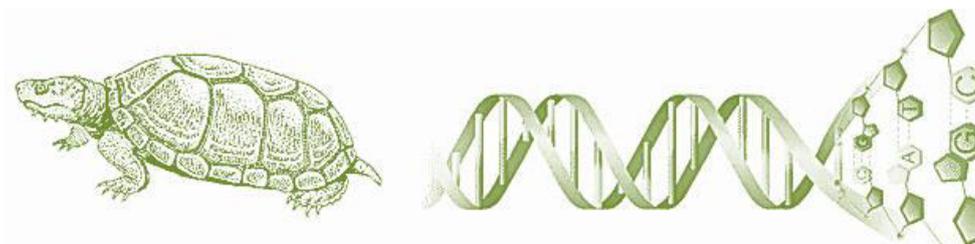




UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PPG - BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

MAYARA MONTELES DE ALMEIDA NUNES

VARIABILIDADE GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES DE *Kinosternon scorioides* NO MARANHÃO, NORDESTE DO BRASIL, COM BASE NA REGIÃO CONTROLADORA DO mtDNA.



São Luis
2016

MAYARA MONTELES DE ALMEIDA NUNES

VARIABILIDADE GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES DE *Kinosternon scorpoides* NO MARANHÃO, NORDESTE DO BRASIL, COM BASE NA REGIÃO CONTROLADORA DO mtDNA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientadora: Prof^a. Dra. Larissa Barreto

Co-orientador: Prof^o. Dr. Marcelo de Souza Andrade

São Luis

2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

DE ALMEIDA NUNES, MAYARA MONTELES.
VARIABILIDADE GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES DE
Kinosternon scorpioides NO MARANHÃO, NORDESTE DO BRASIL,
COM BASE NA REGIÃO CONTROLADORA DO mtDNA / MAYARA MONTELES
DE ALMEIDA NUNES. - 2016.
31 f.

Coorientador(a): MARCELO SOUZA ANDRADE.
Orientador(a): LARISSA NASCIMENTO BARRETO.
Dissertação (Mestrado) - Ensino de Ciências ? Anos
Finais do Ensino Fundamental ?ciência É Dez!?,
Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS, 2016.

1. DNA mitocondrial. 2. Kinosternon scorpioides. 3.
Região controladora. 4. Variabilidade Genética. I.
NASCIMENTO BARRETO, LARISSA. II. SOUZA ANDRADE, MARCELO.
III. Título.

MAYARA MONTELES DE ALMEIDA NUNES

VARIABILIDADE GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES DE *Kinosternon scorioides* NO MARANHÃO, NORDESTE DO BRASIL, COM BASE NA REGIÃO CONTROLADORA DO mtDNA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dra. Larissa Barreto– Orientadora
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof^o. Dr. Marcelo Souza de Andrade– Co-orientador
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof^o. Dra. Emygdia Rosa Pires Leal – Avaliador Interno
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Dr. Marcelo Magalhães Silva .– Avaliador externo
Hospital Universitário (HUUFMA)

Aprovada em: ___/ ___/ 2016

Local de Defesa: São Luis-MA

APOIO



FONTE FINANCIADORA



DEDICATÓRIA

A Deus

*Aos meus amados filhos, Pedro e Julia pelo
amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as alegrias e conquistas em minha vida.

Aos meus pequenos, Pedro e Júlia por todo o carinho e paciência, apesar de muitas vezes distante deles, eram o estímulo para seguir com meus objetivos. A todos os meus familiares que me incentivaram e me ajudaram de alguma forma.

À minha orientadora, Dra. Larissa Barreto, pelos ensinamentos, pela amizade, confiança e por ser um exemplo como pessoa e profissional.

Ao Dr. Marcelo Andrade, meu co-orientador agradeço o incentivo e entusiasmo que sempre demonstrou e transmitiu durante a execução deste trabalho.

À Dra. Ligia Tchaicka, pela confiança, pelas valiosas sugestões e também pelas oportunidades que me foram oferecidas.

A todos do QUEAMAR pelos ensinamentos e apoio nas coletas, pela oportunidade de viver boas experiências de campo no isolamento da Ilha de Curupu; em especial à Margareth Calvet, Paula Santiago, Luis Eduardo, Rebeca Bredder e Mayara Canut pelas coletas da Baixada Maranhense.

À Equipe do laboratório de Patologia Molecular e Grupo GGC, em especial à Msc. Elba Chaves pela amizade, apoio técnico e encorajamento e à Msc. Ana Paula Sampaio pela ajuda com os programas de Análises Biomoleculares.

À todos do grupo GRANATO, ao Msc. Carlos Licar e, em especial à professora Dra. Alana Lislea pelo apoio na execução desta pesquisa.

A todos os colegas do Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade (LEGH), especialmente ao Dr. Marcelo Magalhães por todo o apoio técnico e didático na execução desta pesquisa, também à Nadja Gaido, Sulayne Araújo e Leydiane Balieiro pelas conversas, apoio e amizade de sempre.

A todos os meus amigos que me apoiaram sempre, em especial as colegas da turma de mestrado Solange Frazão, Simone Silva e Ana Paula Sousa. Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, pela disponibilidade deste curso.

Ao SISBIO pela concessão da licença para a realização deste trabalho;

À FAPEMA pelo apoio financeiro.

A realização desta dissertação não teria sido possível sem a colaboração e incentivo de várias pessoas. Gostaria de expressar a minha gratidão a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esta etapa se tenha tornado realidade.

