
Puni_2E7	F-5'-CTGACCCATATCAGTAC-3'								
EF455697	R-5'-CACTGAGCTTCTGAGGAG-3'								
Puni_2F6	F-5'-CTGATCCAAACCAATTTCTG-3'								
EF455698	R-5'-CCCTBACCAGGACTGCACCT-3'								

*Polymorphic for *P. scottibercukia*; †polymorphic for *P. erythrocephala*.H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity; I, probability of genetic identity at an individual locus; QC, probability of genetic identity for all loci;

Q, probability of paternity exclusion at an individual locus; QC, probability of paternity exclusion for all loci.

Table 2 Cross-species amplification test. Codes: +/+ polymorphic; +/- monomorphic; -/- PCR or genotyping did not work

Locus	<i>Podocnemis sectuberculata</i> (N = 4)	<i>Podocnemis erythrocephala</i> (N = 12)	<i>Podocnemis expansa</i> (N = 5)	<i>Podocnemis vogli</i> (N = 8)	<i>Peltocephalus dumerilianus</i> (N = 4)
Puni_1A5	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-
Puni_1B2	+/+	+/-	+/+	+/+	-/-
Puni_1B10	+/+	-/-	-/-	+/-	-/-
Puni_1B11	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
Puni_1C3	+/-	-/-	-/-	+/+	-/-
Puni_1C9	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
Puni_1D9	+/+	+/+	+/-	+/+	-/-
Puni_1D11	-/-	+/+	-/-	-/-	+/-
Puni_1D12	+/+	+/+	+/+	+/-	-/-
Puni_1E1	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
Puni_1F10	+/-	+/+	+/+	+/-	-/-
Puni_1H9	+/+	+/-	+/-	+/+	+/+
Puni_2A9	+/+	+/-	-/-	+/+	-/-
Puni_2C11	-/-	+/+	-/-	+/-	-/-
Puni_2D9	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-
Puni_2D10	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
Puni_2E7	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-
Puni_2F6	+/-	-/-	+/+	+/-	-/-

terminator sequencing chemistry. Products were visualized on a MegaBACE 1000 (GE Healthcare).

Good quality microsatellite repeats — perfect or nearly perfect repeat motif of at least 10 repeats units — were found in 80 out of 192 clones sequenced. Primer pairs complementary to regions flanking the microsatellite repeats were designed for 34 clones using the program PRIMER 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Each forward primer had an M13 sequence tail added to its 5' end to allow for dynamic fluorescent labelling (TET-labelled M13 primer) following the economic protocol of Schuelke (2000). PCR was performed in 10 µL reaction volumes. The final volume was 5 mM KCl, 1 mM Tris-HCl, 1.75 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 0.2 µM reverse primer, 0.1 µM forward primer, 0.1 µM TET-labelled M13 label primer, 0.05 U/mL LGC Biotecnologia Taq DNA Polymerase, and about 1 ng/mL genomic DNA. PCRs were run in a Thermo Hybrid thermocycler and had two main steps: an initial denaturation (94 °C, 1 min) followed by 25 cycles of 50 s at 94 °C, 50 s at primer-specific annealing temperature (Table 1), 1 min at 72 °C; followed by 20 cycles of 40 s at 92 °C, 35 s at 50 °C, 40 s at 68 °C, and an extension for 20 min at 72 °C. Microsatellite clones were deposited in GenBank (Table 1). PCR products were visualized on a MEGABACE 1000 Fragment Profiler version 1.2 software (GE Healthcare). Allele sizes were scored against the size standard ET-400 ROX (GE Healthcare).

We genotyped on average three individuals per eight different nests of *P. unifilis* (between 20 and 24 individuals successfully assayed). The nest sites were located in the

area of Barreirinha (2°43'59"S, 57°07'30"W), Amazonas state, Brazil. Out of 34 primer pairs developed, 19 amplified a single band, three were monomorphic, and 16 were highly polymorphic, with number of alleles ranging from four to 11 (Table 1). The observed per-locus heterozygosities ranged from 0.208 to 0.950 (ARLEQUIN 3.1, Excoffier *et al.* 2005). We also tested the statistical power of the 16 loci for inferring genetic identity (*I*) (Paetkau *et al.* 1995) and paternity exclusion (*Q*) (Weir 1996). Hardy-Weinberg equilibrium was observed in all loci but Puni_1F10 and Puni_1H9 (heterozygosity deficiency), and Puni_1D12 and Puni_2E7 (heterozygosity excess). Across all loci-pairs, we found less than 5% of pairs with linkage disequilibrium after Bonferroni corrections ($P < 0.01$) which involved comparison between loci 1D12 × 1B2, and 1D12 × 1B11. The locus Puni_1H8 (not listed in Table 1) was monomorphic for *P. unifilis* and did not amplify for the other species; additional samples should be tested at a population level to confirm the monomorphism of this locus. Due to amplification failures, only 11 individuals could be genotyped for the locus Puni_1C3; additional testing will be necessary to confirm if this result indicates the presence of null alleles, considering that allele frequencies at this locus deviated from Hardy-Weinberg equilibrium (heterozygote deficit, $P < 0.01$).

For the cross-species amplification test, we used four to 12 individuals of other *Podocnemis* species (Table 2) and the closely related *Peltocephalus dumerilianus*. Surprisingly, the two monomorphic loci in *P. unifilis* (Puni_1B10 and Puni_1D11) were polymorphic in at least one of the other species. The microsatellite loci developed for *P. unifilis* appear

1238 PRIMER NOTE

to be informative for the genus as a whole (all species but *P. lewyana* from the Magdalena River of Colombia were tested), and thus provide a powerful molecular toolkit for conservation, management and molecular ecological studies of these highly threatened turtles.

Acknowledgements

The authors thank Enedina Nogueira and Luciana Viana for laboratory assistance, the 'Pé-de-Pincha' turtle project for collection of samples, Omar Hernández for helping to collect *P. vogli* samples, and Soledad Maria Holzhausen for helping to collect *P. erythrocephala* samples. This research was supported by grants to IPF from the CT-Amazonia/CNPq (5532601/2005-7) and PPG7/CNPq (557090/2005-0). Permission to collect tissue samples was granted by RAN/IBAMA no. 113/2006. This work forms a portion of CF's Ph.D. thesis at the Biotechnology program of Universidade Federal do Amazonas; CF was supported by a Ph.D. fellowship from SUFRAMA and CAPES.

References

- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) ARLEQUIN version 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.
- Fachín-Terán A, Acosta A, Vilchez I, Taleixo G (1997) Reproducción de la taricaya *Podocnemis unifilis* (Reptilia: Testudinidae), en cautiverio. In: *Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonía* (eds Fang T, Bodmer R, Aquino R, Valqui M), pp. 207–209. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana and University of Florida, Iquitos, Peru.
- Farias IP, Hrbek T, Brinkmann H, Sampaio I, Meyer A (2003) Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Anapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Molecular Ecology Notes*, 3, 128–130.
- Farias IP, Miniz LB, Astolfi-Filho S, Sampaio I (2006) Isolation and characterization of DNA microsatellite primers for *Cynoscion acoupa*, the most exploited sciaenid fish along the coast of Brazil. *Molecular Ecology Notes*, 6, 660–663.
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4, 347–354.
- Pearse DE, Arndt AD, Valenzuela N *et al.* (2006a) Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Molecular Ecology*, 15, 985–1006.
- Pearse DE, Dastrup RB, Hernandez O, Sites JW Jr (2006b) Paternity in an Orinoco population of endangered Arrau River turtles, *Podocnemis expansa* (Pleurodira; Podocnemididae), from Venezuela. *Chelonian Conservation and Biology*, 5, 232–238.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn, ed. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18, 233–234.
- Sites JW Jr, Fitzsimmons NN, Silva NJ, Cantarelli VH (1999) Conservation genetics of the giant Amazon river turtle (*Podocnemis expansa*; Pelomedusidae)—inferences from two classes of molecular markers. *Chelonian Conservation Biology*, 3, 454–463.
- Weir BS (1996) *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

CAPÍTULO II

Polyandry in *Podocnemis unifilis* (Pleurodira; Podocnemididae), the endangered yellow-spotted Amazon River turtle

Artigo submetido à revista Amphibia-Reptilia em Novembro de 2007 como pré-requisito para a defesa de Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Polyandry in *Podocnemis unifilis* (Pleurodira; Podocnemididae), the endangered
yellow-spotted Amazon River turtle

Cleiton Fantin, Luciana Santos Viana, Luiz Alberto dos Santos Monjeló and Izeni Pires

Farias*

*Universidade Federal do Amazonas, Departamento de Biologia, Laboratório de Evolução e
Genética Animal_LEGAL, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000,
Manaus, AM, Brazil*

*Correspondence to:

Izeni P. Farias

Phone: +55 (92) 3647-4233; FAX: +55 (92) 3647-4229; e-mail: izeni_farias@ufam.edu.br

Running head: Amazon River turtle, paternity, microsatellite, *Podocnemis unifilis*

Keywords: chelonian, microsatellite, paternity, *Podocnemis unifilis*, tracajá.

Abstract

We used eight microsatellite loci to investigate the mating system in *P. unifilis*. DNA samples were collected from 66 hatchlings sampled from six nests on a central Amazon River beach near Barreirinha, Amazonas, Brazil. We found that *P. unifilis* females exhibited a promiscuous mating system (polyandry) with all nests being fathered by at least two males. The presence of multiple males contributing to each clutch was ascertained by the presence of at least two extra alleles in multilocus genotypes in each nest. Our data demonstrate that polyandry seems to be the prevalent system of mating in this endangered species.

Introduction

In South America six species of the genus *Podocnemis* are found: *Podocnemis vogli* Muller, 1935, *P. lewyana* Duméril, 1852, *P. unifilis* Troschel, 1848, *P. expansa* Schweigger 1812, *P. sextuberculata* Cornalia, 1849 and *P. erythrocephala* Spix, 1824; the last four being found in Brazil. *Podocnemis unifilis*, the yellow-spotted Amazon River turtle, is commonly known as “tracajá”. It is an aquatic species which lives in lakes, ponds, floodplain, swamps, lagoons, and oxbow lakes along major rivers of the Amazon basin. *Podocnemis unifilis* is widely distributed in South America throughout all countries encompassed by the Amazon region (Peru, Bolivia, Ecuador, Colombia, Venezuela, Guyanas, and Brazil) (Ferri, 2002; Iverson, 1992; Pritchard and Trebbau, 1984). This is probably the commonest chelonian species in South America (Pritchard and Trebbau, 1984) and it is considered the second most consumed species in the Amazonian region (Smith, 1979), which resulted in the Vulnerable status in the IUCN Red List and the listing in Appendix II of CITES. Unlike the giant Amazonian river turtle (*Podocnemis expansa*), the female “tracajá” seeks to be a solitary egg layer, laying her eggs on river banks and lake shores once a year during the breeding season which generally occurs before high-water (flood) season takes place (Ferri, 2002). Studies conducted on *P. unifilis* nests in the Biologic Reserve of Trombetas River (Brazil) demonstrate that the nests are approximately 17cm deep, and contain an average of 19 (range 7-27) eggs per nest, and the incubation period runs from 58 to 66 days (Haller and Rodrigues, 2005).

Genetic studies related to reproductive behavior and the genetic profile of the offspring are essential for estimating the relative contribution of mating systems as a reproductive strategy for the males involved in the mating. These studies have further important implications for the ecology of populations, genetic structure and to assess the

conservation status of endangered species. Little data are available about the reproductive system in the genus *Podocnemis*, mainly regarding the type of mating systems. Among the few published works, Valenzuela (2000) and Pearse et al (2006) reported multiple paternity in *Podocnemis expansa* nests. No information is available about the reproductive system for the other species of the genus, however.

Mating system in animal population is an important parameter in conservation genetics since it has directly influence on effective population size (Balloux and Lehmann, 2003). Studies of reptile reproductive systems has advanced substantially over the last few decades (Bowen and Karl, 1996; Crim et al., 2002; Curtis, 1998; Dutton et al., 1998; FitzSimmons, 1998; Jensen et al., 2006; Moore and Ball, 2002; Rieder, 1996). However, still little is now about the mating system in many chelonians species. Molecular methodologies, as microsatellite markers, has been the tools by which researchers have been able to resolve difficult questions unanswerable with just field observation, in particular those related to the mating systems (Crim et al., 2002; Myers and Zamudio, 2004; Valenzuela, 2000). DNA microsatellite loci have been adopted for diverse biological analyses, and may be used for population analyses, ecological studies, and conservation biology, among other applications (Goldstein and Schlötterer, 1999; Jarne and Lagoda, 1996).

Considering that the patterns of mating system in chelonians encompass considerable intra and interspecific diversity in the presence/absence or levels of polyandry and polygyny, and considering that only one species from the *Podocnemis* genus (out of six) have been studied about their mating system, we utilized eight highly variable microsatellite loci to check the type of paternity for *Podocnemis unifilis*.

Material and methods

Samples were collected at a nesting beach near Barreirinha, Amazon River, Amazonas, Brazil (Figure 1). As part of the ongoing Pé-de-Pincha conservation project, six clutches of eggs were isolated by encircling with a fence until they hatched. At the time of hatching, upto 0.5 ml of blood per individual hatchling was collected. Keeping with licensing restrictions, hatchlings were released immediately after collection of the blood samples. We sampled 66 hatchlings from 6 nests. The numbers of hatchlings analyzed per nests were as follow: N1=9 (out of 16), N2=11 (out of 13), N3=11 (out of 12), N4=12 (out of 14), N5=12 (out of 19), and N6=11 (out of 11). Maternal DNA was not possible to obtain since the field collection was done after the nests season. Taking into account that each *P. unifilis* adult female lays on average of 19 eggs (HallerandRodrigues, 2005; SouzaandVogt, 1994; Valle et al., 1973; Vanzolini, 1977), our sampling represented more than 50% of the offspring sample size for this species.

