

ESTUDO DE TIPO DE PATERNIDADE EM NINHOS DE *Podocnemis expansa* UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

Thais da Silva DAMASSEN¹; Cleiton FANTIN²; Richard Carl VOGT³

¹Bolsista PAIC/FAPEAM-INPA; ²Colaborador MBT/UEA; ³Orientador CBIO/INPA

1. Introdução

A tartaruga da Amazônia, *P. expansa*, é a mais conhecida espécie do gênero *Podocnemis* na Amazônia e é largamente distribuída nas bacias Amazônica, do rio Orinoco e do rio Essequibo (Iverson 1992; Pritchard, Trebbau 1984). A *P. expansa* é uma espécie com altíssimo potencial para exploração zootecnológica, particularmente por seu porte, sua alta prolificidade, rusticidade e pelo alto valor econômico que agrega sua carne e seus subprodutos (Malvasio 2001). Durante anos tem sido intensamente explorada para comércio e consumo humano. Como consequência dessas atividades sem controle, ela quase desapareceu dos grandes rios (Smith 1979). Atualmente está classificada como dependente de conservação para que não entre em risco de extinção (IUCN 2012). 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 e Pádua 1982). O uso de informações a respeito dos aspectos básicos da biologia dos quelônios é uma parte crucial dos esforços de manutenção das populações existentes e do restabelecimento de populações em declínio (Pough *et al.* 2008). Em adição aos dados ecológicos, são necessárias informações sobre a estrutura e variabilidade genética para dar suporte aos programas de manejo para a conservação dessas espécies. 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). O desenvolvimento de técnicas moleculares utilizando o DNA possibilitou o estudo do material genético e, consequentemente, uma avaliação mais segura do grau de variabilidade genética (Fairbanks *et al.* 1993). Dentre as diversas técnicas moleculares disponíveis, encontram-se os marcadores moleculares baseados em DNA microssatélites, muito utilizados para responder questões de parentesco, como a determinação do tipo de paternidade em um grande número de taxa e espécies (Fantin 2008). A utilização de marcadores moleculares, aliada ao manejo reprodutivo adequado, pode contribuir para a redução da endogamia em programas de melhoramento genético (Bentsen e Olesen 2002). O presente estudo tem como objetivo investigar o sistema de acasalamento de *P. expansa*, utilizando filhotes recém-eclodidos provenientes de Trombetas - PA. Este estudo intenciona contribuir para trabalhos a respeito do sistema reprodutivo através da determinação do tipo de paternidade que ocorre em *P. expansa* que aliados aos dados de ecologia, fisiologia, nutrição e reprodução permitirão a elaboração de: manejo, conservação e de criação em cativeiro.

2. Material e Métodos

1. Coleta do material: Foram estudadas amostras sanguíneas de *P. expansa* de indivíduos recém eclodidos de dois ninhos, provenientes da praia de Jacaú, rio Trombetas-PA. O método utilizado para a coleta de sangue foi através da punção da veia femoral utilizando seringa de 1mL, coletando até 100 µl de sangue e armazenando-os em microtubos tipo eppendorfs contendo 500 µl de etanol absoluto, e armazenados a 4°C.

2. Extração de DNA: A extração de DNA foi realizada pelo método CTAB (Doyle e Doyle 1987), com algumas modificações. A eficácia da extração e a concentração do DNA foram verificadas através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1%. Após o término da corrida, o gel foi corado com Gel Red e observado em transluminador de luz ultravioleta VDS.

3. Amplificação in vitro via PCR: O DNA extraído foi submetido à Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) seguindo o protocolo econômico descrito por Schuelke (2000), onde se adiciona a cauda M13 a um dos primers e marca-se somente o primer M13 com a fluorescência desejada, neste caso, TET. O produto amplificado foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para que a eficiência da reação fosse constatada. Após o término da corrida, o gel foi corado GelRed e observado em um transluminador de luz ultravioleta VDS. Utilizou-se cinco locos de microssatélites descritos por Valenzuela (2000): PE344, PE519 e PE1075 e Fantin *et al.* (2007): Puni_1D12, Puni_1E1, para as análises.

4. Reação de Genotipagem: Os produtos de PCR foram diluídos na proporção de 1:00 e adicionando o marcador de tamanho ROX pUC-19 modificado de DeWoody *et al.* (2004). As genotipagens foram realizadas no seqüenciador automático de DNA ABI 3130xl.

5. Análise Genotípica: A análise dos alelos observados para cada loco, foi feita utilizando o programa GeneMarker v.2.2.0, a fim de identificar o genótipo de cada loco para os indivíduos amostrados.