“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana”

(Charles Darwin)

SUMÁRIO

RESUMO	I
LISTA DE FIGURAS	II
APRESENTAÇÃO	1
REFERÊNCIAS	2
VARIABILIDADE GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES DE <i>Kinosternon scorpioides</i> NO MARANHÃO, NORDESTE DO BRASIL, COM BASE NA REGIÃO CONTROLADORA DO mtDNA.	
ABSTRACT	15
RESUMO	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1. Área de estudo	19
2.2. Obtenção dos animais	21
2.3.Métodos de análise molecular	21
3. RESULTADOS	22
4. DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÃO	27
6. REFERÊNCIAS	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: DNA mitocondrial de animais.

Figura 2.: Localização da área de estudo. L1 = Local de referência Ilha de Curupu Maranhão, Brasil; L2 = Município de São Bento Maranhão, Brasil.

APRESENTAÇÃO

A diversidade de quelônios brasileiros representa aproximadamente 11% do total de espécies existentes no mundo. Ainda há lacunas de conhecimento quanto à biologia e estado populacional desses animais, contudo, alguns quelônios amazônicos necessitam de programas permanentes de monitoramento e manejo devido à forte pressão antrópica que sofrem, tornando-os dependentes de ações de conservação, (IBAMA, 2012).

A história dos quelônios faz com que sejam vulneráveis ao declínio populacional. As baixas taxas de crescimento e os longos períodos necessários para atingir a maturidade, associados à baixa taxa de substituição de indivíduos na população, podem predispor as espécies ao risco de extinção (POUGH et al., 2003).

Kinosternon scorpioides (Chelonia: Kinosternidade) (LINNAEUS, 1776), conhecida como jurará é uma tartaruga semi-aquática, de pequeno porte com pés e mãos espalmados e membrana interdigital reduzida. A família de tartarugas Kinosternidae inclui 25 espécies semi-aquáticas (38 táxons incluindo subespécies). Possui ampla distribuição na América do Sul e na América Central (VOGT, 2008; BERRY E IVERSON, 2011), onde habita permanentemente locais de campo alagado e não faz migração. No Brasil, a concentração de espécimes é reduzida na Amazônia, ocorrendo também no Nordeste e Centro-Oeste do país (VANZOLINI et al., 1980; BARRETO et al., 2009, 2010).

K. scorpioides é dos quelônios menos conhecidos pela ciência e provavelmente uma das mais ameaçadas pela ação antrópica (MARQUES et al., 2008) De acordo com IVERSON (1991) a compreensão dos traços genéticos do gênero *Kinosternon* tem sido

impedida pela falta de uma filogenia bem resolvida para o grupo, pois hipóteses filogenéticas publicadas até à data têm sido baseadas em morfologia.

O conhecimento da composição genética de uma espécie, e de como ela está organizada em suas populações, é fundamental para as ações de manejo e conservação e os estudos filogenéticos que utilizam técnicas moleculares têm contribuído muito para a compreensão das linhagens dentro das espécies ou de grupos de espécies. Onde, as comparações das sequências gênicas mitocondriais tornaram-se poderosos meios para inferir antigas relações evolutivas, pois os rearranjos parecem ser únicos, geralmente eventos raros que são improváveis de ocorrer independentemente em linhagens evolutivas independentes (AVISE, 1994; BOORE, 1999; RODRIGUES 2005)

Atualmente, tartarugas de água doce têm sido mais estudadas nas Américas do Norte e Central incluindo o gênero *Kinosternon* com mais estudos focados na espécie *K. flavescens* (IVERSON, 2013) e *K. leucostomum*, onde análises de polimorfismos detectados no DNA mitocondrial deste gênero com foco na região controladora, se mostraram excelentes marcas para caracterização genética destas populações.

Através de todas essas informações, o propósito deste estudo foi avaliar a variabilidade genética de populações de Jurará (*K. scorpioides*), da região costeira da Ilha de Curupu-MA e da Região continental da Baixada Maranhense no Município de São Bento-MA, utilizando como sequencias a região controladora (RC) do mtDNA.

REFERÊNCIAS

AVISE, J. C. (2000) Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, Boston.

BARRETO, L.; LIMA, L. C. P. ; BARBOSA, S. G. (2009). Observations on the Ecology of *Trachemys adiutrix* and *Kinosternon scorpioides* on Curupu Island, Brazil. *Herpetological Review*, 40: 283-286.

BARRETO, L.; RIBEIRO, L. E.S.; RIBEIRO, A. B. N.; AZEVEDO, R. R.; TAVARES, D. L.; ABREU, J. M. S.; CUTRIM, N. B. Mapeamento de áreas de 95 ocorrência e aspectos de conservação de tartarugas (chelonia) de água doce no estado do Maranhão, Brasil. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, 23:49-56, 2010.

BERRY, J. F. ; IVERSON, J. B. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) – Scorpion Mud Turtle - Conservation Biology of freshwater turtles and tortoises. *Chelonian Research Monographs*, n 5, v. 1, 2011.

BOORE, J. L. (1999). Animal Mitochondrial Genomes. *Nucleic Acids Researches* 27: 1767-1780.

IBAMA. 2012. Répteis- Quelônios do Brasil. Inst. Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília - DF.

IVERSON, J.B., LE, M., INGRAM, C., 2013. Molecular phylogenetics of the mud and musk turtle family Kinosternidae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69, 929–939

KUMAZAWA, Y., and M. NISHIDA. 1999. Complete mitochondrial DNA sequences of the green turtle and blue-tailed mole skink: statistical evidence for archosaurian affinity of turtles. *Mol. Biol. Evol.* 16:784–792.