To assess paternity, we chose eight microsatellite loci from those characterized by Fantin et al. (2007) for *P. unifilis* that gave us best potential for relatedness analysis based on the estimated of the probability of paternity exclusion at an individual locus (Q or P_{ei}), the total probability of paternal exclusion at all loci (QC or P_{et}) following Weir (1996) the estimated probability of genetic identity at an individual locus (I), and the joint probability of genetic identity at all loci (IC), according to Paetkau et al. (1995) (Table 1). Total genomic DNA was extracted using GFX DNA extraction kit (GE-Healthcare). PCR was performed following the economic protocol of Schuelke (2000) in 10 μ l reaction volumes. The final volume was 5 mM KCl, 1 mM Tris-HCl, 1.75 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 0.2 μ M reverse primer, 0.1 μ M forward primer, 0.1 μ M TETTM labeled M13 label primer, 0.05

units/ μ L LGC Biotecnologia Taq DNA Polymerase, and about 1 ng/mL genomic DNA. PCRs were run in a Thermo Hybaid thermocycler and had two main steps: an initial denaturation step (94°C, 1 min.) followed by 25 cycles of 50 sec. at 94°C, 50 sec. at primer-specific annealing temperature (Table 1), 1 min. at 72°C; followed by 20 cycles of 40 sec. at 92°C, 35 sec. at 50°C, 40 sec. at 68°C, and a final extension step for 20 minutes at 72°C. PCR products were visualized on a MegaBACE 1000 Fragment Profiler v1.2 software (GE-Healthcare). Allele sizes were scored against the size standard ET-400 ROX (GE-Healthcare).

In order to analyze the multiple paternity of the clutches we first applied a simple method consisted of the counting of alleles found in each nest (FitzSimmons, 1998; MyersandZamudio, 2004; Valenzuela, 2000). The simple method implemented for attribution of multiple paternity was analyzed by the interference of the maternal genotypes through the presence of individual homozygotes in the nest. When the young of a nest present homozygotes for two different alleles, the complete maternal genotype may be inferred (young = AA and BB; maternal genotype = AB). If, in a nest for a particular locus, a single offspring is homozygous, only one of the maternal alleles may be detected (young = AA; maternal genotype A₁). Considering that the two parental are heterozygotes for different alleles, a total of four alleles present would be the maximum expected for each nest. If one maternal allele can be identified, multiple paternity is estimated for a nest when the analysis of a locus indicates the presence of four or more alleles; and if the two maternal alleles can be identified, then three or more alleles indicate multiple paternity. This method attributed multiple paternity in a nest using standard allelic distribution pattern tests on the offspring, and in addition we considered the presence of five alleles per locus among the offspring indicative of multiple paternity, considering that cases where we could not infer any maternal alleles.

When analyzing the data from microsatellites, there is a probability that new alleles will appear that do not stem from the relationship between the members of a pair. Thus, we assume the following situation: when we analyze the genotypes of the homozygotes in a nest to infer the maternal alleles, and in this nest, one offspring presents an unexpected allele, in a single loci, this allele may have come from a new mutation, and so the alleles derived from new mutations would not be considered, indeed, excluded from the analyses.

The multiple paternity of the clutches were also analyzed by the relatedness coefficients r_{xy} calculated in the program KINSHIP 1.3 (GoodnightandQueller, 1999). For the *P. unifilis*, allele frequencies needed to calculate r_{xy} were estimated from the all the 66 offspring sampled in this study. The relatedness coefficient can be interpreted as the fraction of alleles that are shared identical by descendent, and equals twice the coefficient of co-ancestry or consanguinity when neither individual is inbred (Pamilo, 1989). On average, in full-sib dyads, 50% of the alleles are shared identical by descendent ($r=0.50$), in half-sibs 25% ($r=0.25$), in first cousins 12.5% ($r=0.12.5$) and in unrelated individuals 0% ($r=0$) (Blouin, 2003). According to these categories the relatedness coefficients vary from -1 to 1 which values of -1 to 0 indicate unrelated individual.

Results

The combine set of microsatellite loci used in the present study are robust for detecting multiple paternity in *P. unifilis* nests. For all the eight loci analyzed the indexes of joint probability of paternity exclusion and genetic identity were highly robust at $P = 0.9953$ and $P = 1,34 \times 10^{-15}$, respectively (Table 1).

Table 2 summarizes the results of the simple method of the counting of alleles found in each nest. In the six *P. unifilis* nests analyzed, the maximum number of observed allele per locus was six (nest N3) and the minimum number was two (nests: N1, N2, N3, N4, N5 and N6). Nests N1, N2 and N5 had one locus with more than four alleles, and N3 and N6 had two loci with more the four alleles. Nest N1 contained only one locus (2E7) with two extra alleles that indicated multiple paternity. Nest N4 also has one locus (1H9) indicative of multiple paternity, even with the presence of only three alleles. The number of homozygote genotypes observed in the nestlings was important to infer the maternal genotype for some of the nests, and also to estimate how many adult individuals could be contributing genetically to each nest. Using the information obtained from the number of homozygous genotypes observed in the hatchlings, and the total number of alleles observed in the hatchlings, we could infer at least two males contributing genetically to the hatchlings in all nests. Nest N5 indicated the contribution of at least three males to the clutch.

The relationship categories presented by the KINSHIP results show that, in most of the *P. unifilis* nest, there are all the three main relationships categories among offspring: full-sib, half-sib, and unrelated individuals (Figure 2). Majority of relationship coefficients were below 0.5 supporting the existence of cases of polyandry.

Discussion

The results shown here represent an additional contribution to knowledge of the reproductive behavior of turtles of the *Podocnemis* genus, and suggest that all *P. unifilis* nests in the specifically location studied here probably were fathered by a minimum of two

different males, with exception of nest N4. Such result could be inferred by the presence of extra alleles found in all the nests analyzed due the contribution of different fathers (Table 2). The presence of six alleles found in nest N3 (Table 2) indicates a minimum of three different males contributing genetically to the offspring.

There were two nests where we observed only one locus suggestive of multiple paternity. In nest N1 locus 2E7 indicated multiple paternity. Based in the inferred number of extra alleles (2) it is very unlikely that this locus would have two independent, high frequency mutations to explain these new alleles, therefore an extra paternal contribution could not be rejected. Nest N4 had only one microsatellite locus (1H9) indicative of multiple paternity, even with the presence of only three alleles. The presence of this additional allele which is found in high frequency could be explained by an additional paternal contribution; however, it is also possible that this allele is a result of a mutational event early on in the formation of the germline. In this case, one of the parents would be a genetic mosaic in the germline, producing three types of alleles.

Although we are affirming polyandry in *P. unifilis*, with a minimum contribution of two males, we cannot discard the hypothesis that there are greater numbers of males fertilizing females' eggs. We have to consider that, within the population studied, there is a possibility of individual males possessing the same genotypes, and thus they could not be genetically distinguished.

There have been few studies of turtles of the *Podocnemis* genus investigating their reproductive behavior, and in particular the type of mating system that occurs in these species. The studies by Valenzuela (2000) and Pearse et al. (2006) were the first to provide evidence of multiple paternity in *P. expansa* inferred from microsatellite marker patterns. Valenzuela (2000) found multiple paternity when studying two *P. expansa* nests with eight microsatellite

loci, and suggesting, moreover, that there is sperm stocking in this species and admixture of sperm from different reproduction periods. Pearse et al. (2006) analyzed seven microsatellite loci in 32 *P. expansa* nests in Venezuela, and observed multiple paternity in only 10.3% of the nests, showing the existence of differences in paternity pattern among different populations of this species.

Various species of chelonians show patterns of multiple paternity. In marine turtles, we can find examples of multiple paternity in some species, such as the loggerhead turtle (*Caretta caretta* Linnaeus, 1758) (Bollmer et al., 1999; HarryandBriscoe, 1988; MooreandBall, 2002), the green turtle (*Chelonia mydas* Linnaeus, 1758) (FitzSimmons, 1998; Ireland et al., 2003), and the Kemp's ridley turtle (*Lepidochelys kempi* Garman, 1880) (Kichler et al., 1999). In freshwater turtles, multiple paternity was verified in the snapping turtle (*Chelydra serpentina* Linnaeus, 1758) (Galbraith et al., 1993), the wood turtle (*Clemmys insculpta* LeConte, 1829) (Galbraith, 1991), the painted turtle (*Chrysemys picta* Schneider, 1783) (McTaggart, 2000; Pearse et al., 2002), and the side-neck turtle (*Podocnemis expansa*) (Pearse et al., 2006; Valenzuela, 2000).

However, single paternity is also featured among the chelonians. Rieder (1996) examined five leatherback (*Dermochelys coriacea* Vandelli, 1761) nests in Playa Grande, Costa Rica, and concluded that all the nests had single paternity. Dutton et al. (1998) reported a low frequency of multiple paternity in leatherback (*Dermochelys coriacea*) sea turtle nests in St. Croix, US Virgin Islands.

Studies in captivity demonstrated that female chelonians can stock sperm for future egg-laying (Ewing, 1943; OlssonandMadsen, 1998). The difference in the number of males fertilizing the eggs could, therefore, be related with the stocking of sperm from males in previous seasons. Temperate freshwater turtles can generally lay two to four nests in one

summer (Pearse and Avise, 2001). *Podocnemis unifilis* females can lay up to twice a year (Soini, 1964), and in these clutches eggs can be found that have been fertilized by sperm from copulations in previous seasons in addition to eggs fertilized by different males in the same breeding season. The majority of the six nests analyzed in this study represented more than 50% the offspring born in the nest. Even though the analysis of the data from the eight polymorphic microsatellites had shown two nests (N1 and N4) presenting low levels of multiple paternity, this type of mating system seems to be a condition that prevails in this species.

The analyses of the mating system of diverse species of chelonians can reveal fundamental aspects of these animals' population biology. There are some direct benefits for the female to mate with multiple males, such as to insure fertilization if the quantity of sperm from one male is insufficient to fertilize all eggs, to maximizing the fitness of their offspring, and there are indirect genetics benefits for the species as a whole in maintain large effective population size, since a limited number of males mating with a large number of females can lead to genetic decline in the effective size of the population, which is the key parameter in evolution (for a review see Reichard et al., 2007). In natural populations where multiple mating take place, knowledge of its prevalence and effects on paternity distribution within a natural assemblage is vital to comprehend the biology of a species. Further studies analyzing additional are necessary to more precisely define the frequency of multiple paternity and to investigate associations between types of mating systems and factors such as sex ratio and intensity of hunting. Our knowledge of the system of mating and its dependence on other factors can therefore be of great importance to the management and conservation of this threatened species.

The results of this study provide a starting point for the understanding of the reproductive biology of *P. unifilis*. Until this study, there has been a scarcity of basic biological information let alone the mating system of *P. unifilis*. Such basis data are fundamental for devising better management and conservation plans for this endangered species.

Acknowledgments

The authors thank the “Pé-de-Pincha” turtle project for helping in the collection of samples. We thank Tomas Hrbek for comments on the MS, and Renata Frederico for map of the study area. This research was supported by grants to IPF from PPG7/CNPq (557090/2005-9). Permission to collect tissue samples was granted by RAN/IBAMA No. 113/2006. This work forms a portion of CF’s Ph.D. thesis at the Biotechnology program of Universidade Federal do Amazonas; CF was supported by a Ph.D. fellowship from SUFRAMA.

References

- Balloux, F., Lehmann, L. (2003): Random mating with a finite number of matings. *Genetics*. **165**: 2313.
- Blouin, M.S. (2003): DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends Ecol. Evol.* **18**: 503-511.
- Bollmer, J.L., Irwin, M.E., Reider, J.P., Parker, P.G. (1999): Multiple paternity in loggerhead turtle clutches. *Copeia*. **2**: 475-478.
- Bowen, B.W., Karl, S.A., (1996): Population structure, phylogeography, and molecular evolution. In: *The biology of sea turtles*, p. 29-50. P.L. Lutz, A. Musick Eds. CRC Press
- Crim, J.L., Spotila, L.D., Spotila, J.R., O'Connor, M., Reina, R., Williams, C.J., Paladino, F.V. (2002): The leatherback turtle, *Dermochelys coriacea*, exhibits both polyandry and polygyny. *Mol. Ecol.* **11**: 2097-2106.
- Curtis, C. (1998): Genotyping with polymorphic markers reveals multiple paternity in leatherback turtle clutches. Drexel University, Philadelphia, PA, USA.
- Dutton, P.H., Bixby, E., Davis, S.K. (1998): Tendency towards single paternity in leatherbacks detected with microsatellites. In *18th International Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*, ed. F.A. Abreu-Grobois. pp. 39. NOAA Technical Memorandum, Miami, FL, USA.
- Ewing, H.E. (1943): Continued fertility in female box turtles following mating. *Copeia*. **1943**: 112-114.
- Ferri, V., (2002): *Turtles & Tortoises. A Firefly Guide*. Firefly Books, New York.
- FitzSimmons, N.N. (1998): Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Mol. Ecol.* **7**: 575-584.

- Galbraith, D.A. (1991): Studies of mating systems in wood turtles (*Clemmys insculpta*) and snapping turtles (*Chelydra serpentina*) using DNA fingerprinting (PhD dissertation). Queen's University, Kingston, Ontario.
- Galbraith, D.A., White, B.N., Brooks, R.J., Boag, P.T. (1993): Multiple paternity in clutches of snapping turtles (*Chelydra serpentina*) detected using DNA fingerprints. *Can. J. Zoo.* **71**: 318-324.
- Goldstein, D.B., Schlötterer, C. (eds.), (1999): *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, New York, NY.
- Goodnight, K.F., Queller, D.C. (1999): Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Mol. Ecol.* **8**: 1231-1234.
- Haller, E.C.P., Rodrigues, M.T. (2005): *Podocnemis unifilis* (Yellow-spotted River Turtle). Nests and Nesting. *Herpet. Rev.* **36**: 60.
- Harry, J.L., Briscoe, D.A. (1988): Multiple paternity in the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *J. Heredity.* **79**: 96-99.
- Ireland, J.S., Broderick, A.C., Glen, F., Godley, B.J., Hays, G.C., Lee, P.L.M., Skibinski, D.O.F. (2003): Multiple paternity assessed using microsatellite markers, in green turtles *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) of Ascension Island, South Atlantic. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **291**: 149-160.
- Iverson, J.B., (1992): *A Revised Checklist with Distribution Maps of the Turtles of the World*. Printed Privately, Richmond, VA.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L. (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* **11**: 424-429.