6. Paternidade Múltipla: Usou-se o método mínimo de contagens de alelos (Myers e Zamudio 2004), que pressupõe uma distribuição Mendeliana dos alelos na progênie, considera-se a presença de 5 cinco alelos por loco amostrado entre os filhotes de cada ninho. Utilizou-se também a análise de paternidade baseada na inferência dos genótipos maternos, os quais são identificados pela presença de filhotes homocigotos por loco dentro de um ninho indica paternidade múltipla.

3. Resultados e Discussão

Até o presente momento foi extraído o DNA de todas as 60 amostras de sangue de *Podocnemis expansa* (Tabela 1).

Tabela 1: Resultado das extrações realizadas nos 2 ninhos (N=60). ✓= todas as extrações deram certo

Ninhos	Nº de filhotes em cada ninho
Ninho 7	30
Ninho 9	30

A eficácia da extração e a concentração do DNA foram verificadas através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1%. Neste procedimento, foi utilizados 1µL do DNA extraído juntamente com 2µL de gel red. Após o término da corrida, o gel foi observado em transluminador de luz ultravioleta VDS. (Figura1).

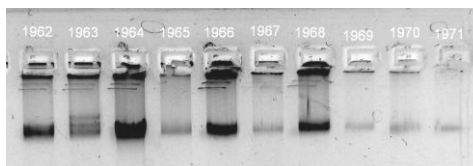


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% da extração de DNA de *Podocnemis expansa* das amostras do Ninho 9.

Foi realizada a Amplificação *in vitro* via PCR utilizando o DNA extraído das amostras pertencentes ao ninho 7 e 9, utilizando os iniciadores PE344, PE519, PE1075 Puni_1D12 e Puni_1E1. A eficácia da PCR dos cinco iniciadores foi verificada através da técnica de eletroforese em gel agarose a 1%. (Figura 3, 4 e 5).

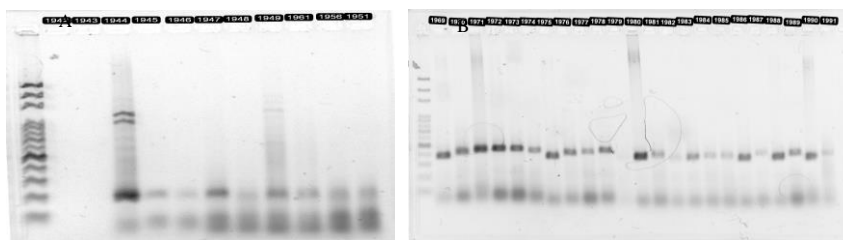


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do Loco PE344 (A) e do Loco PE519 (B) de *Podocnemis expansa*.

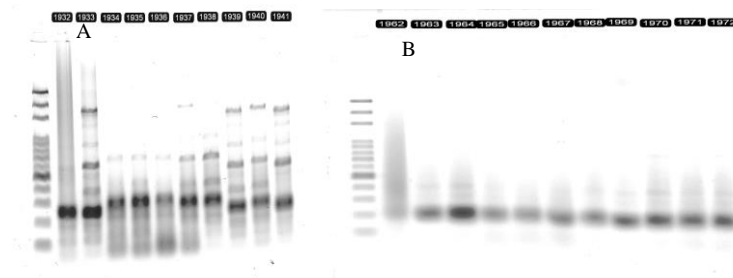


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do Loco PE1075 (A) e do Loco PUNI_1D12 (B) de *Podocnemis expansa*.

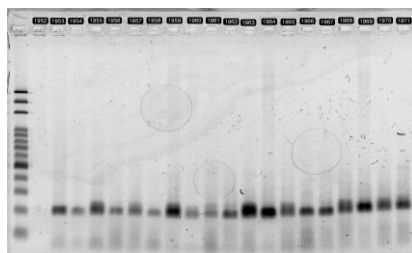


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do Loco PUNI_1E1 de *Podocnemis expansa*.

Nesse trabalho foram genotipados 60 filhotes de dois ninhos de *P. expansa* com um loco de microssatélite (Puni_1D12). A distribuição do número de alelos nos ninhos por loco é representada na Tabela 2, onde se verifica o número de alelos encontrados de cada ninho e se houve presença ou não de alelos homozigotos.

Tabela 2: Número de Alelos (N), Número de homozigotos no loco Puni_1D12, e o número de pais inferidos em cada ninho de *Podocnemis expansa*.