MARQUES, J. R. F. et al. Conservação e melhoramento dos recursos genéticos animais da Amazônia brasileira. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA - 2008, João Pessoa - PB. Anais... UFPB: João Pessoa, 2008. CD-ROM ZOOTEC 2008.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M. e HEISER, J. B, 2003. *A Vida dos Vertebrados*. Atheneu Editora, São Paulo, 699p.

VANZOLINI, P.E., RAMOS-COSTA, A.M.M. & VITT, L.J. Répteis das Caatingas. *Academia Brasileira de Ciências*. Rio de Janeiro. 1980, 161 p.

VOGT, R. C. Amazon Turtles. Lima, Peru: Gráfica Biblio, 2008, 104 p.

VARIABILIDADE GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES DE *Kinosternon scorpioides* NO MARANHÃO, NORDESTE DO BRASIL, COM BASE NA REGIÃO CONTROLADORA DO mtDNA.

Mayara Monteles de Almeida Nunes ^a; Larissa Barreto^b; Marcelo Andrade^c; Marcelo Magalhães^c; Ligia Tchaicka^d; Ana Paula Sampaio; Elba Chaves^e.

^a - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses s/n, 65080040, São Luís, Maranhão, Brasil. mayara-monteles@hotmail.com.

^b -Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses s/n, 65080040, São Luís, Maranhão, Brasil. laraufma@yahoo.com.br.

^c - Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade – LEGH, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS ; Departamento de Ciências Fisiológicas - DCF Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses s/n, 65080040, São Luís, Maranhão, Brasil. andrade_dna@hotmail.com; magalhaes_ms@yahoo.com.br.

^d - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA, Campus Paulo IV
Curso de Pós Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca lchaicka@yahoo.com.br;
paulasampaio4@gmail.com.

^e - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA, Campus Grajau- Curso de Zootecnia. epcvet2013@hotmail.com.

ABSTRACT

Kinosternon scorpioides, known as swear is one of the best known species of freshwater turtles in Brazil with wide distribution in South America in Central America and Mexico. In the state of Maranhão were found 06 species of freshwater turtles. Among the Terrapins, the swear is one of the least known to science. Knowledge of the genetic makeup of some sort is necessary to evaluate the variability levels found in natural populations and defining population structure by philogeography. Thus, the aim of this study was to evaluate the genetic diversity of populations had sworn the coastal region of Curupu-MA Island (L1) and the Continental Region of Baixada Maranhense in São Bento (L2). For genetic variability analysis was used to control region of DNA mitochondrial. O blood of the animals was collected and extracted DNA. The fragments of the mtDNA control region (CR) were PCR amplified, purified and sequenced. Fifteen specimens were analyzed between these six L1 region and L2 region nine. Individuals of L1 region is not newly introduced specimens according to analyze the haplotype network have generated with genetic distance L2 of individuals. The analysis of a control region of mtDNA may be relevant to species because it was found a clade forming a haplotype different from the other two species of the genus. In these analyzes it can be concluded that populations have genetic variability, noting the difference between these in the haplotype network generated and the differences with the external groups of aligned sequences, yet the deepening of genetic studies is likely to support strategies for the conservation of the species.

Keywords: *Kinosternon scorpioides*, mitochondrial DNA control region, genetic variability.

RESUMO

Kinosternon scorpioides, conhecida como jurará é uma das espécies mais conhecidas de quelônios de água doce do Brasil com ampla distribuição na América do Sul na América Central e no México. No Estado do Maranhão foram encontradas 06 espécies de tartarugas de água doce. Dentre as tartarugas de água doce, o jurará é uma das menos conhecidas pela ciência. O conhecimento da composição genética de uma espécie é fundamental a avaliação dos níveis de variabilidade genética encontrados em populações naturais e a definição de estruturas populacionais por meio da filogeografia. Assim, objetivou-se com este estudo avaliar a diversidade genética de populações de Jurará da região costeira da Ilha de Curupu-MA (L1) e da Região continental da Baixada Maranhense no Município de São Bento (L2). Para análise de variabilidade genética foi utilizado a região controladora do DNA mitocondrial. O sangue dos animais foi coletado e extraído o DNA. Os fragmentos do DNAm_t da região controladora (RC) foram amplificados por PCR, purificados e sequenciados. Foram analisados quinze espécimes entre estas, seis da região L1 e nove da região L2. Os indivíduos da região L1 não são espécimes introduzidos recentemente de acordo com a análise da rede haplotípica gerada possuem distância genética com os indivíduos de L2. A análise de uma região controladora do DNAm_t pode ser relevante para espécie, pois foi encontrado um clado formando um haplótipo diferente das outras duas espécies do gênero. Nestas análises pode se concluir que as populações possuem variabilidade genética, observando a diferença entre estas na rede haplotípica gerada bem como a diferenças com os grupos externos de sequencias alinhadas, contudo o aprofundamento dos estudos genéticos poderá vir a subsidiar estratégias para a conservação da espécie.

Palavras chave: *Kinosternon scorpioides*, DNA mitocondrial, região controladora, variabilidade genética.