- Jensen, M.P., Abreu-Grobois, F.A., Frydenberg, J., Loeschcke, V. (2006): Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. non-arribada olive ridley sea turtle rookeries. *Mol. Ecol.* **15**: 2567-2575.
- Kichler, K., Holder, M.T., Davis, S.K., Marquez, M.R., Owens, D.W. (1999): Detection of multiple paternity in the Kemp's Ridley sea turtle with limited sampling. *Mol. Ecol.* **8**: 819-830.
- McTaggart, S.J. (2000): Good genes or sexy sons? Testing the benefits of female mate choice in the painted turtle, *Chrysemys picta* (Masters thesis). University of Guelph, Guelph, Ontario.
- Moore, M.K., Ball, R.M. (2002): Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. *Mol. Ecol.* **11**: 281-288.
- Myers, E.M., Zamudio, K.R. (2004): Multiple paternity in an aggregate breeding amphibian: the effect of reproductive skew on estimates of male reproductive success. *Mol. Ecol.* **13**: 1951-1963.
- Olsson, M., Madsen, T., (1998): Sexual selection and sperm competition in reptiles. In: Sperm competition and sexual selection, p. 503-578. T.R. Birkhead, A.P. Moller Eds. Academic Press, San Diego.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., Strobeck, C. (1995): Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.* **4**: 347-354.
- Pamilo, P. (1989): Comparison of relatedness estimators. *Evolution.* **44**: 1378-1382.
- Pearse, D.E., Avise, J.C. (2001): Turtle mating systems: behavior, sperm storage, and genetic paternity. *J. Heredity.* **92**: 206-211.

- Pearse, D.E., Dastrup, R.B., Hernandez, O., Sites Jr., J.W. (2006): Paternity in an Orinoco population of endangered Arrau River turtles, *Podocnemis expansa* (Pleurodira; Podocnemididae), from Venezuela. *Chelonian Conserv. Biol.* **5**: 232-238.
- Pearse, D.E., Janzen, F.J., Avise, J.C. (2002): Multiple paternity, sperm storage, and reproductive success of female and male painted turtles (*Chrysemys picta*) in nature. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **51**: 164-171.
- Pritchard, P.C.H., Trebbau, P., (1984): *The Turtles of Venezuela*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ann Arbor, MI.
- Reichard, M., Le Comber, S.C., Smith, C. (2007): Sneaking from a female perspective. *Anim. Behav.* **74**: 679-688.
- Rieder, J.P. (1996): *Mating systems and conservation biology: microsatellite analysis of paternity in leatherback sea turtle clutches*. Ohio State University, Columbus, OH, USA.
- Schuelke, M. (2000): An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotech.* **18**: 233-234.
- Smith, N.J.H. (1979): Quelônios aquáticos da Amazônia: um recurso ameaçado. *Acta Amaz.* **9**: 87-97.
- Soini, P. (1964): Ecología reproductiva de la taricaya (*Podocnemis unifilis*) en el Rio Pacaya, Peru. *Folia Amaz.* **6**: 105-124.
- Souza, R.R., Vogt, R.C. (1994): Incubation temperature influences sex and hatchling size in the neotropical turtle *Podocnemis unifilis*. *J. Herpetology.* **28**: 453-464.
- Valenzuela, N. (2000): Multiple paternity in side-neck turtles *Podocnemis expansa*: evidence from microsatellite DNA data. *Mol. Ecol.* **9**: 99-105.

Valle, R.C., Alfinito, J., da Silva, M.M.F. (1973): Contribuição ao estudo da tartaruga Amazônica. In *Simpósio Internacional sobre manejo de Fauna Silvestre e Pesca Fluvial e Lacustre Amazônica*. IBDF/SUDEPE/IICA, Manaus, Amazonas.

Vanzolini, P.E. (1977): A brief biometrical note on the reproductive biology of some South American *Podocnemis* (Testudines, Pelomedusidae). *Papeis Avulsos Zool.* **31**: 79-102.

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

Figure Legends

Figure 1. Map showing the location of Barreirinha site for the nests of *P. unifilis* studied in the present work.

Figure 2. Distribution of relatedness (r_{xy}) values for pairs of offspring from each clutch of *P. unifilis*.

Table 1. Microsatellites loci screened for the paternity test in *P. unifilis* (from Fantin et al. 2007). H_E = expected heterozygosity; Q = probability of paternity exclusion; I = probability of genetic identity; Joint probability of paternal exclusion at all loci (QC); Joint probability of genetic identity at all loci (IC).

Locus	Repeat motif	T°C	N° of individuals/ alleles	H_o	H_e	Q	I
1B2	(GA) ₁₇	55	24/10	0.792	0.863	0.7009	0.0433
1D9	(GA) ₁₂	62	24/8	0.458	0.686	0.4510	0.1572
1D12	(GA) ₁₀	55	24/3	0.875	0.595	0.2672	0.3199
1E1	(CT) ₉ tt(CT) ₇	64	23/7	0.783	0.818	0.6140	0.0738
1F10	(CT) ₈	60	24/4	0.208	0.598	0.3072	0.2785
1H9	(GA) ₁₂	60	24/7	0.458	0.627	0.3767	0.2149
2E7	(GA) ₅ gc(GA) ₈	56	24/7	0.783	0.748	0.5235	0.1159
2F6	(CT) ₆ t(CT) ₁₀	60	24/7	0.608	0.736	0.5129	0.1204
Overall				0.621	0.709	$QC=0.9953$	$IC=1,34 \times 10^{-15}$

Table 2. Number of alleles (N), Number of homozygotes (Nh), and Inferred number of extra alleles ($Inea$) in each locus per nest of *P. unifilis*.

Nests		1B2	1D9	1D12	1E1	1F10	1H9	2E7	2F6
N1	N	3	2	2	3	2	2	5	3
	Nh	0	2	1	1	2	2	1	1
	$Inea$	0	0	0	0	0	0	2	0
N2	N	4	3	4	4	3	2	4	5
	Nh	1	2	0	1	2	2	2	0
	$Inea$	1	1	0	1	1	0	2	1
N3	N	3	6	3	3	2	5	3	4
	Nh	1	0	1	2	1	0	2	1
	$Inea$	0	2	0	1	0	1	1	1
N4	N	3	3	3	4	2	3	3	4
	Nh	1	1	0	0	1	2	1	1
	$Inea$	0	0	0	0	0	1	0	0
N5	N	4	2	4	4	5	3	3	4
	Nh	0	2	0	0	2	1	2	1
	$Inea$	0	0	0	0	3	0	1	1
N6	N	5	4	4	4	2	5	4	3
	Nh	0	1	0	1	2	1	2	0
	$Inea$	1	1	0	1	0	2	2	0

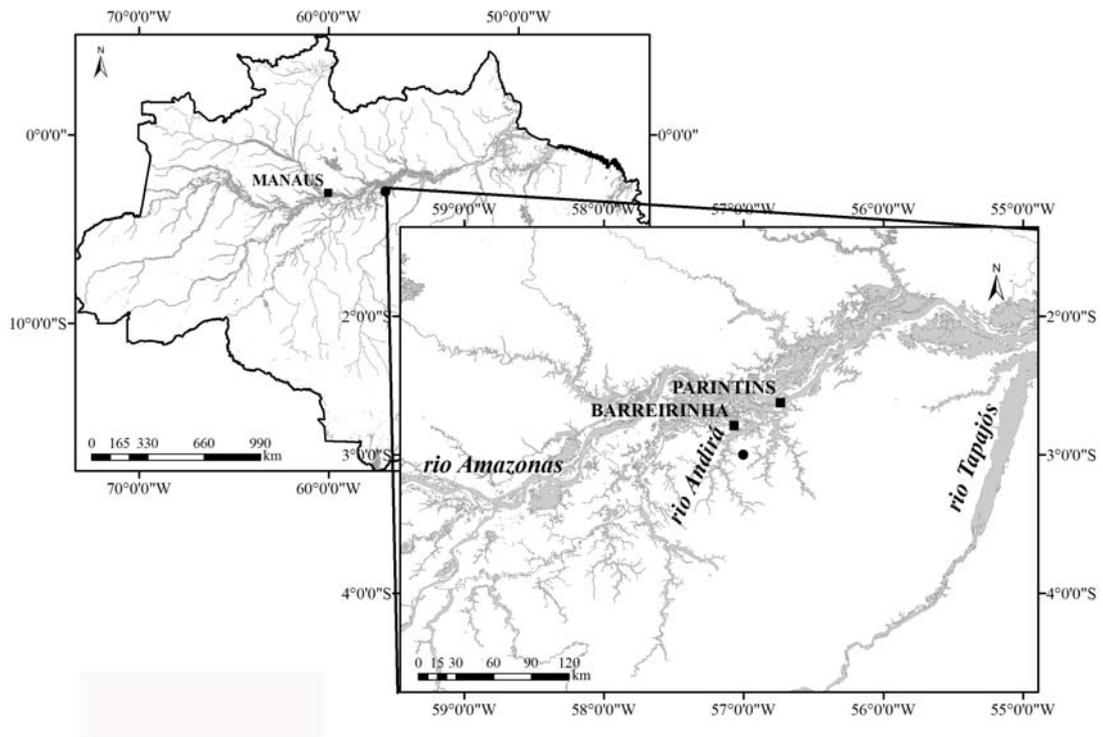


Figure 1. Map showing the location of Barreirinha site for the nests of *P. unifilis* studied in the present work.

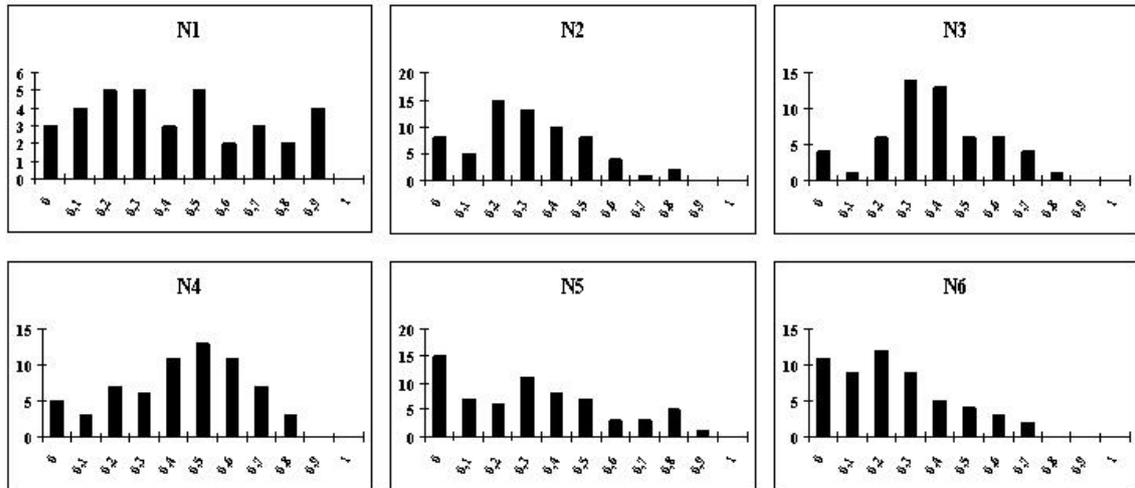


Figure 2. Distribution of relatedness (r_{xy}) values for pairs of offspring from each clutch of *P. unifilis*.

CAPÍTULO III

Evidência de paternidade múltipla, através de marcadores microssatélites, em *Podocnemis sextuberculata* (Chelonia, Podocnemididae).

Evidência de paternidade múltipla, através de marcadores microssatélites, em *Podocnemis sextuberculata* (Chelonia, Podocnemididae).

Fantin, C.; Hrbek, T.; Monjeló, L.A.S. & Farias, I.P.

Instituto de Ciências Biológicas, Univ. Federal do Amazonas. Brasil, Manaus.

Resumo

Com o objetivo de esclarecer qual o sistema de cruzamento em *P. sextuberculata*, foi estimado o grau de polimorfismo de microssatélites de DNA em uma amostra de 80 filhotes recém eclodidos de sete ninhos de *P. sextuberculata* provenientes do rio Amazonas, Município de Barreirinha-AM. Através da frequência e variação alélica em seis locos de microssatélites de DNA determinou-se a ocorrência de paternidade múltipla em todos os ninhos amostrados desta espécie. Para um ninho atribuiu-se a presença de no mínimo três machos contribuindo na prole, enquanto para todos os demais considerou-se a ocorrência da paternidade de pelo menos 2 machos por ninho. Esta é a primeira referência comprovada geneticamente de paternidade múltipla como sistema de cruzamento em *P. sextuberculata*.

Introdução

A fauna de tartarugas na América do Sul é rica e variada, compreendendo cerca de 20% das espécies viventes encontradas no mundo. O gênero *Podocnemis* compreende seis espécies, entre elas *Podocnemis sextuberculata*, que é conhecida popularmente como iaçá, pitiú ou cambéua. A coloração da carapaça varia de marrom-clara a marrom-escura. O macho adulto é menor que a fêmea e nos indivíduos jovens o plastrão apresenta seis tubérculos de

cor cinza ou marrom, os quais conferem o nome à espécie (*P. sextuberculata*) (IBAMA, 1989). Sua distribuição geográfica abrange a drenagem do rio Amazonas no Brasil, Peru e Colômbia (Ernst, Barbour, 1989a; Iverson, 1992). Os ninhos são feitos nas praias dos rios, uma ou duas vezes por ano, onde oito a 19 ovos elípticos são colocados (Ferri, 2002).

A investigação do sistema reprodutivo dos répteis avançou substancialmente nas últimas décadas (Bowen, Karl, 1996; Crim *et al.*, 2002; Curtis, 1998; Dutton *et al.*, 1998; FitzSimmons, 1998; Galbraith, 1991; Galbraith *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 2006; Moore, Ball, 2002; Rieder, 1996). Poucas espécies de Testudines têm seu comportamento reprodutivo descrito em detalhes. Carpenter e Ferguson (1977) comentam que como a maioria das espécies de Testudines é aquática, há uma dificuldade de observação do comportamento na natureza, ocasionando falta de detalhes.

Recentemente alguns aspectos do comportamento reprodutivo de quelônios, tais como a fidelidade do ninho-local, foram investigadas através da genética molecular, entretanto alguns aspectos permanecem ainda não estudados (Bowen, Karl, 1996). As análises de parentesco de ninhos de tartarugas podem revelar aspectos fundamentais da biologia da população, mas a maioria dos esforços é limitada por tamanhos de amostra pequenos e/ou por marcadores ambíguos, e não está muito estabelecido se a paternidade múltipla é a exceção ou a regra.

Recentes estudos de comportamento reprodutivo em *P. expansa*, demonstram que as fêmeas desta espécie apresentam comportamento poliândrico com diferentes taxas de paternidade múltipla existente entre ninhos de diferentes localidades (Pearse *et al.*, 2006; Valenzuela, 2000). No entanto, são inexistentes na literatura dados sobre o padrão reprodutivo nas outras espécies do gênero *Podocnemis*.