NINHOS	N	Número de pais inferidos
N 7	9	4
N 9	9	4

A paternidade múltipla foi encontrada nos 2 ninhos pela análise no loco Puni_1D12, assumindo o método da simples contagem de alelos (tabela 2). Quando se utilizou a contagem, os ninhos mostraram no mínimo, mais de um macho contribuindo para a prole. Com esse resultado, a ocorrência de paternidade múltipla foi atribuída nesses dois ninhos de *P. expansa* para o loco Puni_1D12, com no mínimo 4 pais contribuindo em cada um dos ninhos.

Marcadores microssatélites, em virtude da alta frequência, distribuição no genoma e polimorfismo, são muito interessantes, para estimativa de distância genética, discriminação de subpopulações, mas, sobretudo, em estudos que envolvem segregação de alelos para identificação individual e teste de paternidade (Eriksson *et al.* 2006; Garrigan; Hammer 2006). São considerados marcadores ideais para o mapeamento genético e físico de genomas, para identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações.

A utilização de marcadores moleculares tem ajudado bastante no estudo do comportamento reprodutivo de varias espécies, tanto relacionado aos estudos de populações naturais quanto das populações de cativeiro. Com a utilização de marcadores moleculares, podemos identificar o tipo de paternidade existente em uma população natural de *Podocnemis expansa*, onde até o presente momento este trabalho traz evidência de paternidade múltipla para essa espécie.

Valenzuela (2000) descreveu os locos PE344, PE519 e PE1075 para estudo de análises de parentesco para a espécie *P. expansa*, onde obteve sucesso na determinação de paternidade múltipla nos ninhos estudados.

Os locos Puni_1E1 e Puni_1D12 criados por Fantin *et al.* (2007) a priori, foram desenvolvidos para análises de parentesco destinadas a *P. unifilis*. Nesse estudo foi possível verificar a eficiência da amplificação desses locos também para a espécie *P. expansa*.

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

4. Conclusão

De um modo geral, a partir dos resultados desse estudo podemos inferir que os locos utilizados nesse trabalho foram eficazes na amplificação, principalmente os descritos por Fantin *et al.* (2007) que servem tanto para a espécie *Podocnemis unifilis* quanto para *P. expansa*. Também foi possível verificar a paternidade múltipla nos dois ninhos com o loco Puni_1D12, onde foi possível constatar a contribuição de no mínimo quatro machos em cada um dos ninhos.

O trabalho terá continuidade, onde será necessário realizar a reação de genotipagem dos demais locos para que os resultados sejam mais consistentes para determinação do tipo de paternidade que ocorre em *P. expansa*.

5. Referências Bibliográficas

- Alho, C.J.R.; Padua, 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.
- Bentsen, H.B.; Olesen, I. 2002. Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates. *Aquaculture*, 204: 349-359.
- Chesser, R.K.; Baker, R.J. 1996. Effective sizes and dynamics of uniparentally and diparentally inherited genes. *Genetics*, 144: 1225-1235.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Eriksón, J.; Siedel, H.; Lukas, D.; Kayser, M.; Erler, A.; Hashimoto, C.; Hohmann, G.; Boesch, C.; VIGILANT, L. 2006. Y-chromosome analysis confirms highly sex-biased dispersal and suggests a low male effective population size in bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology*, 15(4): 939-949.
- Fantin, C.; Carvalho, C.F.; Hrbek, T.; Sites JR, J.W.; Monjelo, 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*.
- Fantin, C. 2008. *Desenvolvimento de marcadores moleculares de microssatélites para o estudo do sistema reprodutivo em três espécies de tartarugas do gênero Podocnemis*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 99p.
- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to conservation*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 617 p.
- Iverson, J.B. 1992. A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world. J.P. Iverson, Richmond, p.363.
- IUCN, 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/17822/0>>. Acesso em: 28 mai. 2013.
- Malvasio, A. 2001. Aspectos do mecanismo alimentar e da biologia reprodutiva em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812), *P. unifilis* (Troschek, 1848) e *P. sextuberculata* (Cornalia, 1849) (Testudines, Pelomedusidae). 2001. 199 f. Tese (doutorado em zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade De São Paulo, São Paulo.
- Pritchard, P.C.H.; Trebbau, P. 1984. *Turtles of Venezuela*. Clovis: Society for the Study of Amphibians & Reptiles. 414 p.
- Pough, F.H., Heiser, J.B.; Mcfarland, W.N. 2008. *A Vida dos Vertebrados*. 4ª Edição. Atheneu, São Paulo.
- Smith, N.J.H. 1979. Aquatic turtles of Amazonia: an endangered resource. *Biological Conservation*, 16: 165-176.
- Valenzuela, N. 2000. Multiple paternity in side-neck turtles *Podocnemis expansa*: evidence from microsatellite DNA data. *Molecular Ecology*, 9: 99-105.