1. INTRODUÇÃO

A história dos quelônios faz com que sejam vulneráveis ao declínio populacional. As baixas taxas de crescimento e os longos períodos necessários para atingir a maturidade, associados à baixa taxa de substituição de indivíduos na população, podem predispor as espécies ao risco de extinção (POUGH et al., 2003). Aliadas a isso a perda de habitat e a caça predatória desencadeia a diminuição da biodiversidade, uma vez que nestas condições, a taxa de extinção se torna maior que a especiação. A atual perda de espécies é algo sem precedentes e pode ser irreversível. Podendo ainda, deixar às espécies susceptíveis a depressão endogâmica, o que desencadeará proles com uma menor variabilidade genética (PRIMACK; RODRIGUES, 2002).

Kinosternon scorpioides, conhecida como jurará, é uma tartaruga semi-aquática, de pequeno porte com pés e mãos espalmados e membrana interdigital reduzida. A família de tartarugas Kinosternidae, inclui 25 espécies semi-aquáticas (38 táxons incluindo subespécies). Possui ampla distribuição na América do Sul e na América Central (VOGT, 2008; BERRY E IVERSON, 2011), onde habita permanentemente locais de campo alagado e não faz migração.

No Brasil, a concentração de espécimes é reduzida na Amazônia, ocorrendo também no Nordeste e Centro-Oeste do país (VANZOLINI et al., 1980; BARRETO et al., 2009, 2010). No Estado do Maranhão é uma das 06 espécies de tartarugas de água doce mapeadas em áreas continentais e também litorâneas, havendo registros de *Kinosternon scorpioides* na Ilha de Curupu-MA e nas cidades de Pinheiro e São Bento da região da Baixada Maranhense.

K. scorpioides é um dos quelônios menos conhecidos pela ciência e provavelmente uma dos mais ameaçados pela ação antrópica (MARQUES et al., 2008).

Trabalhos na Baixada Maranhense com análise dos estoques naturais de *K.scorpioides* evidenciam que tal espécie esteja diminuindo ao longo dos anos, e dentre os fatores citados como causa, a caça predatória e o comércio ilegal dessa espécie foi o mais citados pelas comunidades (MEDEIROS, 2016). Estes impactos também foram observados por FIORI (2002) onde os principais problemas citados foram as queimadas, o desmatamento, a extinção de animais, a caça e pesca predatória.

O conhecimento da composição genética de uma espécie, e de como ela está organizada em suas populações, é fundamental para as ações de manejo e conservação. Dentre os principais estudos realizados dentro desta área podemos citar a avaliação dos níveis de variabilidade genética encontrados em populações naturais, a detecção de modos de reprodução e estruturas familiares e a definição de estruturas populacionais por meio da filogeografia (AVISE, 1993).

Para RODRIGUES (2005) estudos filogenéticos que utilizam técnicas moleculares têm contribuído muito para a compreensão das linhagens dentro das espécies ou de grupos de espécies. Eles permitiram revisões de grupos taxonomicamente complexos, frequentemente revelando táxons não identificados e facilitando a reconstrução de relações históricas e de eventos de contatos e isolamento entre populações e entre espécies: importante para a identificação de linhagens isoladas ou distintas. Eles também têm sido a chave no desenvolvimento de estratégias de conservação.

O DNA mitocondrial (Figura 1) é uma molécula que apresenta: herança materna; ausência de recombinação; conteúdo gênico conservado; regiões intergênicas pequenas ou ausentes; ausência de íntrons, de DNA repetitivo, de pseudogenes, de elementos transponíveis; e alta taxa de evolução (MORITZ *et al.*, 1987).

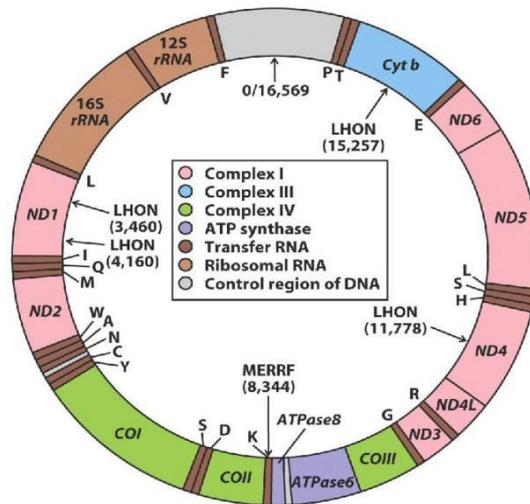


Figura 1: DNA mitocondrial.

Entre os quelônios, os estudos envolvendo a análise do DNA mitocondrial são recentes. Tartarugas de água doce têm sido mais estudadas nas Américas do Norte e Central incluindo o gênero *Kinosternon* com mais estudos focados na espécie *K. flavescens*, *K. arisonense* e *K. leucostomum*, onde as análises de polimorfismos detectados no DNA mitocondrial deste gênero se mostraram excelentes marcas para caracterização genética destas populações.

Reconhecendo a insuficiência de dados científicos sobre o Jurará (*K. scorpioides*), este estudo foi proposto para avaliar a variabilidade genética de duas populações, uma da região costeira da Ilha de Curupu-MA e outra da Região continental da Baixada Maranhense no Município de São Bento, analisando sequências de um fragmento da região controladora do DNA mitocondrial. Assim, o atual estudo pretende subsidiar posteriores ações de conservação e manejo para a espécie estudada com os dados de variabilidade genética.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Áreas de estudo

Foram definidos dois locais para coleta dos animais. O local de referência L1 está localizado na Ilha de Curupu (02° 24' 09" e 02° 27' 1" S; 44° 01'19" e 44° 06'52" W) cerca de 30 km do centro de São Luís, no interior da Baía de São José, Estado do

Maranhão. Esta ilha é formada por extensas praias arenosas, apresentando no seu interior manguezal, campos alagados, vegetação de restinga, dunas e lagoas de água doce interdunares (BARRETO et al., 2009). A região L2 localiza-se na Baixada Maranhense especificamente no município de São Bento (02° 41'45"S e 44°49'17"W) situado a oeste e sudoeste da Ilha de São Luís. Possui áreas com campos alagados sazonalmente, e algumas lagoas que apesar de perenes, sofrem influências do período seco. As duas áreas L1 e L2 distam entre si em aproximadamente 305 km (Figura 2).