Dados de genética molecular, têm sido amplamente utilizados em estudos de comportamento reprodutivo (DeWoody *et al.*, 2000; Myers, Zamudio, 2004; Neff *et al.*, 2000; Pearse *et al.*, 2006; Valenzuela, 2000). Dentre as técnicas moleculares disponíveis, o uso dos marcadores microssatélites tem sido a ferramenta sucessivamente utilizada para responder questões de parentesco, como a determinação do tipo de paternidade em um grande número de taxa e espécies.

Quando se pensa em paternidade múltipla podemos inferir que fêmeas parecem fazer uma escolha cuidadosa antes de se acasarem, de modo que machos particulares conseguem a maioria das parceiras. Os únicos ganhos possíveis com tal escolha pode ser um acasalamento seguro com benefícios genéticos. Por exemplo, as fêmeas de *Lyrus tetricus* preferem, para o acasalamento, os machos que fazem exhibições mais vigorosas durante a corte, pois obterão bons genes para a sua prole (Alatalo *et al.*, 1991).

Um fator chave na determinação da distribuição temporal de parceiros sexuais é a razão sexual operacional, que é a razão entre fêmeas receptivas e machos sexualmente ativos a cada momento (Krebs, Davies, 1996). Se todas as fêmeas procriam em sincronia, com uma razão sexual real de 1:1 na população, a razão sexual operacional durante a reprodução também será 1:1. Nesta situação, haverá pouca chance de um macho se acasalar com mais de uma fêmea, porque quando ele estiver acabando de se acasalar pela primeira vez, todas as outras fêmeas também estarão acabando de reproduzir (Krebs, Davies, 1996).

A distribuição de recursos, como locais adequados de ovoposição e de alimentação, e a distribuição de fêmeas no espaço e no tempo, em conjunto, exercem influências sobre o modo como os indivíduos se comportam, a fim de maximizar o sucesso reprodutivo. Entretanto, não devemos esperar que todos os indivíduos de uma espécie se comportem exatamente da mesma maneira (Krebs, Davies, 1996).

Neste estudo, análises de marcadores microssatélites foram usadas para determinar o sistema reprodutivo em uma população de *P. sextuberculata*. Como poucos são os estudos envolvendo o comportamento reprodutivo desta espécie, os relatos deste estudo têm como objetivo gerar informações que em adição aos dados ecológicos possam ser utilizadas para dar suporte a programas de manejo adequados para conservação destes quelônios, inclusive para os criadores de tartarugas em cativeiro, incentivando outros estudos para um melhor conhecimento dos processos biológicos de *P. sextuberculata* e outras espécies do gênero.

Material e métodos

Foram amostrados 80 indivíduos recém eclodidos de sete ninhos de *P. sextuberculata* do rio Amazonas, Barreirinha-AM (S3°03'25''/W57°10'28'') (Figura 1). As coletas foram realizadas com o apoio de integrantes do Projeto Pé-de-Pincha (UFAM), que separaram os ninhos aleatoriamente. Os ninhos foram transplantados para um local protegido por comunitários, conhecido como berçário, onde permaneceram cercados até o momento da eclosão. Após a eclosão, as amostras de sangue foram retiradas e em seguida os animais foram devolvidos para a natureza no local onde foram coletados. O número de indivíduos analisados para cada ninho foi de: N1=12, N2=12, N3=12, N4=12, N5=12, N6=8 e N7=12. Foram coletados até 500 µL de sangue, através de punção da veia femural utilizando seringa de 1mL, e posteriormente armazenados em tubos eppendorfs com 500 µl de etanol absoluto. Nenhum animal foi sacrificado.

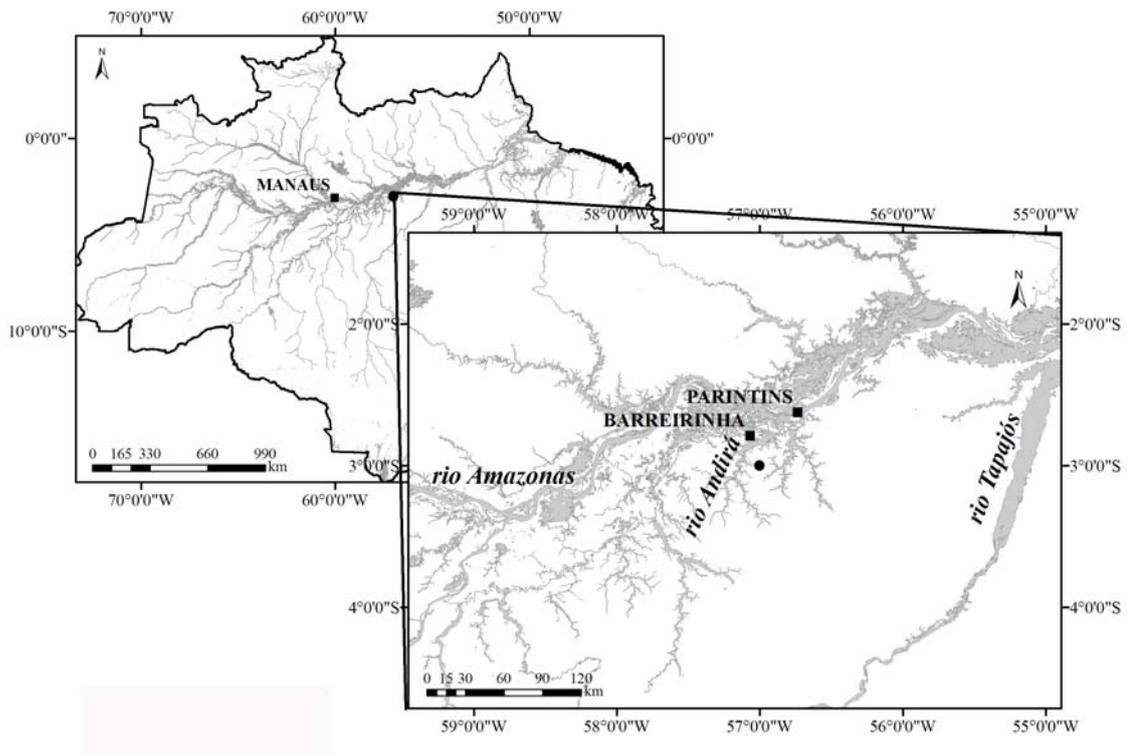


Figura 1. Mapa mostrando o local de coleta dos ninhos de *P. sextuberculata*.

O procedimento utilizado para extração do DNA foi através do Kit GFX. Para a amplificação de DNA, utilizamos seis locos de microssatélites desenvolvidos para *P. unifilis* por Fantin *et al.* (2007), 1 loco desenvolvido para *P. expansa*, por Sites *et al.* (1999) e 1 locos desenvolvido para *P. expansa*, por Valenzuela (2000). A PCR de genotipagem seguiu o protocolo econômico descrito por Shuelke (2000), onde se adiciona uma cauda de M13 a um dos primers, e marca-se somente o primer do M13 com a fluorescência desejada. A quantidade de primer forward será menos da metade do primer reverso. As condições de termociclagem foram ajustadas para um volume total de 10 μ L, contendo 3,7 μ l of H₂O, 1,0 μ l of 10x Buffer com (NH₄)₂ SO₄ (Fermentas), 1,5 μ l of MgCl₂ (25mM), 1,0 μ l de reverse primer (0,2 μ M), 0,5 μ l de forward primer (0,2 μ M), 0,5 μ l de FAM -6 labeled M13 label primer (0,2 μ M), 1,5 μ l de dNTP mix (0,2 mM cada dNTP), 0,3 μ l de LGC Biotecnologia

Taq DNA Polymerase (1U/ul), e 1µl of DNA (10 ng). A temperatura inicial de desnaturação foi de 94°C por 1 minuto, seguida por 25 ciclos à 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 68°C por 30 segundos. Em seguida 20 ciclos à 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 68°C por 30 segundos com uma extensão final à 72°C por 15 minutos. O fragmento de DNA amplificado foi previamente visualizado através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1%.

Em seguida, os produtos de PCR foram diluídos na proporção de 1:100 e adicionado o marcador de tamanho ROX pUC-19 (79, 90, 105, 131, 151, 182, 201, 254, 306, 337, 362, 425, 486, 509 e 550) modificado de DeWoody *et al.* (2004). As genotipagens foram realizadas no seqüenciador automático de DNA ABI 3730xl, e a análise dos alelos observados para cada loco, foi feita usando o programa GeneMapper v.4.0.

Para o cálculo da probabilidade de exclusão de paternidade, utilizou-se o método descrito por Weir (1996). A probabilidade de exclusão de paternidade (Q) é o parâmetro que se baseia na exclusão de vários machos, envolvidos no acasalamento, mas que podem ser estatisticamente distinguidos. Através deste parâmetro não se descobre quem é o pai mais provável, no entanto é possível a exclusão de prováveis pais na população estudada. Valores de exclusão de paternidade mais próximos de 1 trazem maior confiabilidade para se excluir corretamente um indivíduo da paternidade. A probabilidade de dois indivíduos não relacionados apresentarem o mesmo genótipo é calculada através do método de identidade genética (I) descrito por Paetkau *et al.* (1995). Considerando todos os locos analisados em conjunto também analisou-se a probabilidade de exclusão da paternidade (QC) (Weir, 1996), e a probabilidade conjunta de identidade gênica (IC).

Usando o método mínimo de contagens de alelos (Myers, Zamudio, 2004), que pressupõe uma distribuição Mendeliana dos alelos na progênie, considera-se a presença de

cinco alelos por loco amostrado entre os filhotes de cada ninho, um indicativo de paternidade múltipla, se nenhum alelo maternal for conhecido. 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. Quando um alelo materno pode ser inferido, estima-se paternidade múltipla para um ninho, se a análise de um loco indicar a presença de quatro alelos; e se os dois alelos maternos puderam ser detectados, a presença de três alelos no loco analisado indica paternidade múltipla no ninho.

A análise de paternidade também baseou-se no coeficiente de probabilidade de parentesco (r_{xy}) realizado na versão 1.2 do programa KINSHIP (Goodnight, Queller, 1999). As análises não são dependentes do conhecimento dos alelos paternos ou maternos. Este programa necessita das frequências alélicas de cada loco analisado na população, que foi obtida através do Programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), utilizando-se os 80 filhotes analisados. Para calcular os valores de (r), assumi-se que não existe desequilíbrio de ligação, endocruzamento e taxas de mutação. O programa estima dois valores de verossimilhança para cada par de indivíduos dentro da agregação para duas hipóteses, a primeira hipótese considera algum nível de relacionamento, e a hipótese nula considera que não existe nenhum tipo de relacionamento, onde os valores de P_{xm} , P_{ym} , P_{xp} e P_{yp} são as frequências alélicas da população, e X e Y são os indivíduos testados. A partir destes valores, é calculada uma taxa para os pares de indivíduos que resulta em uma matriz simétrica dos valores de relacionamento entre eles. Os coeficientes de parentesco são: $\cong 0,12$ (os indivíduos são considerados primos); $=0,25$, (meio irmãos) e $\geq 0,50$ (irmãos verdadeiros).

Resultados

Foram genotipados 80 filhotes de sete ninhos de *P. sextuberculata* com seis locos de microssatélites. O número de alelos por loco variou de 3-11, com uma média de $7,5 \pm 2,8$ alelos por loco. Os valores do grau de heterozigose observada variaram de 0,2297 (Puni_1D9) a 0,8537 (PE344) (Tabela 1). A probabilidade de dois indivíduos não relacionados apresentarem o mesmo genótipo (I) foi de $1,29 \times 10^{-6}$ e a probabilidade de exclusão de paternidade (Q), quando todos os locos foram combinados o valor de probabilidade conjunta de exclusão (QC) foi de 99,27%, evidenciando um ótimo poder de detecção de paternidade múltipla destes locos para esta espécie (Tabela 1).

Tabela 1. Número de alelos, heterozigozidade observada (Ho), heterozigozidade esperada (He), probabilidade de exclusão de paternidade (Q) e probabilidade de identidade (I) dos 6 locos de microssatélites usados no teste de paternidade em *P. sextuberculata*.

Loco	Nº de alelos	Ho	He	Q	I	Referência
Puni_1B10	7	0,58750	0,68742	0,4824	0,1381	Fantin et al, 2007
Puni_1D9	3	0,22973	0,20620	0,0996	0,6507	Fantin et al, 2007
Puni_2D9	6	0,79487	0,68974	0,4534	0,1588	Fantin et al, 2007
Puni_2E7	11	0,72222	0,82760	0,6736	0,0510	Fantin et al, 2007
Pod91	8	0,79487	0,83830	0,6832	0,0489	Sites et al, 1999
PE344	10	0,85333	0,85834	0,7235	0,0365	Valenzuela 2000
Todos	7,5	0,663753	0,6846	$QC=0,992716$	$IC=1,29 \times 10^{-6}$	

A distribuição do número de alelos nos ninhos por loco é apresentada na Tabela 2, onde se verifica que o número mínimo de alelos encontrados dentro de um ninho foi 1 (Ninho 3, 6 e 7) e o número máximo de 6 (Ninho 1 e 2).

A paternidade múltipla foi encontrada em 4 dos 7 ninhos analisados (Ninho 1, 2, 5 e 7), assumindo o método da simples contagem de alelos (Tabela 2). Quando utilizou-se a contagem, com inferência do alelo materno, todos os ninhos mostraram no mínimo, mais de um macho contribuindo na prole. Com esses resultados, a ocorrência de paternidade múltipla foi atribuída a todos os ninhos de *P. sextuberculata*, com um mínimo de 2 pais contribuindo nos ninhos 1, 3, 4, 5, 6 e 7. Para o ninho 2, o loco Puni_2E7 evidenciou a presença de no mínimo 3 machos contribuindo na prole.

Tabela 2. Quantidade de alelos maternos inferidos/ número de alelos encontrados para cada loco nos ninhos de *P. sextuberculata*. Os alelos maternos foram inferidos através da presença de filhotes homozigotos e os resultados em negrito indicam a presença de paternidade múltipla.