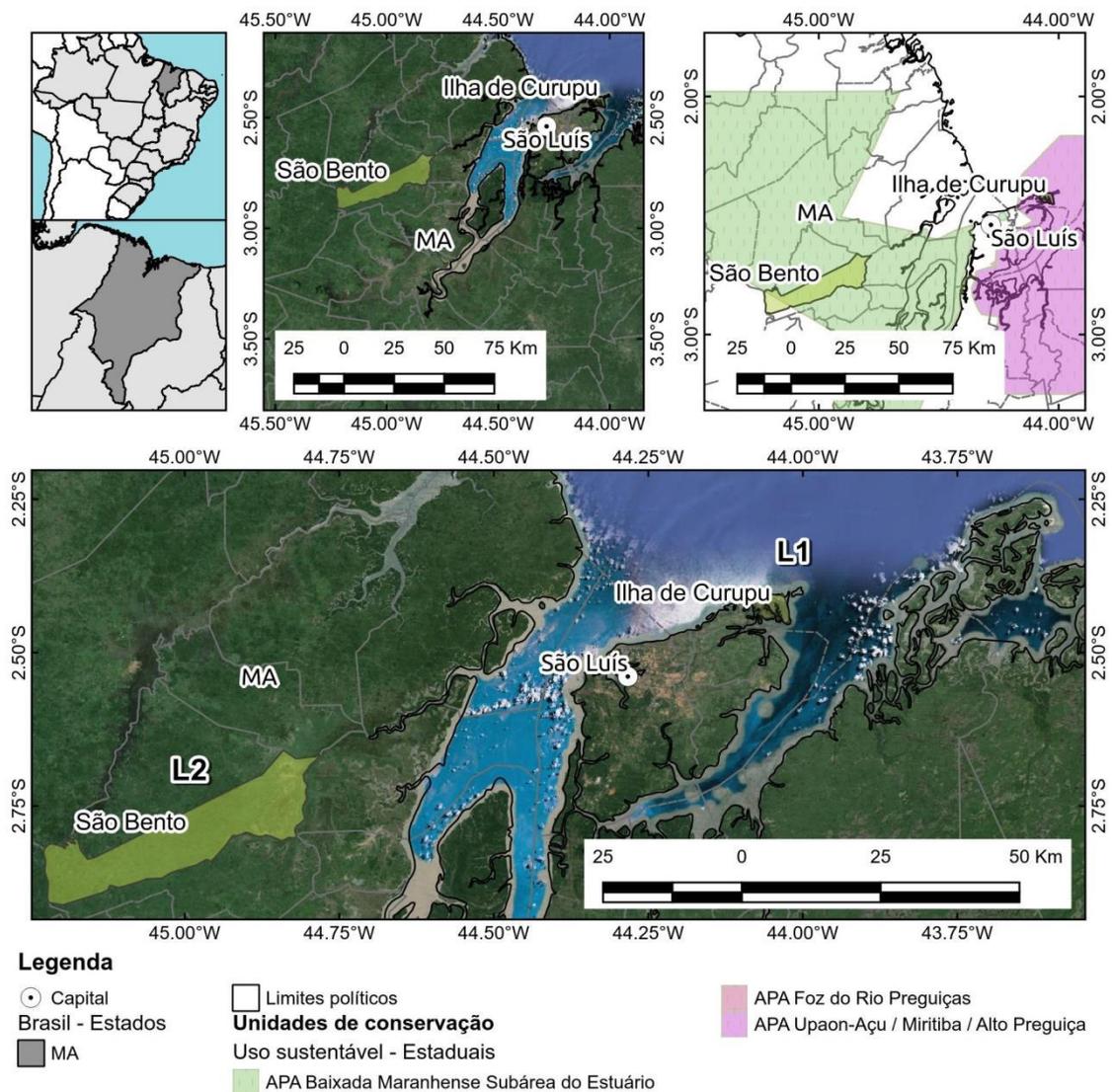


Figura 2: Localização da área de estudo L1= Mapa da Ilha de Curupu, Raposa, MA; L2= Município de São Bento, MA. Mapa: Diego Campos.

2.2. Obtenção dos animais

O animal é capturado no período chuvoso até início do período seco, pois na estação de seca os espécimes estavam, enterrando-se na areia ou em locais úmidos até que o período chuvoso recomece (PEREIRA et al., 2007).

Para o presente estudo foram obtidas 15 amostras de sangue de *K. scorpioides*, sendo 06 da região L1, 09 da região L2. Os animais foram levados ao Laboratório de Patologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão, para realização da coleta de sangue. Foi feita a devida contenção do animal para a coleta de sangue da veia jugular segundo SCHUMACHER, (1996). O sangue foi transferido imediatamente após a colheita para o cartão FTA, que se constitui em uma base de celulose impregnado de agentes químicos que impedem a degradação do DNA (WATMAN 2008). As amostras encontram-se depositadas na Coleção de Tecidos e DNA da Fauna Maranhense – COFAUMA/UEMA.