Ninho	1B10	1D9	2D9	2E7	91	344
N1	0/3	1/2	1/3	0/6	0/5	1/3
N2	1/3	1/2	1/3	1/6	2/4	0/4
N3	0/1	0/1	1/3	1/3	2/4	1/3
N4	2/3	1/3	1/3	1/3	1/4	1/3
N5	2/2	1/2	0/4	2/4	0/5	2/3
N6	1/3	0/1	1/3	2/3	1/4	0/4
N7	1/3	0/1	1/2	2/4	1/5	0/4

Através do programa KINSHIP 1.3 (Goodnight, Queller, 1999), que gerou uma matriz com o coeficiente de parentesco (r) entre pares de indivíduos, construiu-se gráficos para cada ninho, em que os níveis de parentesco podem então ser melhor visualizados. Todos os ninhos apresentaram valores de r (coeficiente de parentesco) $<0,5$, indicando filhotes pouco relacionados, evidenciando a existência de contribuição de mais de um macho na prole (Figura 2).

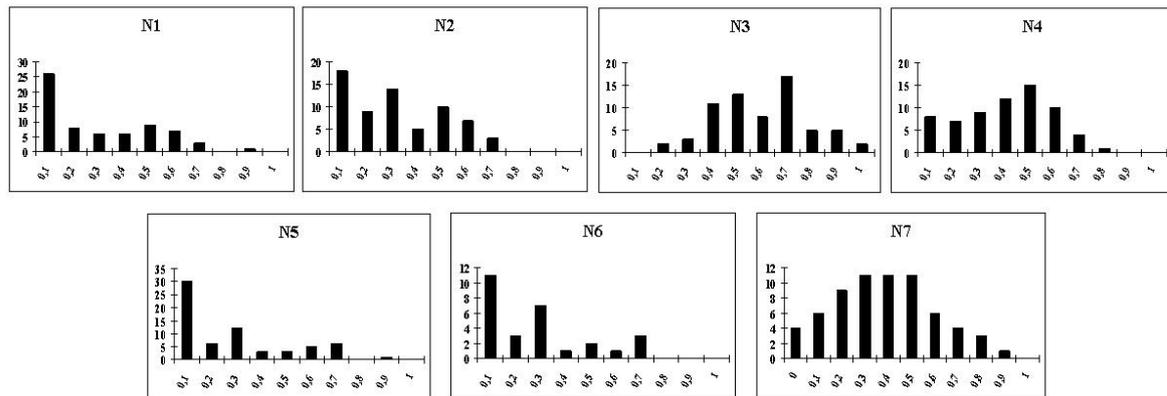


Figura 2. Gráficos da relação de parentesco entre os filhotes, para cada ninho analisado. Onde x indica valores de coeficiente relacionamento e y freqüência. Assume-se que para valores de r (coeficiente de relacionamento) em torno de 0,12, os indivíduos são considerados primos; 0,25, meio irmãos (*half-sib*) e 0,50 ou maior que 0,50, irmãos verdadeiros (*full-sib*).

Discussão

O uso das técnicas moleculares tem ajudado muito no estudo do comportamento reprodutivo de vários organismos, tanto em estudos de populações naturais quanto de cativeiro. Através do uso de marcadores microssatélites, podemos identificar o tipo de paternidade existente em uma população natural de *P. sextuberculata*, onde os resultados do presente trabalho trazem evidência de paternidade múltipla nesta espécie.

A simples contagem de alelos, indica a presença de 6 alelos no loco Puni_2E7, sugerindo paternidade múltipla no ninho 2, com a contribuição de no mínimo 2 machos para esta prole (Tabela 2). Considerando os padrões de herança mendeliana dos alelos em uma ninhada, toda progênie herda um alelo maternal e um paternal, onde cada filhote da ninhada deve conseqüentemente herdar um dos dois alelos maternos e um alelo paterno. Dependendo do número de pais contribuindo na prole e assumindo maternidade única, a presença de 5 alelos na ninhada sugere a contribuição extra de um macho no acasalamento (dois alelos

maternais, dois alelos de um macho parental, e o quinto de um macho parental adicional). No entanto, quando utilizamos a metodologia da inferência de alelos maternos através de filhotes homocigotos no ninho 2, é possível identificar 1 dos alelos maternos para o loco Puni_2E7, indicativo da contribuição de até 3 machos na prole deste ninho. Quando um alelo materno pode ser inferido, estima-se paternidade múltipla para um ninho, quando a análise de um loco indicar a presença de 4 alelos. No caso do ninho 2, como identificamos apenas um alelo materno, inferimos que a mãe e um dos pais possuem o genótipo (A₋), deste modo, é possível atribuir paternidade baseado na reconstrução do número mínimo de genótipos paternos. Baseado nos dados anteriores segue um exemplo que pode explicar a possibilidade da existência de 3 machos contribuindo para a prole no ninho: dois alelos maternais (AB), dois alelos de um macho parental (AC), dois alelos de um macho parental adicional (DE) e um alelo de um terceiro macho parental adicional (F₋).

Um mínimo de dois machos contribuindo na prole também foi identificado nos ninhos 1, 5 e 7, através da simples contagem de alelos por loco nos grupos de filhotes (Tabela 2). O uso da simples contagem de alelos não evidencia paternidade múltipla nos ninhos 3, 4 e 6. No entanto, mais uma vez a quantidade de homocigotos presente no conjunto de alelos dos filhotes, foi extremamente importante para poder estimar a quantidade de machos contribuindo geneticamente na prole. Conforme mostrado na tabela 2, quando foi possível identificar os alelos maternos, verificou-se que todos os ninhos mostraram paternidade múltipla. A análise dos gráficos, construídos através da matriz gerada pelo programa KINSHIP 1.3 (Goodnight, Queller, 1999), também evidencia paternidade múltipla nesta espécie (Figura 2).

Deve-se lembrar que a contagem simples de alelo, não permite estimar o número real de machos contribuindo na prole, já que este método não consegue distinguir pais

múltiplos que possuam alelos em comum. Quando pais diferentes compartilham metade dos alelos, podem ocorrer ambigüidades, embora o uso de um número suficiente de locos altamente polimórficos deva permitir que todas as incertezas sejam resolvidas. Como os 6 locos de microsatélites usados aqui neste trabalho, mostraram uma probabilidade de 2 indivíduos não relacionados apresentarem o mesmo genótipo (I) de $1,29 \times 10^{-6}$ e a probabilidade de exclusão de paternidade (Q), de 99,27%, presume-se que para esta espécie, os 6 locos combinados trazem um ótimo poder de detecção de paternidade múltipla (Tabela 1).

A presença de paternidade múltipla em algumas espécies tem conseqüências importantes no aumento do tamanho efetivo de uma população em relação à paternidade única (Chesser, Baker, 1996; Sugg, Chesser, 1994), principalmente quando se trata de espécies em perigo de extinção. Quanto maior a freqüência de paternidade múltipla, melhor será a condição de manter ou de incrementar a variabilidade genética inter e intrapopulacional (Chesser, Baker, 1996; Sugg, Chesser, 1994).

A maioria dos estudos de comportamento reprodutivo de populações de quelônios foi realizada em espécies marinhas (Bollmer *et al.*, 1999; Crim *et al.*, 2002; FitzSimmons, 1998; Harry, Briscoe, 1988; Hoekert *et al.*, 2002; Ireland *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2006; Kichler *et al.*, 1999; Lee, Hays, 2004; Moore, Ball, 2002; Parker *et al.*, 1996; Zbinden *et al.*, 2007). Existem poucos estudos sobre reprodução de quelônios de água doce. Os trabalhos realizados em quelônios amazônicos, em especial os que dizem respeito ao gênero *Podocnemis*, foram realizados apenas em *P. expansa* e reportam a existência de paternidade múltipla nesta espécie (Pearse *et al.*, 2006; Valenzuela, 2000).

Valenzuela (2000) estudou uma população de *P. expansa* da Colômbia, e através da análise de 8 locos de microsatélites sugeriu a existência de paternidade múltipla nos dois

ninhos estudados. Em seu estudo, Valenzuela (2000) identificou a contribuição de no mínimo 2 pais para um dos ninhos e de 3 pais para o outro ninho.

A frequência de paternidade múltipla encontrada nos ninhos de *P. expansa* nos estudos de Pearse *et al.* (2006) difere da encontrada por Valenzuela (2000). Pearse *et al.* (2006) encontraram paternidade múltipla em apenas 10,3% dos ninhos analisados de uma população do rio Orinoco na Venezuela, em oposição aos 100% encontrados por Valenzuela (2000). Estes resultados demonstram que nesta espécie possa existir diferenças no padrão de paternidade entre diferentes populações. Em seu trabalho Pearse *et al.* (2006) utilizaram 7 locos de microssatélites em 32 ninhos de *P. expansa*, um número amostral bastante maior do que o utilizado por Valenzuela (2000).

Em muitas espécies a poliandria parece ter evoluído para o benefício do sexo masculino, pois as fêmeas geralmente não recebem benefícios diretos ou investem extensos custos (Arnqvist, 1992; Jablonski, Vepsäläinen, 1995; Rowe, 1992; Weigensberg, Fairbairn, 1994). No entanto, ao se acasalar com vários machos, fêmeas podem obter benefícios indiretos que compensam os custos de gastar tempo a procura de um outro parceiro, entre outros (Gosselin *et al.*, 2005; Sakaluk *et al.*, 2006; Thornhill, Alcock, 1983). De um modo geral, a poliandria pode fornecer benefícios genéticos por melhorar a chance de que as fêmeas adquiram bons genes ou reforcem a diversidade genética de seus descendentes (Yasui, 1998). Com a poliandria, fêmeas podem assegurar a viabilidade de seus descendentes copulando sucessivamente com machos de maior viabilidade (Watson, 1991). Para que esta estratégia seja eficaz, fêmeas devem poder avaliar com precisão a qualidade do macho e selecionar fertilizações de certos machos, como por exemplo, através da seleção de esperma (Birkhead, Muller, 1993; Eberhard, 1996). A poliandria pode fornecer bons genes contra a seleção de um macho primário que é geneticamente inferior. Um bom exemplo deste benefício seria quando

fêmeas pudessem escolher a hora de fertilizar seus ovos através da estocagem de bons espermatozóides de suas cópulas ou estações anteriores (Stockley *et al.*, 1993; Tregenza, Wedell, 1998; Watson, 1998; Zeh, 1997). Poliandria também pode fornecer bons genes promovendo competição de espermatozóides. Isto pode ocorrer quando existe uma alta qualidade de machos produzindo espermatozóides competitivamente superiores, produzindo uma prole fertilizada pela seleção dos melhores espermatozóides das cópulas ou promovendo um aumento da taxa de fertilização pelo melhor macho (Yasui, 1998).

Parece claro, portanto, que um dos objetivos a serem buscados na conservação de espécies, é a manutenção do grau de heterozigose e a diminuição da endogamia, principalmente com espécies mantidas em cativeiro para recolonização (Borlase *et al.*, 1993). Quando tratamos de manutenção ou aumento de variabilidade genética de uma população, também estamos falando de populações melhor adaptadas a suportar variações ambientais. Se o ambiente muda ou se, por alguma outra razão, há mudança no fenótipo ótimo, os animais só poderão se adaptar as novas condições se houver variabilidade genética na população. Se o nível de heteroziguidade for bom, pode ser que haja variabilidade genética suficiente para evolução de novas estratégias.

Levando-se em conta a importância do nível de heteroziguidade de uma população, conhecer o tipo de padrão reprodutivo, e o conhecimento da proporção sexual adequada, implica em importantes estratégias de manejo e conservação, especialmente quando determinadas populações possuem um reduzido número de indivíduos, aumentando a probabilidade de endogamia.

Podemos concluir que para a população de *P. sextuberculata* estudada a paternidade múltipla está presente. Este tipo de comportamento reprodutivo pode estar associado a benefícios para esta população em relação à paternidade única, já que na maioria

das espécies que apresentam paternidade múltipla existem evidências do aumento da variabilidade genética da prole, apresentando também uma menor proporção de ovos inférteis (Ligon, Zwartjes, 1995; Stockley *et al.*, 1993; Tregenza, Wedell, 1998; Watson, 1991). Conhecer o tipo de comportamento reprodutivo de uma espécie pode ser de extrema valia, já que o tipo de reprodução pode estar influenciando o perfil genético da população. Através deste estudo perguntas poderão ser respondidas e estratégias de manejo e conservação de populações de *P. sextuberculata* poderão ser auxiliadas pelos resultados aqui apresentados. Novos estudos dirigidos a outras espécies do gênero e a diferentes populações desta espécie, serão bastante úteis para poder elucidar muitos aspectos ainda não descobertos sobre a reprodução dos quelônios aquáticos.

Referências bibliográficas

- Alatalo, R. V., Huglund, J. & Lundberg, A. (1991). Lekking in black grouse: a test of male viability. *Nature*, **352**, 155-156.
- Arnqvist, G. (1992). Precopulatory fighting in a water strider: inter-sexual conflict or mate assessment. *Animal Behaviour*, **43**, 559-567.
- Birkhead, T. & Muller, A. P. (1993). Female control of paternity. *Trends in Ecology and Evolution*, **8**, 100-104.
- Bollmer, J. L., Irwin, M. E., Reider, J. P. & Parker, P. G. (1999). Multiple paternity in loggerhead turtle clutches. *Copeia*, **2**, 475-478.
- Borlase, S. C., Loebel, D. A., Frankham, R., Nurthen, R. K., Briscoe, D. A. & Daggard, G. E. (1993). Modeling problems in conservation genetics using captive *Drosophila* populations- consequences of equalization of family sizes. *Conservation Biology*, **7**, 122-131.
- Bowen, B. W. & Karl, S. A. (1996). Population structure, phylogeography, and molecular evolution. In *The Biology of Sea Turtles*, eds. P. L. Lutz & J. A. Musick, CRC Press. Boca Raton, FL, pp. 29-50.
- Carpenter, C. C. & Ferguson, G. W. (1977). Variation and Evolution of stereotyped behavior in reptiles. In *Biology of the Reptilia*, eds. C. Gans & D. Trinkles, Academic Press. New York, pp. 335-403.
- Chesser, R. K. & Baker, R. J. (1996). Effective sizes and dynamics of uniparentally and diparentally inherited genes. *Genetics*, **144**, 1225-1235.