2.3 Métodos de análise molecular

O Sangue coletado foi extraído pelo método fenol/clorofórmio com digestão pela enzima proteinase K (SAMBROOK et al., 1989). Para obtenção de fragmentos da região controladora do DNA mitocondrial, foram realizadas reações de PCR (Reação em cadeia da polimerase) utilizando os primers descritos para *K. flavescens* por SERB et al (2001): KNCR 271F (5'-ATCGTTATACATGGTTATCTATT-3') e KNPH 35R (5'-GCCGTGCTTTGATATAAGCT-3').

O volume final de cada reação de PCR foi de 15 µl, contendo 7,5 µl de master mix Promega, 3,3 µl de H₂O free, 0,2 µl de MgCl₂ (50 mM), 1,5 µl de cada primer e 1,0 µl do DNA total. As reações foram realizadas em um termociclador PCR 9700 (Applied Biosystems), que consiste em temperatura inicial de 94° a 5 min, seguido por

35 ciclos de desnaturação inicial de 30 seg a 94° C, para o anelamento 45 segundos a uma temperatura de 50.7 ° C, e 1 min a 72 ° C para extensão, e extensão final a 72° C de 5 minutos.

O resultado da PCR foi verificado por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o Kit de Purificação Wizard/Promega seguindo o protocolo e recomendações do fabricante.

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 GeneticAnalyzer*. As sequências de DNA mitocondrial foram corrigidas manualmente utilizando o programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013), posteriormente alinhadas através do CLUSTAW/MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) e os índices de diversidades foram calculados com auxílio do programa DNAsp v.5 (LIBRADO & ROZAS, 2009), e a rede de haplótipos observada no programa Network 4.6.1.0 (<http://fluxus-engineering.com>).

As técnicas de extração de DNA e PCR foram desenvolvidas no Laboratório de Patologia Molecular do Curso de Veterinária- UEMA em São Luís-MA e no Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade LEGH/HUUFMA.

3. RESULTADOS

Entre as 15 sequências obtidas, 06 da região L1 e 09 da região L2, mostraram bons produtos de leitura e foram comparadas com sequências disponíveis no NCBI (Genbank) para outras espécies do gênero: *K. flavescens* e *K. arizonense* estas tiveram as sequencias alinhadas e adicionadas a rede de haplótipos (Figura 2).

O fragmento ao ser alinhado resultou em 207pb apresentando 04 sítios variáveis e nenhum sítio informativo para parcimônia. A diversidade nucleotídica π 0,00568e a diversidade haplotípica Hd de 0,514 9. A rede de haplótipos gerada mostrou que todas as amostras de São Bento-MA (H-2;L2) compartilharam o mesmo haplótipo e as amostras de Curupu-MA (H1;L1) apresentam um haplótipo exclusivo.

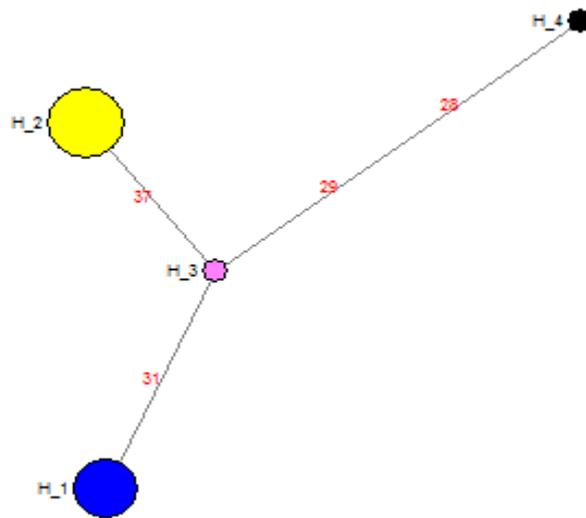


Figura 2: Rede de haplótipos gerada pelo método de median-joining (BANDELDT et al., 1999) a partir de sequencias da região controladora do mtDNA de *K. scorpioides*. Os círculos representam as sequencias haplotípicas, sendo as áreas dos mesmos proporcionais à frequências do haplótipo. O comprimento das linhas está relacionado aos passos mutacionais, espaços que separam cada haplotipo, estando o número de mutações entre haplótipos indicado em vermelho (números).

Quanto às distancias geradas para os dois outros grupos Hap_3: 1 *K. arizonense* e Hap_4: 1*K. flavescens* corroboram a informação descrita anteriormente e por SERB *et al* (2001), sendo estas oriundas das Américas do Norte e Central justificando a distância genética observada na rede haplotípica.

4. DISCUSSÃO

A molécula do DNA mitocondrial desde as décadas de 70-80 passou a fazer parte de muitos estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos, pois apresenta características genéticas e estruturais extremamente peculiares e únicas (AVISE, 1993).

Até agora, apenas uma pequena amostra do reino Metazoa tem sido estudado para sequências de mtDNA, arranjos de genes e mecanismos moleculares podem em um futuro próximo serem melhor compreendidos através da comparação de sistemas genômicas mitocondriais, os estudos envolvendo a comparação da sequência gênica mitocondrial tornou-se um poderoso meio para inferir antigas relações evolutivas, pois os rearranjos parecem ser únicos, geralmente eventos raros que são improváveis de ocorrer independentemente em linhagens evolutivas independentes (BOORE, 1999).

É uma molécula presente na quantidade de centenas a milhares de cópias em cada célula e é formada por aproximadamente 15 a 20 kilobases (kb). Onde, as altas taxas evolutivas e o padrão de herança predominantemente matrilinear fazem do DNAm uma ótima alternativa no estudo de relações filogenéticas e na identificação de subdivisões populacionais (AVISE, 1994)

Segundo AVISE (2000), muitos trabalhos, também, abordam as relações filogenéticas com base na variação do mtDNA tanto em nível intra quanto inter-populacional, correlacionando-as com as distribuições geográficas dos clados. Juntos estes elementos constituem a filogeografia, onde as populações naturais podem ser classificadas em diferentes categorias filogeográficas, facilitando a compreensão acerca da dinâmica populacional e dos padrões de dispersão e colonização nas áreas de distribuição das espécies.

Análises de aspectos como medidas de comprimento da carapaça dos animais apontam uma pressão do ambiente na Ilha de Curupu onde de acordo a análise de estrutura populacional de OLIVEIRA (2014), os tamanhos de carapaça não ultrapassaram 14,2 cm para as fêmeas e 14,8 cm para os machos, bem menores que os encontrados por PRITCHARD & TREBBAU (1984), que registraram indivíduos de até 27 cm de carapaça. Isso pode ser reflexo de um habitat com recursos limitados, visto que os juvenis desse estudo apresentaram dimorfismo sexual a partir dos 8 cm de carapaça diferentemente de CASTRO (2006) que em seu estudo com *K. scorpioides* em cativeiro observou o dimorfismo sexual a partir de 9,4 cm de carapaça.

Em quelônios, os estudos envolvendo a análise do mtDNA são recentes. Estes se restringem quase que na totalidade às tartarugas marinhas, sendo *K. leucostomum* a única espécie do gênero *Kinosternon* cujo genoma mitocondrial já foi totalmente sequenciado (GENBANK). Os polimorfismos detectados no mtDNA deste gênero se mostraram excelentes marcas para caracterização genética de populações (SERB et al, 2001).

Para IVERSON et al (2013), apesar da resolução de muitas das relações entre o gênero *Kinosternon*, eo estabelecimento de uma cronologia razoável de diversificação, várias questões evolutivas fundamentais permanecem. Porque a maior parte da diversificação dentro do gênero ocorreram nos últimos 10 milhões de anos (especialmente dentro do grupo scorpioides), onde as análises atuais não foram capazes de resolver as suas relações com alta confiança. Se o fizer, vai exigir amostragem adicional e marcadores específicos para a espécie.

A amostragem estudada permitiu esclarecer algumas questões sobre a espécie nessas regiões como a distancia genética bem definida entre populações da baixada Maranhense e Ilha de Curupu, os trabalhos acerca da biologia molecular do gênero feito por IVERSON et al (2013) nos mostraram também a escassez de análises na literatura para a espécie *K. scorpioides*.

Na investigação da sequência do mtDNA de *K. scorpioides* foi demonstrado a análise de uma região controladora do DNAm t o que pode ser relevante para espécie, pois foi encontrado um clado formando um haplótipo diferente de outros do gênero de o que corrobora com análises de filogenéticas do gênero feitas por IVERSON et al (2013).

Na análise de haplótipos podemos inferir que há uma forte indicação que os indivíduos da Ilha de Curupu-MA (L1) não são espécimes introduzidos recentemente em virtude da distância genética de três mutações com os indivíduos de São Bento-MA (L2), o que mostra que colonizaram esta área há muito tempo e existe uma possibilidade de fluxo gênico com o continente devido a dificuldade de travessia. Esta distância pode ser confirmada observando o grupo externo *K. flavescens* (SERB et al. 2001)

No território brasileiro são conhecidas 31 espécies de quelônios continentais representados pelos cágados, tartarugas e jabutis. A diversidade de quelônios brasileiros representa aproximadamente 11% do total de espécies existentes no mundo. Ainda há lacunas de conhecimento quanto à biologia e estado populacional desses animais, contudo, alguns quelônios amazônicos necessitam de programas permanentes de monitoramento e manejo devido à forte pressão antrópica que sofrem, tornando-os dependentes de ações de conservação, (IBAMA, 2012).

O conhecimento da história natural das espécies brasileiras de tartarugas de água doce bastante elementar. De acordo com SOUZA (2004), até mesmo questões mais básicas como distribuição geográfica, alimentação, atividade e reprodução são inexistentes para a maioria das espécies, isso acontece em muitos aspectos, com as populações de *K. scorpioides* da Baixada Maranhense tendo se mais estudos nestes aspectos da população de quelônios da Ilha de Curupu. Porém presença de outras espécies de tartarugas nas coletas alerta para a necessidade de estudos e medidas

conservacionistas não somente para *K. scorpioides*, mas para os demais quelônios que compartilham o mesmo habitat (MEDEIROS,2016).

Diante das dificuldades de coletar os espécimes, em análise da literatura muitos autores que trabalham com répteis relatam que estas tem crescido por fatores como a destruição de habitats que é causada pela retirada das florestas de galeria (perda de sombreamento e de nutrientes e elevada erosão da margem), assoreamento, poluição e envenenamento por meio de lixo industrial e doméstico e de produtos agroquímicos, assoreamento e erosão que destroem e modificam as margens dos rios as praias e os nichos térmicos onde os répteis nidificam (RIBEIRO,2014; CUNHA, 2014; RODRIGUES 2015; MEDEIROS,2016). Essas ameaças são difusas e precariamente observadas e podem, gradualmente, dizimar populações de tartarugas e de jacarés. Devido ao fato da diferenciação sexual dos jacarés e das tartarugas ser determinada pela temperatura de incubação, mudanças nas condições térmicas perto dos ninhos, devido à degradação do habitat, podem resultar em desvios da razão sexual, o que constitui uma ameaça por si só.