- Crim, J. L., Spotila, L. D., Spotila, J. R., O'Connor, M., Reina, R., Williams, C. J. & Paladino, F. V. (2002). The leatherback turtle, *Dermochelys coriacea*, exhibits both polyandry and polygyny. *Molecular Ecology*, **11**, 2097-2106.
- Curtis, C. (1998). Genotyping with polymorphic markers reveals multiple paternity in leatherback turtle clutches, Drexel University. Philadelphia, PA, USA.
- DeWoody, J. A., DeWoody, Y. D., Fiumera, A. C. & Avise, J. C. (2000). On the number of reproductives contributing to a half-sib progeny array. *Gen. Res. Camb.*, **75**, 95–105.
- DeWoody, J. A., Schupp, J., Kenefic, L., Busch, J., Murfitt, L. & Keim, P. (2004). Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping. *Biotechniques*, **37**, 348-352.
- Dutton, P. H., Bixby, E. & Davis, S. K. (1998). Tendency towards single paternity in leatherbacks detected with microsatellites. In *18th International Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*, ed. F. A. Abreu-Grobois, NOAA Technical Memorandum. Miami, FL, USA., pp. 39.
- Eberhard, W. G. (1996). *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.
- Ernst, C. H. & Barbour, R. W. (1989). *Turtles of the World*. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- Fantin, C., Carvalho, C. F., Hrbek, T., Sites JR., J. W., Monjeló, L. A. S., Astolfi-Filho, S. & Farias, I. P. (2007). Microsatellite DNA markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle. *Molecular Ecology Notes*, **7**(6), 1235-1238.
- Ferri, V. (2002). *Turtles & Tortoises. 1st ed. ed.* Firefly Books, New York.
- FitzSimmons, N. N. (1998). Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology*, **7**, 575-584.
- Galbraith, D. A. (1991). Studies of mating systems in wood turtles (*Clemmys insculpta*) and snapping turtles (*Chelydra serpentina*) using DNA fingerprinting., Queen's University. Kingston, Canada.
- Galbraith, D. A., White, B. N., Brooks, R. J. & Boag, P. T. (1993). Multiple paternity in clutches of snapping turtles (*Chelydra serpentina*) detected using DNA fingerprints. *Canadian Journal of Zoology*, **71**, 318-324.
- Goodnight, K. F. & Queller, D. C. (1999). Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology*, **8**, 1231-1234.
- Gosselin, T., Sainte-Marie, B. & Bernatchez, L. (2005). Geographic variation of multiple paternity in the American Lobster, *Homarus americanus*. *Molecular Ecology*, **14**, 1517-1525.
- Harry, J. L. & Briscoe, D. A. (1988). Multiple paternity in the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Journal of Heredity*, **79**, 96–99.
- Hoekert, W. E. J., Neufeglise, H., Schouten, A. D. & Menken, S. B. J. (2002). Multiple paternity and female-biased mutation at a microsatellite locus in the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Heredity*, **89**, 107-113.
- IBAMA. (1989). *Projeto Quelônios da Amazônia, 10 anos*. Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília.
- Ireland, J. S., Broderick, A. C., Glen, F., Godley, B. J., Hays, G. C., Lee, P. L. M. & Skibinski, D. O. F. (2003). Multiple paternity assessed using microsatellite markers, in

- green turtles *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) of Ascension Island, South Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **291**, 149-160.
- Iverson, J. B. (1992). *A Revised Checklist with Distribution Maps of the Turtles of the World*. Printed Privately, Richmond, VA.
- Jablonski, P. & Vepsäläinen, K. (1995). Conflict between sexes in the water strider, *Gerris lacustris*: a test of two hypotheses for male guarding behaviour. *Behavioral Ecology*, **6**, 388-392.
- Jensen, M. P., Abreu-Grobois, F. A., Frydenberg, J. & Loeschcke, V. (2006). Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. non-arribada olive ridley sea turtle rookeries. **15**, 2567-2575.
- Kichler, K., Holder, M. T., Davis, S. K., Marquez, M. R. & Owens, D. W. (1999). Detection of multiple paternity in the Kemp's Ridley sea turtle with limited sampling. *Molecular Ecology*, **8**, 819-830.
- Krebs, J. R. & Davies, N. B. (1996). *Introdução à ecologia comportamental*. Atheneu, São Paulo.
- Lee, P. L. M. & Hays, G. C. (2004). Polyandry in a marine turtle: Females make the best of a bad job. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**(17), 6530-6535.
- Ligon, J. D. & Zwartjes, P. W. (1995). Female red junglefowl choose to mate with multiple males. *Animal Behaviour*, **49**, 127-135.
- Moore, M. K. & Ball, R. M. (2002). Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **11**, 281-288.
- Myers, E. M. & Zamudio, K. R. (2004). Multiple paternity in an aggregate breeding amphibian: the effect of reproductive skew on estimates of male reproductive success. *Molecular Ecology*, **13**, 1951-1963.
- Neff, B. D., Repka, J. & Gross, M. R. (2000). Parentage analysis with incomplete sampling of candidate parents and offspring. *Molecular Ecology*, **9**, 515-528.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. & Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, **4**, 347-354.
- Parker, P. G., Waite, T. A. & Peare, T. (1996). Paternity studies in animal populations. In *Molecular Genetic Approaches in Animal Conservation*, eds. T. B. Smith & R. K. Wayne, Oxford University Press. New York, pp. 413-423.
- Pearse, D. E., Dastrup, R. B., Hernandez, O. & Sites Jr, J. W. (2006). Paternity in an Orinoco Population of Endangered Arrau River Turtles, *Podocnemis expansa* (Pleurodira; Podocnemididae), from Venezuela. *Chelonian Conservation and Biology*, **5**(2), 232-238.
- Rieder, J. P. (1996). Mating systems and conservation biology: microsatellite analysis of paternity in leatherback sea turtle clutches, Ohio State University. Columbus, OH, USA.
- Rowe, L. (1992). Convenience polyandry in a water strider: foraging conflicts and female control of copulation frequency and guarding duration. *Animal Behaviour*, **44**, 189-2002.
- Sakaluk, S. K., Rachel, L. & Avery Weddle, C. B. (2006). Cryptic sexual conflict in gift-giving insects: chasing the chase-away. *The American Naturalist*, **167**, 94-104.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, **18**(2), 233-234.
- Sites Jr, J. W., Fitzsimmons, N. N., Silva, N. J. & Cantarelli, V. H. (1999). Conservation genetics of the giant Amazon river turtle (*Podocnemis expansa*; Pelomedusidae) -

- inferences from two classes of molecular markers. *Chelonian Conservation Biology*, **3**(3), 454-463.
- Smith, M. J. H. (1979). Destructive Exploitation of the South American RiverTurtle. *Assoc. Pacif. Coast. Geog. Yearbook*, **36**, 85-102.
- Stockley, P., Searle, J. B., Macdonald, D. W. & Jones, C. S. (1993). Female multiple mating behaviour in the common shrew as a strategy to reduce inbreeding. *Proc. R. Soc. Lond.*, **254**, 173-179.
- Sugg, D. W. & Chesser, R. K. (1994). Effective population sizes with multiple paternity. *Genetics*, **137**, 1147-1155.
- Thornhill, R. & Alcock, J. (1983). *The Evolution of Insect Mating*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Tregenza, T. & Wedell, N. (1998). Benefits of multiple mates in the cricket *Gyllus bimaculatus*. *Evolution*, **52**, 1726-1730.
- Valenzuela, N. (2000). Multiple paternity in side-neck turtles *Podocnemis expansa*: evidence from microsatellite DNA data. *Molecular Ecology*, **9**, 99-105.
- Watson, P. J. (1998). Multi-male mating and female choice increases offspring growth in the spider *Neriene litigiosa* (Linyphiidae). *Animal Behaviour*, **55**, 387-403.
- Watson, P. J. (1991). Multiple paternity as genetic bet-hedging in female sierra dome spiders, *Linyphia litigiosa* (Linyphiidae). *Animal Behaviour*, **41**, 343-360.
- Weigensberg, I. & Fairbairn, D. J. (1994). Conflicts of interest between the sexes: a study of mating interactions in a semiaquatic bug. *Animal Behaviour*, **48**(48), 893-901.
- Weir, B. S. (1996). *Genetic Data Analysis II: Methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Yasui, Y. (1998). The "genetic benefits" of multiple mating reconsidered. *Trends in Ecology and Evolution*, **13**, 246-250.
- Zbinden, J. A., Largiadèr, C. R., Leippert, F., Margaritoulis, D. & Arlettaz, R. (2007). High frequency of multiple paternity in the largest rookery of Mediterranean loggerhead sea turtles. *Molecular Ecology*, **16**(17), 3703-3711.
- Zeh, J. A. (1997). Polyandry and enhanced reproductive success in the harlequin-beetle-riding pseudoscorpion. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **40**, 111-118.

CAPÍTULO IV

Análise de paternidade através de marcadores microssatélites, em ninhos de *Podocnemis erythrocephala* (Testudines, Podocnemididae) de duas localidades da Amazônia brasileira.

Análise de paternidade através de marcadores microssatélites, em ninhos de *Podocnemis erythrocephala* (Testudines, Podocnemididae) de duas localidades da Amazônia brasileira.

Fantin, C.; Farias, I.P.; Monjeló, L.A.S.; & T. Hrbek

Instituto de Ciências Biológicas, Univ. Federal do Amazonas, Brasil, Manaus.

Resumo

Pouco se conhece a respeito do sistema reprodutivo entre as espécies do gênero *Podocnemis*, principalmente em relação às irapucas (*Podocnemis erythrocephala*). Usando a análise de paternidade, através de dados obtidos a partir de 4 locos de marcadores de microssatélites em 6 ninhos de duas localidades da Amazônia brasileira, identificamos a existência de paternidade múltipla nesta espécie. A quantidade de filhotes analisados representou o número total de filhotes nascidos em cada ninho. Os genótipos dos filhotes de cada ninho foram identificados, e apesar de não possuímos amostras das fêmeas, os alelos maternos foram inferidos analisando-se os filhotes homozigotos de cada ninho, para cada loco. Para a análise do tipo de paternidade utilizamos o método de contagem de alelos presentes em cada loco/ninho. Esta espécie mostrou-se promíscua, evidenciando paternidade múltipla em 83.3% dos ninhos analisados. Apesar de o número amostral ser baixo, encontramos paternidade única em apenas um ninho de uma das localidades estudadas, portanto, é possível que exista diferença no padrão do tipo de paternidade entre populações desta espécie.

Introdução

Podocnemis erythrocephala é facilmente distinguida de suas congêneres devido ao seu pequeno porte, cujo tamanho é inferior a 32 cm. Geralmente as fêmeas são maiores que os machos, medindo em torno de 27 cm. A coloração vai de marrom-escuro a preto, a carapaça é expandida na porção posterior; apresenta um par de barbelos embaixo do queixo, e uma faixa vermelha brilhante que se estende da parte de trás da cabeça até os tímpanos (Mittermeier, Wilson, 1974b; Pritchard, Trebbau, 1984).

Vários autores, incluindo Williams (1954b) e Wermuth e Mertens (1961a), citam que *P. erythrocephala* ocupa uma grande área ao norte da América do Sul. Contudo, Mittermeier e Wilson (1974b) relatam que as amostras com informações de procedência seguras foram todas coletadas no sistema do rio Negro. A espécie é quase completamente confinada a rios de água preta, e a maioria dos exemplares conhecidos é proveniente do rio Negro. Dentro do sistema do rio Negro, a espécie mostra preferência por pequenos lagos de água preta e seus afluentes, sendo raramente encontrada no leito principal do rio (Mittermeier, Wilson, 1974b).

A estação de desova dos podocnemidídeos segue o regime de vazante dos rios (Alfinito, 1980; Alho, Pádua, 1982). Geralmente, entre os meses de julho e agosto a precipitação diminui, marcando o início da estação seca na região amazônica. A diminuição do nível das águas fluviais revela praias arenosas intrafluviais e nas margens de igarapés, ilhas e rios; a planície de inundação vai se expondo e os igarapés vão descobrindo raízes e troncos mortos e morrotes formados pelo acúmulo de folhas e sedimentos. Esses lugares são utilizados pelos quelônios em questão como sítio de desova (Alho, Pádua, 1982). O solo da

planície inundável geralmente é utilizado por *Podocnemis erythrocephala* para a nidificação (Mittermeier, Wilson, 1974b; Pritchard, Trebbau, 1984; Vogt, 1994). Esta espécie coloca seus ovos no período que vai do final do mês de agosto até início de novembro nas praias do Rio Negro, sendo que o pico da estação de postura aparentemente ocorre entre setembro e outubro. O número de ovos varia de 5 a 14, e a postura ocorre geralmente à noite na areia em áreas chamadas de campinas (Mittermeier, Wilson, 1974b). Os ovos são alongados podendo apresentar a casca dura ou levemente flexível. Apesar desta espécie não ser a mais importante na economia, é extensivamente caçada no rio Negro, por sua carne e seus ovos (Vogt, 2001).

Fantin *et al.* (2007), construíram uma biblioteca genômica para *Podocnemis unifilis* otimizando as condições para 18 locos de microssatélites para esta espécie. Por serem altamente polimórficos e principalmente co-dominantes, estes marcadores tornaram-se especiais para estudos em nível populacional, individual, bem como para a análise de parentesco entre algumas espécies de quelônios. Dentre os 18 locos desenvolvidos para *P. unifilis*, vários locos mostraram-se polimórficos no teste de transferibilidade em outras 5 espécies da família Podocnemididae, sendo 4 espécies do gênero *Podocnemis* (*P. expansa*, *P. sextuberculata*, *P. erythrocephala* e *P. volgi*) além de *Peltocephalus dumerilianus*.

Os estudos sobre biologia reprodutiva, incluindo o tipo de paternidade, além de serem importantes para analisar fatores evolutivos e genéticos, fornecem informações que subsidiam os projetos de manejo de quelônios (Andrade, 2004). Entretanto, no geral são tão escassos os estudos reprodutivos destes animais, que em todas as recomendações sobre biodiversidade e planos de manejo de vida silvestre estão incluídas recomendações para a realização de pesquisas sobre o tema (Brasil, 1998; Capobianco *et al.*, 2002). Sendo assim, considerando a total ausência de dados de tipo de paternidade em *P. erythrocephala*, e com o intuito de contribuir com o conhecimento sobre o padrão de seu sistema reprodutivo, este

trabalho teve como principal objetivo identificar a relação de parentesco entre os indivíduos de cada ninho de irapuca, através de marcadores moleculares de microssatélites.

Material e métodos

Utilizamos 6 ninhos de *P. erythrocephala* de 2 locais da Amazônia brasileira, para o estudo da paternidade. Destes ninhos, 4 foram coletados no município de Santa Isabel do rio Negro-AM (S4°31'55,6''/W64°55'11,5'') (Ninho 1, 2, 3 e 4), e 2 em Parintins-AM (S2°46'30''/W56°46'17'') (Ninho 5 e 6) (Fig. 1). A amostragem dos 2 ninhos provenientes de Parintins foi realizada com o apoio do Projeto Pé-de-Pincha (UFAM), onde os ninhos permaneceram cercados até o momento da eclosão. Após a eclosão, as amostras de sangue foram retiradas e em seguida os animais foram devolvidos para a natureza no local onde foram coletados. Os 4 ninhos coletados em Santa Isabel do rio Negro-AM estavam cercados até o momento da eclosão e foram transportados para Manaus onde as amostras de sangue foram coletadas. A quantidade de filhotes amostrados representou o número total de filhotes nascidos de cada ninho (N1=7, N2=6, N3=5, N4=8, N5=6, N6=5). As amostras de sangue dos 37 filhotes recém eclodidos foram coletadas através de punção da veia femural utilizando seringa de 1mL e posteriormente armazenados em tubos eppendorfs com 500 µl de etanol absoluto. O procedimento utilizado para extração do DNA foi através do Kit GFX (GE-Healthcare).

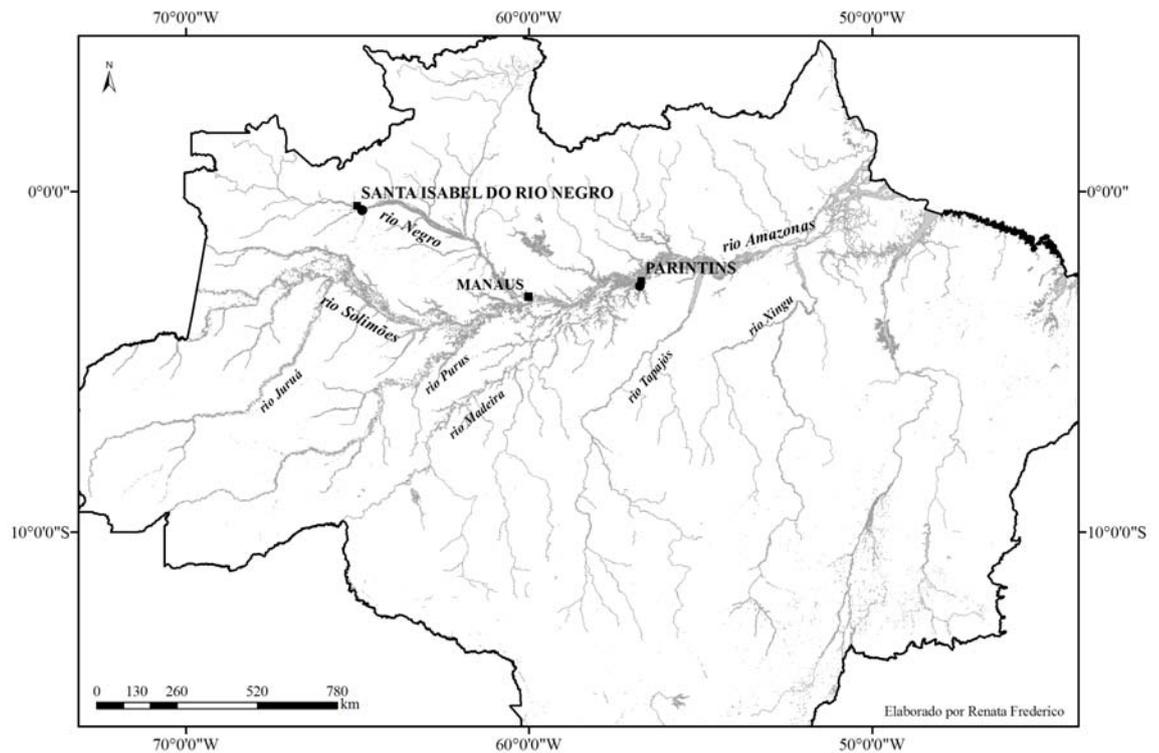


Figura 1. Mapa mostrando os 2 locais de coleta dos ninhos de *P. erythrocephala*.

O DNA genômico de cada indivíduo foi amplificado via PCR utilizando-se a técnica de Schuelke (2000). Esta técnica consiste na inserção de uma sequência, denominada de M13, ao *primer forward* e marcando-se somente o *primer* do M13 com a fluorescência desejada. Todos os *primers forward* foram marcados com fluorescências do tipo FAM -6. As condições de termociclagem foram ajustadas para um volume total de 10 μ L, contendo 3,7 μ L of H₂O, 1,0 μ L of 10x Buffer com (NH₄)₂ SO₄ (Fermentas), 1,5 μ L of MgCl₂ (25mM), 1,0 μ L of reverse primer (0,2 μ M), 0,5 μ L de forward primer (0,2 μ M), 0,5 μ L de FAM -6 labeled M13 label primer (0,2 μ M), 1,5 μ L de dNTP mix (0,2 mM cada dNTP), 0,3 μ L de LGC Biotecnologia Taq DNA Polymerase (1U/ μ L), e 1 μ L of DNA (10 ng). Após a reação, a eficiência da amplificação foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1%. Dos

4 primers de *locos* de microssatélites utilizados na reação de PCR, 2 foram desenvolvidos por Fantin *et al.* (2007) (Puni_1D9 e Puni_1E1), e 2 por Valenzuela (2000) (Pe344 e Pe519) (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos 4 microssatélites utilizados na genotipagem de *P. erythrocephala*, Ho= Heterozigozidade observada, He= Heterozigozidade esperada, Q= Probabilidade de exclusão de paternidade, I= Probabilidade de identidade.

Loco	Repetição	T°C	N° de indivíduos/ alelos	Ho	He	Q	I	Referências
Puni_1D9	(GA) ₁₂	62	36/3	0,38889	0,63459	0,3391	0,2451	Fantin <i>et al.</i> 2007
Puni_1E1	(CT) ₉ tt(CT) ₇	64	35/7	0,57143	0,79876	0,5966	0,0793	Fantin <i>et al.</i> 2007
PE344	(AG) ₁₃	55	37/6	0,72973	0,75639	0,5268	0,1136	Valenzuela, 2000
PE519	(CT) ₇ (CA) ₈ (CG) ₂ (CA) ₈	55	33/10	0,69697	0,78275	0,6099	0,0724	Valenzuela, 2000
Total				0,59675	0,74312	QC=0,9507	IC=1,59x10 ⁻⁴	

Os produtos de PCR foram diluídos na proporção de 1:100 e adicionado o marcador de tamanho ROX pUC-19 (79, 90, 105, 131, 151, 182, 201, 254, 306, 337, 362, 425, 486, 509 e 550) modificado de DeWoody *et al.* (2004). As genotipagens foram realizadas no seqüenciador automático de DNA ABI 3730xl, e a análise dos alelos observados para cada loco, foi feita usando o programa GeneMapper v.4.0.

Para estimar a paternidade múltipla, o método utilizado foi o de simples contagem de alelos (Myers, Zamudio, 2004), que consiste na contagem dos alelos representados dentro de cada ninho. Este método atribui paternidade múltipla dentro de um ninho usando testes padrões da distribuição alélica na prole, e consideramos a presença de cinco alelos por loco entre os filhotes, indicativo de paternidade múltipla, assumindo-se que não conhecemos nenhum alelo materno. Um outro método usado para se estabelecer paternidade múltipla foi a inferência dos genótipos maternos. Os alelos maternos foram identificados através da

presença de filhotes homocigotos para cada loco dentro de um ninho. Quando um alelo materno pode ser inferido, estima-se paternidade múltipla para um ninho, quando a análise de um loco indicar a presença de 4 alelos; e se os dois alelos maternos puderam ser detectados, a presença de 3 alelos no loco analisado indica paternidade múltipla no ninho.

O coeficiente de relacionamento (r) entre pares de indivíduos, foi obtido através do Programa KINSHIP 1.3 (Goodnight, Queller, 1999). Para calcular os valores de (r), assumi-se que não existe desequilíbrio de ligação, endocruzamento e taxas de mutação. O programa estima dois valores de verossimilhança para cada par de indivíduos dentro da agregação para duas hipóteses, a primeira hipótese considera algum nível de relacionamento, e a hipótese nula considera que não existe nenhum tipo de relacionamento, como é observado na tabela 2, onde os valores de P_{xm} , P_{ym} , P_{xp} e P_{yp} são as frequências alélicas da população, e X e Y são os indivíduos testados. O programa calcula as probabilidades de relacionamento comparando as duas hipóteses para todos os pares possíveis dentro do banco de dados. Desta forma, é calculada uma taxa para os pares de indivíduos que resulta em uma matriz simétrica dos valores de relacionamento entre eles. Assume-se que para valores de r (coeficiente de relacionamento) em torno de 0,12, os indivíduos são considerados primos; 0,25, meio irmãos (*half-sib*) e 0,50 ou maior que 0,50, irmãos verdadeiros (*full-sib*). A partir destes valores de relacionamento, gerados em uma matriz simétrica, foi construído um gráfico para melhor visualizar o grau de parentesco entre os indivíduos de um mesmo ninho.

Tabela 2 – Fórmulas utilizadas para o cálculo da verossimilhança entre os pares de indivíduos analisados, onde X e Y são os indivíduos testados que podem ter alelos de origem materna (X_m e Y_m) ou paterna (X_p e Y_p), os valores de P_{xm} , P_{ym} , P_{xp} e P_{yp} são as frequências alélicas da população, e R indica a hipótese de relacionamento que pode ser tanto materna (R_m) quanto paterna (R_p).

	$X_p = Y_p$	$X_p \neq Y_p$
$X_m = Y_m$	$P_{xm}(R_m + (1 - R_m)P_{xm}) \times P_{xp}(R_p + (1 - R_p)P_{xp})$	$P_{xm}(R_m + (1 - R_m)P_{xm}) \times P_{xp}(1 - R_p)P_{yp}$

$$X_m \neq Y_m \quad P_{xm}(1 - R_m)P_{ym} \times P_{xp}(R_p + (1 - R_p)P_{xp}) \quad P_{xm}(1 - R_m)P_{ym} \times P_{xp}(1 - R_p)P_{yp}$$

Para o cálculo da probabilidade de exclusão de paternidade (Q), utilizou-se o método descrito por Weir (1996). A probabilidade de exclusão de paternidade é o parâmetro que se baseia na exclusão de vários machos, envolvidos no acasalamento, mais que podem ser estatisticamente distinguidos. Através deste parâmetro não se descobre quem é o pai mais provável, mas torna-se possível à exclusão de prováveis pais escolhidos ao acaso na população estudada. Valores de exclusão de paternidade mais próximos de 1 fornecem uma maior confiabilidade de se excluir corretamente um indivíduo da paternidade em questão. Com base nas frequências alélicas dos 4 locos de microssatélites, foi calculada a probabilidade de identidade genética (I) por loco e combinada segundo Paetkau *et al.* (1995). A probabilidade de identidade genética é um parâmetro que demonstra o poder de discriminação dos locos de microssatélites nas amostras analisadas. Quanto mais baixos os valores de identidade genética, maior será o potencial de discriminação dos microssatélites utilizados (Selvin, 1980; Slate *et al.*, 2000).

Resultados

Dos 6 ninhos de *P. erythrocephala* analisados, apenas 1 não apresentou paternidade múltipla (Ninho 6). Nossas análises, através da contagem de alelos e da inferência dos genótipos maternos, evidenciaram um mínimo de dois machos contribuindo nos ninhos onde existe paternidade múltipla.

A frequência do número de alelos por loco está evidenciada na Tabela 3, onde podemos verificar que o número mínimo observado de alelos/loco foi 1 (Ninho 6) e o número máximo de 6 (Ninho 4).

Tabela 3. Quantidade de alelos maternos inferidos/ número de alelos encontrados para cada loco nos ninhos de *P. erythrocephala*. Resultados em negrito indicam a presença de paternidade múltipla.

Locos	N1	N2	N3	N4	N5	N6
Puni_1D9	2/2	2/3	1/3	1/3	1/2	1/2
Puni_1E1	2/4	2/3	1/5	0/4	1/3	0/1
PE344	0/3	0/4	0/3	1/4	0/3	2/2
PE519	1/4	2/4	1/2	1/6	1/4	0/3

Para o ninho 4, a análise do loco PE519, mostrou a distribuição de 6 alelos entre os filhotes desta prole. Através do simples método de contagem de alelos, sem a inferência dos alelos maternos, a presença destes 6 alelos, já é indicativo da contribuição de mais de um macho na prole. A análise do loco Puni_1E1, no Ninho 3, também evidenciou através do simples método de contagem, a contribuição de machos extras na prole, inferida através da presença de 5 alelos nos filhotes deste ninho.

Quando analisamos cada loco separadamente, para alguns ninhos foi possível identificar os dois alelos maternos, enquanto, para vários locos apenas um dos alelos pôde ser inferido (Tabela 3). Através do simples método de contagem de alelos só identificamos paternidade múltipla em dois ninhos (Ninho 3 e 4). No entanto, quando identificamos os alelos dos genótipos parentais, através da presença dos filhotes homocigotos na prole, verificamos que os ninhos 1, 2, e 5 também apresentaram machos extras contribuindo na prole.

Para os 4 locos de microssatélites utilizados, a probabilidade de dois indivíduos não relacionados apresentarem o mesmo genótipo (probabilidade de identidade) foi de $1,59 \times 10^{-4}$. A probabilidade de exclusão de paternidade (Q) com um único loco variou de 33.91% (Puni_1D9) a 60.99% (PE519) e quando todos os locos foram combinados de 95.07%, evidenciando um bom poder de detectar paternidade múltipla para esta espécie.

Quando analisados através do Programa KINSHIP, quase todos os ninhos de *P. erythrocephala* apresentam distribuição dos padrões de relacionamentos similares (Figura 2). A maioria dos ninhos (com exceção do ninho 6) apresentaram valores de r (coeficiente de relacionamento) abaixo de 0,5, indicando a presença de outras categorias de relacionamento entre os filhotes, evidenciando a existência de contribuição de mais de um macho na prole.