5. CONCLUSÃO

Com as análises da variabilidade genética de *K. scorpioides* neste estudo concluímos que a espécie não compartilha do mesmo haplótipo nas duas regiões estudadas L1 e L2, o que mostra a variabilidade genética da espécie. Para estudos posteriores, a verificação de endogamia dentro das populações, bem como filogenia aplicada as demais regiões onde esta ocorre, seriam necessários desenhos de primers específicos para a espécie e um aumento no tamanho amostral. Podendo com isso subsidiar estratégias para a conservação da espécie.

6. REFERÊNCIAS

AVISE, J.C. (1993). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York. 511p.

AVISE, J. C. (2000) **Phylogeography. The history and formation of species**. *Harvard university Press, Boston*.

BARRETO, L.; LIMA, L. C. P. ; BARBOSA, S. G. (2009). *Observations on the Ecology of Trachemys adiutrix and Kinosternon scorpioides on Curupu Island, Brazil*. *Herpetological Review*, 40: 283-286.

BARRETO, L.; RIBEIRO, L. E.S.; RIBEIRO, A. B. N.; AZEVEDO, R. R.; TAVARES, D. L.; ABREU, J. M. S.; CUTRIM, N. B. Mapeamento de áreas de 95 ocorrência e aspectos de conservação de tartarugas (chelonias) de água doce no estado do Maranhão, Brasil. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, 23:49-56, 2010.

BOORE, J. L. (1999). *Animal Mitochondrial Genomes*. *Nucleic Acids Researches* 27: 1767-1780.

CASTRO, A. B. Biologia reprodutiva e crescimento de Muçuã *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776) em cativeiro, 2006. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém, 2006, 101p.

COSTA, P. M.; MARTINS, C. F. Conservação de recursos genéticos animais através de técnicas de reprodução. *Universitas Ciências da Saúde*, v. 6, n. 1, p. 39-55, 2008

COSTA M.R ; SILVA, C. S. ; SILVA, F. K. S. ; EGITO, A.A. ; ALBUQUERQUE, M. S. M. . Caracterização Genética do Muçuã (*Kinosternon scorpioides*) por Marcadores Moleculares. In: *Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe*, 2009, Pucon-Chile. *Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe*. *Proceeding Tomo 2*, 2009.

FIORI, A. Ambiente e educação: abordagens metodológicas da percepção ambiental voltadas a uma unidade de conservação, 2002. **Dissertação de Mestrado**,

Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2002, 110pp.

IBAMA. 2012. Répteis- Quelônios do Brasil. Inst. Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília - DF.

IVERSON, J.B., LE, M., INGRAM, C., 2013. Molecular phylogenetics of the mud and musk turtle family Kinosternidae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69, 929–939

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p.1451-1452, 2009.

MARQUES, J. R. F. et al. Conservação e melhoramento dos recursos genéticos animais da Amazônia brasileira. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA - 2008, João Pessoa - PB. Anais... UFPB: João Pessoa, 2008. CD-ROM ZOOTEC 2008.

MCGAUGH, S.E. 2012. Comparative population genetics of aquatic turtles in the desert. *Conservation Genetics* 13:1561–1576.

MEDEIROS, A. M. Aspectos ecológicos, socioambientais e Educação Ambiental aplicados na conservação de *Kinosternon scorpioides* em comunidades da Baixada Maranhense 117f Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M. e HEISER, J. B, 2003. *A Vida dos Vertebrados*. Atheneu Editora, São Paulo, 699p.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. *Biologia da conservação*. Londrina: Planta, 2002. 327p.

- PRITCHARD, P.H.C. & TREBBAU, P. 1984. *Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766. In: The turtle of Venezuela, Society for the Study of Amphibians, 2: 239-248..
- ROCHA, C. A; W. FRANKLIN JUNIOR; W. P. DANTAS; M. F. FARIAS AND A. M. E DE OLIVEIRA. 1997. Fauna e flora acompanhantes da pesca da lagosta no Nordeste do Brasil. In: Boletim Técnico - Científico CEPENE, 5 (1):15 - 28.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: CSHL Press, 1989.
- SERB, J., C. PHILLIPS, AND J. B. IVERSON. 2001. Molecular phylogeny and biogeography of *Kinosternon flavescens* based on complete mitochondrial control region sequences. Mol. Phylo. Evol. 18(1):149-162.
- SOUZA F. L. Uma revisão sobre padrões de atividades, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). Phyllomedusa, Piracicaba – SP, v. 3, n. 1, p. 15-27, 2004.
- TAMURA K, S. G, PETERSON D, F.. A, and KUMAR S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**:30 2725-2729.
- VANZOLINI, P.E., RAMOS-COSTA, A.M.M. & VITT, L.J. Répteis das Caatingas. *Academia Brasileira de Ciências*. Rio de Janeiro. 1980, 161 p.
- VOGT, R. C. Amazon Turtles. Lima, Peru: Gráfica Biblio, 2008, 104 p.
- WATMAN BIOSCIENCE. Preparation of Sample DNA for Downstream Analysis. Folheto explicativo. Estados Unidos /Canadá, 2008
- WRIGHT, S (1978). Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations. The University of Chicago Press, Chicago