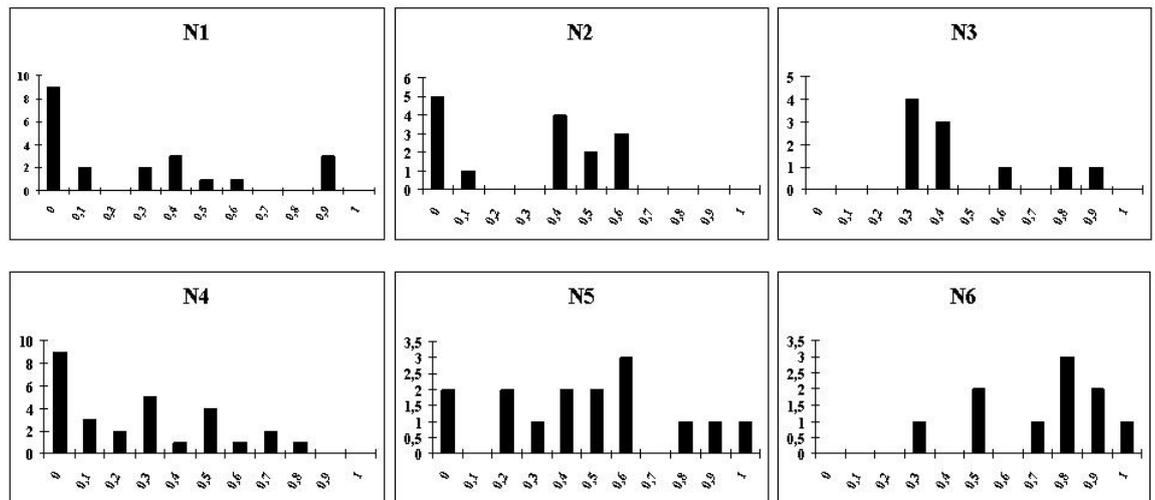


Figura 2. Gráficos da relação de parentesco entre os filhotes de *P. erythrocephala*, para cada ninho analisado. Onde x indica valores de coeficiente relacionamento e y frequência. Assume-se que para valores de R (coeficiente de relacionamento) em torno de 0,12, os indivíduos são considerados primos; 0,25, meio irmãos (*half-sib*) e 0,50 ou maior que 0,50, irmãos verdadeiros (*full-sib*).

Discussão

Apesar da quantidade de locos de microssatélites utilizada ser pequena, a combinação dos locos evidenciou um bom poder de detecção do tipo de paternidade para *P. erythrocephala*. As análises realizadas com os 4 locos encontraram uma probabilidade de identidade (I) de $1,59 \times 10^{-4}$ e probabilidade de exclusão de paternidade (Q) de 95.07% (Tabela 1). Pearse *et al.* (2006) em estudos de paternidade em *P. expansa*, indicaram que a probabilidade de exclusão de paternidade de 95% tem suficiente poder para detectar machos adicionais contribuindo na prole de um ninho. Assumindo maternidade única da prole e herança mendeliana dos alelos entre uma ninhada, atribuímos paternidade múltipla para *P. erythrocephala*, baseado na reconstrução do número mínimo de genótipos paternos.

Como toda progênie herda um alelo materno e um paterno, cada membro da ninhada deve conseqüentemente herdar um dos dois alelos maternos e um de um pool de alelos paternal, dependendo do número de pais contribuindo na prole. Os alelos maternos podem ser identificados por sua freqüência mais elevada, pela presença de um dos dois alelos em cada membro do ninho ou através da presença de filhotes homozigotos para cada loco dentro de um ninho. Os alelos maternos dos ninhos de *P. erythrocephala* foram identificados através da presença de filhotes homozigotos para cada loco dentro de um ninho (Tabela 3). Após a inferência dos alelos maternos, foi possível identificar paternidade múltipla nos ninhos 1, 2, 3, 4 e 5. Se só tivéssemos utilizado o método de simples contagem de alelos, sem a inferência do genótipo materno, só poderíamos ter identificado paternidade múltipla nos ninhos 3 e 4. No entanto, mesmo quando identificamos os alelos dos genótipos parentais, o ninho 6 foi o único que continuou evidenciando a paternidade única.

A existência de paternidade múltipla entre os ninhos de *P. erythrocephala*, também é suportada quando visualizamos o resultado dos gráficos gerados através dos valores de coeficiente de relacionamento entre os filhotes (Figura 2). Quando analisamos as categorias de relacionamento, verificamos que todos os ninhos apresentam valores de r abaixo de 0,5, com exceção do ninho 6 que apresenta uma frequência muito baixa deste valor. Como consideramos os valores do coeficiente de relacionamento como a fração de alelos que são partilhados entre os descendentes, assume-se que para valores de r menores que 0,50 o grau de parentesco entre os indivíduos de um mesmo ninho fica menor sustentando a hipótese da contribuição de pais extras na prole.

Nos ninhos de *P. erythrocephala* indicativos de paternidade múltipla pode-se inferir uma quantidade mínima de 2 machos contribuintes na prole. Devemos lembrar que o método de contagem de alelos não consegue estimar a quantidade de pais contribuindo na prole, ele nos fornece apenas uma estimativa da quantidade mínima de machos que contribuem geneticamente na progênie. O método não faz distinção de pais múltiplos que possuem alelos em comum, logo podemos estar excluindo um pai contribuinte na prole, pelo compartilhamento de alelos entre machos, embora usar números suficientes de locos altamente polimórficos deve permitir que todas as incertezas sejam resolvidas.

Um dado interessante que devemos abordar é o fato de não termos encontrado nenhum ninho com paternidade única nas amostras de Santa Isabel do rio Negro, e apenas 1 ninho com este padrão em Parintins. Seria interessante obter uma maior quantidade de ninhos de várias localidades, para chegarmos a uma conclusão se existe ou não diferença no padrão reprodutivo entre as populações. Entretanto não devemos esperar que todos os indivíduos de uma espécie se comportem exatamente da mesma maneira. Dois parâmetros são importantes no contexto da seleção sexual. O primeiro é a competição entre os indivíduos do mesmo sexo,

denominada de seleção intra-sexual; o segundo é a seletividade das fêmeas ou dos machos pelo sexo oposto, denominado inter-sexual (Krebs, Davis, 1993). O repertório comportamental associado à reprodução é determinado por fatores físicos e biológicos, como por exemplo, dimorfismo sexual para idade e tamanho onde poderá existir uma forte seleção sexual entre os sexos. As densidades populacionais podem também alterar as taxas de contato intersexual e conseqüentemente o padrão reprodutivo (Westneat, Sherman, 1997). Quando a densidade e a persistência dos machos aumentam, a resistência da fêmea pode tornar-se mais difícil (Krebs, Davies, 1996).

Dentre os trabalhos existentes sobre paternidade no gênero *Podocnemis*, Valenzuela (2000) e Pearse *et al.* (2006), utilizando locos de marcadores microssatélites, relataram a existência de paternidade múltipla em ninhos de *Podocnemis expansa*. Pearse *et al.* (2006) encontraram paternidade múltipla em apenas 10,3% dos ninhos analisados, contrastando com os 100% apresentados por Valenzuela (2000). Em seu trabalho Pearse *et al.* (2006), discutem a importância de se documentar padrões de paternidade em diferentes populações de uma dada espécie, bem como considerar os efeitos das diferenças ecológicas entre populações sobre o comportamento de acasalamento das fêmeas.

Pouco é conhecido sobre o sistema de acoplamento de *Podocnemis erythrocephala*. Ferrara (2007), estudou o comportamento reprodutivo de *P. erythrocephala* em cativeiro, por meio de observações dos comportamentos de corte e cópula, seleção sexual para tamanho da carapaça e da cabeça, coloração cefálica, e influência da temperatura da água nos movimentos de corte. Segundo Ferrara (com. pessoal), os dados comportamentais e observacionais demonstraram que as fêmeas copulam freqüentemente com diferentes machos, entretanto, a possível ocorrência de paternidade múltipla, nunca foi investigada até o momento.

Investigar os efeitos benéficos da paternidade múltipla, incluindo benefícios para a prole pode ser muito difícil de demonstrar, mas tem sido constatado em diversos grupos (Evans, Magurran, 2000; Kraaijeveld-Smit *et al.*, 2002; Olsson *et al.*, 1996).

A diminuição do tamanho efetivo da população é um dos principais responsáveis pela perda da variabilidade genética em populações ameaçadas de extinção. O tamanho efetivo de população, além de considerar o número de indivíduos participantes na produção da próxima geração, está influenciado por outras características referentes a aspectos da ecologia reprodutiva, tais como, o número de machos que fecundam uma fêmea, a proporção sexual, etc. Esta relação tem implicações importantes para o manejo de populações vulneráveis ou ameaçadas. Deste modo, a presença de paternidade múltipla também tem importantes conseqüências no aumento do tamanho efetivo de uma população em relação à paternidade única (Chesser, Baker, 1996; Sugg, Chesser, 1994), principalmente quando estamos tratando de espécies vulneráveis. Quanto maior a frequência de paternidade múltipla, melhor será a condição de manter ou de incrementar a variabilidade genética inter e intra-populações (Chesser, Baker, 1996; Sugg, Chesser, 1994).

Este trabalho evidencia a existência de paternidade múltipla em *P. erythrocephala*. No entanto, nossos dados sugerem uma possível diferença entre o padrão reprodutivo de diferentes populações. Seria interessante em trabalhos futuros, comparar ninhos de diferentes localidades para verificar se existe diferença no padrão reprodutivo entre populações desta espécie, podendo assim organizar programas de manejo adequados para as diferentes localidades. Apresentamos aqui resultados de métodos biotecnológicos, contribuindo para elucidar a biologia e comportamento reprodutivo em *P. erythrocephala*. Esses estudos fornecem informações imprescindíveis para estimar a contribuição relativa dos pares,

envolvidos no acasalamento, e considerá-la como uma estratégia reprodutiva natural para a conservação da diversidade genética dessa espécie.

Referências Bibliográficas

- Alfinito, J. (1980). *A tartaruga verdadeira do Amazonas – sua criação*. FCAP Informe técnico.
- Alho, C. J. R. & Pádua, L. F. M. (1982). Sincronia entre o regime de vazante do rio e o comportamento de nidificação da tartaruga da Amazônia *Podocnemis expansa* (Testudinata – Pelomedusidae). *Acta Amazônica*, **12**(2), 323-326.
- Andrade, P. C. M. (2004). *Criação e Manejo de Quelônios no Amazonas (Projeto Diagnóstico da criação de animais silvestres no estado do Amazonas)*, Manaus.
- Brasil. (1998). *Relatório nacional para a convenção sobre a diversidade biológica*. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, Brasília, DF.
- Capobianco, J. P. R., Veríssimo, A., Moreira, A., Sawyer, D., Santos, I. & Pinto, L. P. (2002). *Biodiversidade brasileira*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, D.F.
- Chesser, R. K. & Baker, R. J. (1996). Effective sizes and dynamics of uniparentally and diparentally inherited genes. *Genetics*, **144**, 1225-1235.
- Evans, J. P. & Magurran, A. E. (2000). Multiple benefits of multiple mating in guppies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 10074–10076.
- Fantin, C., Carvalho, C. F., Hrbek, T., Sites JR., J. W., Monjeló, L. A. S., Astolfi-Filho, S. & Farias, I. P. (2007). Microsatellite DNA markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle. *Molecular Ecology Notes*, **7**(6), 1235-1238.
- Ferrara, C. R. (2007). Comportamento reprodutivo de *Podocnemis erythrocephala* (Spix 1824) (Testudines, Podocnemididae) em cativeiro, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA/UFAM. Manaus, pp. 56.
- Goodnight, K. F. & Queller, D. C. (1999). Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology*, **8**, 1231-1234.
- Kraaijeveld-Smit, F. J. L., Ward, S. J., Temple-Smith, P. D. & Paetkau, D. (2002). Factors influencing paternity success in *Antechinus agilis*: last-male sperm precedence, timing of mating and genetic compatibility. *Journal of Evolutionary Biology*, **15**, 100-107.
- Krebs, J. R. & Davies, N. B. (1996). *Introdução à ecologia comportamental*. Atheneu, São Paulo.
- Krebs, J. R. & Davis, N. B. (1993). *An Introduction to behavioral ecology*. Blackwell Science Press, Cambridge.
- Mittermeier, R. A. & Wilson, R. A. (1974). Redescription of *Podocnemis erythrocephala* (Spix, 1824), an amazonian pelomedusid turtle. *Papéis Avulsos Zool.*, **28**(8), 147-162.

- Myers, E. M. & Zamudio, K. R. (2004). Multiple paternity in an aggregate breeding amphibian: the effect of reproductive skew on estimates of male reproductive success. *Molecular Ecology*, **13**, 1951-1963.
- Olsson, M., Shine, R., Madsen, T., Gullberg, A. & Tegelström, H. (1996). Sperm selection by females. *Nature*, **383**, 585.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. & Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, **4**, 347-354.
- Pearse, D. E., Dastrup, R. B., Hernandez, O. & Sites Jr, J. W. (2006). Paternity in an Orinoco Population of Endangered Arrau River Turtles, *Podocnemis expansa* (Pleurodira; Podocnemididae), from Venezuela. *Chelonian Conservation and Biology*, **5**(2), 232-238.
- Pritchard, P. C. H. & Trebbau, P. (1984). *The Turtles of Venezuela*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ann Arbor, MI.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, **18**(2), 233-234.
- Selvin, S. (1980). Probability of nonpaternity determined by multiple allele codominant systems. *American Journal of Human Genetics*, **32**, 276-278.
- Slate, J., Marshall, T. & Pemberton, J. (2000). A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Molecular Ecology*, **9**, 801-808.
- Sugg, D. W. & Chesser, R. K. (1994). Effective population sizes with multiple paternity. *Genetics*, **137**, 1147-1155.
- Valenzuela, N. (2000). Multiple paternity in side-neck turtles *Podocnemis expansa*: evidence from microsatellite DNA data. *Molecular Ecology*, **9**, 99-105.
- Vogt, R. C. (1994). Temperature controlled sex determination as a tool for turtle conservation. *Chelonian Conservation and Biology*, **4**(2), 159-162.
- Vogt, R. C. (2001). Turtles of the Rio Negro. In *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazônia, Brazil - Projeto Piaba*, ed. N. L. Chao, Editora da Universidade do Amazonas. Manaus, pp. 245-262.
- Weir, B. S. (1996). *Genetic Data Analysis II: Methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Wermuth, H. & Mertens, R. (1961). *Schildkröten - Krokodile - Brückenechsen*. Jena: Gustav Fischer Verlag.
- Westneat, D. F. & Sherman, P. W. (1997). Density and extra-pair fertilizations in birds: a comparative analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **41**, 205-215.
- Williams, E. E. (1954). A key and description of the living species of the genus *Podocnemis* (sensu Boulenger). 111 (8): 279-295. *Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard*, **111**(8), 279-295.